

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 908 919**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6816** (2008.01)

**C12Q 1/682** (2008.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2017 PCT/US2017/040485**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.01.2018 WO18009463**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2017 E 17824751 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.01.2022 EP 3481843**

54 Título: **Reacción en cadena de hibridación de iniciador fraccionario**

30 Prioridad:

**05.07.2016 US 201662358462 P**

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

**04.05.2022**

73 Titular/es:

**CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
(100.0%)**

**Office of Technology Transfer 1200 E. California  
Blvd. MC 6-32  
Pasadena, CA 91125, US**

72 Inventor/es:

**PIERCE, NILES, A. y  
CHOI, HARRY, M.T.**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 908 919 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**

Reacción en cadena de hibridación de iniciador fraccionario

**Antecedentes****Campo**

- 5 La presente invención se refiere en general a composiciones y procedimientos relacionados con el uso de la reacción en cadena de hibridación.

**Descripción de la técnica relacionada**

- 10 La reacción en cadena de hibridación (HCR) es un procedimiento para el autoensamblaje desencadenado de moléculas de ácido nucleico a partir de monómeros metaestables de horquilla u otras estructuras de ácido nucleico más complicadas. En una versión simple de este proceso, los monómeros metaestables de las horquillas se someten a una reacción en cadena de eventos de hibridación para formar un polímero de doble cadena mellado cuando se desencadena por una cadena iniciadora de ácido nucleico. Los monómeros de las horquillas almacenan la energía para impulsar el proceso de polimerización en sus bucles y puntos de apoyo monocatenarios.

**Sumario**

- 15 En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende: un primer monómero de horquilla; un segundo monómero de horquilla; una primera sonda iniciadora fraccionaria que comprende un primer iniciador fraccionario; y una segunda sonda iniciadora fraccionaria que comprende un segundo iniciador fraccionario.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende:

un primer monómero de horquilla, que comprende:

- 20 i. un primer dominio de entrada, que comprende un primer punto de apoyo y una primera sección de vástago,  
ii. un primer dominio de salida, que comprende un primer bucle de horquilla y un complemento de la primera sección de vástago, y  
iii. una primera molécula reportera;

un segundo monómero de horquilla, que comprende:

- 25 iv. un segundo dominio de entrada, que comprende un segundo punto de apoyo y una segunda sección de vástago,  
v. un segundo dominio de salida, que comprende un segundo bucle de horquilla y un complemento de la segunda sección de vástago,  
vi. una segunda molécula reportera;

- 30 una primera sonda iniciadora fraccionaria que comprende un primer iniciador fraccionario; y  
una segunda sonda iniciadora fraccionaria que comprende un segundo iniciador fraccionario.

- 35 En algunas realizaciones, se proporciona una composición, en la que la primera sección de vástago puede tener una misma secuencia que la segunda sección de vástago. En algunas realizaciones, se proporciona una composición, en la que el complemento de la primera sección de vástago puede tener una misma secuencia que el complemento de la segunda sección de vástago. En algunas realizaciones, se proporciona una composición, en la que la primera sección de vástago puede tener una misma secuencia que la segunda sección de vástago.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición en la que el primer punto de apoyo es complementario al segundo bucle de horquilla. En algunas realizaciones, se proporciona una composición en la que el segundo punto de apoyo es complementario al primer bucle de horquilla.

- 40 En algunas realizaciones, se proporciona una composición que además comprende una molécula diana que comprende una primera sección diana y una segunda sección diana.

- 45 En algunas realizaciones, se proporciona una composición en la que la primera sonda iniciadora fraccionaria además comprende una primera sección de unión a la diana y la segunda sonda iniciadora fraccionaria además comprende una segunda sección de unión a la diana, en la que la primera sección de unión a la diana está configurada para unirse a la primera sección diana y la segunda sección de unión a la diana está configurada para unirse a la segunda sección diana.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento que comprende:

a. proporcionar:

- i. una primera sonda iniciadora fraccionaria

- ii. una segunda sonda iniciadora fraccionaria
- iii. un primer monómero de horquilla
- iv. un segundo monómero de horquilla, y
- v. una molécula diana;

- 5 b. incubar para permitir la unión; y
- c. detectar una señal.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que la molécula diana comprende un nucleótido.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que la primera sonda iniciadora fraccionaria y la segunda sonda iniciadora fraccionaria se combinan con la molécula diana.

- 10 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento, en el que la primera sonda iniciadora fraccionaria no unida y la segunda sonda iniciadora fraccionaria no unida se eliminan de una muestra que contiene la molécula diana por medio de un primer lavado.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que, tras el primer lavado, la primera y la segunda sonda iniciadora colocadas en la molécula diana se unen al primer monómero de horquilla, que a su vez se une al segundo monómero de horquilla, lo que da lugar a la amplificación de HCR.

- 15 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que el monómero de horquilla no unido se lava de la muestra que contiene la molécula diana.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que una cascada alternante de la primera unión del monómero de horquilla y la segunda unión del monómero de horquilla proporciona un evento de polimerización.

- 20 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento para llevar a cabo HCR, el procedimiento comprende: añadir un primer iniciador fraccionario y un segundo iniciador fraccionario a una muestra, en la que juntos el primer y el segundo iniciador fraccionario proporcionan un iniciador de HCR completo; y añadir un conjunto de monómeros de horquilla de HCR a la muestra para permitir que se produzca HCR en presencia del iniciador de HCR completo.

- 25 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento, en el que el primer iniciador fraccionario es parte de una primera sonda iniciadora fraccionaria y en el que el segundo iniciador fraccionario es parte de una segunda sonda iniciadora fraccionaria.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento, en el que el procedimiento es parte de un proceso *in situ* para obtener imágenes de dianas de ADN, ARN, proteínas o moléculas pequeñas, que incluyen hibridación *in situ* de ADN (ISH), hibridación *in situ* de ARN (ISH), inmunohistoquímica de proteínas (IHC).

- 30 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento, en el que el procedimiento comprende un enfoque de 2 etapas con un lavado después de cada etapa, y en el que la diana se inmoviliza, y en el que la muestra se fija.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que una primera etapa es una etapa de detección que comprende la unión de sondas a una diana y el lavado de la sonda no unida, y en el que una segunda etapa es una etapa de amplificación, en la que se produce la amplificación de HCR, seguida por el lavado de los monómeros de horquilla no polimerizados.

- 35 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que el procedimiento se aplica *in vitro* y en el que la diana se inmoviliza en una perla o microarray.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que el procedimiento es *in vitro* o *in vivo* y en el que la diana no está inmovilizada.

- 40 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que el procedimiento comprende un protocolo de una sola etapa sin lavados.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que la diana es al menos una de las moléculas o complejos diana de ADN, ARN, proteínas o moléculas pequeñas *in vitro*, *in situ* o *in vivo*.

- 45 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que el primer iniciador fraccionario (1151) forma parte de una primera sonda iniciadora fraccionaria (1190) que además comprende una primera sección de unión a la diana (1141).

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que el segundo iniciador fraccionario (1251) forma parte de una segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290) que además comprende una segunda sección de unión a la diana (1241).

- 50 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento, en el que la primera sección de unión a la diana está

configurada para unirse adyacente a la segunda sección de unión a la diana cuando la primera sonda iniciadora fraccionaria y la segunda sonda iniciadora fraccionaria están ambas unidas específicamente a la diana.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento que comprende:

(a) proporcionar:

- 5 I. Una primera sonda iniciadora fraccionaria que comprende un primer iniciador fraccionario
- II. Una segunda sonda iniciadora fraccionaria que comprende un segundo iniciador fraccionario
- III. Un primer monómero de horquilla, que comprende:
  - 10 a. Un primer dominio de entrada, que comprende un primer punto de apoyo y una primera sección de vástago,
  - b. Un primer dominio de salida, que comprende un primer bucle de horquilla y un complemento de la primera sección de vástago, y
  - c. una primera molécula reportera;
- IV. Un segundo monómero de horquilla, que comprende:
  - 15 a. Un segundo dominio de entrada, que comprende un segundo punto de apoyo y una segunda sección de vástago,
  - b. Un segundo dominio de salida, que comprende un segundo bucle de horquilla y un complemento de la segunda sección de vástago, y
  - c. una segunda molécula reportera:
- V. una molécula diana; y
- 20 (b) incubar la primera sonda iniciadora fraccionaria y la segunda sonda iniciadora fraccionaria con una diana.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento, en el que la incubación une la primera sonda iniciadora fraccionaria a la molécula diana y une la segunda sonda iniciadora fraccionaria a la molécula diana.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que se lleva a cabo un lavado para eliminar la primera y la segunda sonda iniciadora fraccionaria no unidas de una muestra que contiene la diana.

- 25 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que las sondas individuales con iniciador fraccionario que permanecen dentro de la muestra después del lavado y no están específicamente unidas a la diana no desencadenan la HCR.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento, en el que la muestra se lava para eliminar al menos del 50 al 99% de las sondas que no están unidas específicamente a la diana.

- 30 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento que comprende: a) unir el primer monómero de horquilla a ambos, el primer iniciador fraccionario y el segundo iniciador fraccionario; b) unir el segundo monómero de horquilla al primer monómero de horquilla; y c) detectar una señal.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento que comprende la unión de un primer monómero de horquilla adicional al segundo monómero de horquilla.

- 35 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento que comprende la unión de un segundo monómero de horquilla adicional al primer monómero de horquilla adicional.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento, en el que hay al menos 10 primeros monómeros de horquilla adicionales.

- 40 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que hay al menos 10 monómeros de segunda horquilla adicionales.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento, en el que hay al menos 100 primeros monómeros de horquilla adicionales.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que hay al menos 100 monómeros de segunda horquilla adicionales.

- 45 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento, en el que la molécula diana además comprende una primera sección diana y una segunda sección diana, en el que la primera sonda iniciadora fraccionaria además comprende una primera sección de unión a la diana y la segunda sonda iniciadora fraccionaria además comprende una segunda sección de unión a la diana, en el que la primera sección diana está configurada para unirse a la primera sección de unión a la diana y la segunda sección diana está configurada para unirse a la segunda sección de unión a la diana.
- 50

- En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento, en el que la molécula reportera es una molécula fluorescente.
- 5 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que la molécula reportera comprende una disposición inactivada o FRET, en la que una molécula fluorescente en un monómero de horquilla se desactiva cuando se alcanza una configuración de polímero por el primer y el segundo monómero de horquilla.
- En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que el primer y el segundo monómero de horquilla forman un par FRET cuando se combinan como polímero.
- En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que el par FRET se forma debido a un cambio en la inactivación o FRET que se produce cuando los monómeros de horquilla se abren y polimerizan.
- 10 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que la molécula reportera es una molécula reportera no fluorescente.
- En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que la molécula reportera es un elemento de tierras raras.
- 15 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento que además comprende al menos una sonda iniciadora fraccionaria adicional.
- En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que la molécula diana es cualquier molécula de ácido nucleico.
- En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que la molécula diana es una proteína.
- 20 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que la molécula diana se selecciona del grupo que consiste en al menos una de las siguientes: ARNm, ARNm<sub>i</sub>, ARN<sub>i</sub>, ARN<sub>r</sub>, ARN no codificante y ADN genómico.
- En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que la molécula diana está compuesta por una secuencia de aminoácidos.
- En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que la molécula diana está compuesta por un complejo de moléculas.
- 25 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que la primera sonda iniciadora fraccionaria comprende un polímero sintético y la segunda sonda iniciadora fraccionaria comprende un polímero sintético.
- En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que la primera sonda iniciadora fraccionaria comprende una secuencia de aminoácidos y la segunda sonda iniciadora fraccionaria comprende una secuencia de aminoácidos.
- 30 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que el primer y el segundo iniciador fraccionario se pueden emparejar en base con el primer monómero de horquilla.
- En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que la primera sonda iniciadora fraccionaria comprende al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en ADN, ARN, 2'Ome-ARN, ARNL, análogo de ácido nucleico sintético, aminoácido, análogo de aminoácido sintético y ARP y la segunda sonda iniciadora
- 35 fraccionaria comprende al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en ADN, ARN, 2'Ome-ARN, ARNL, análogo de ácido nucleico sintético, aminoácido, análogo de aminoácido sintético y ARP.
- En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento o composición en el que la unión denota hibridación.
- En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento o composición en el que la unión denota una interacción selectiva proteína-proteína.
- 40 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento o composición en el que la unión denota una interacción selectiva ácido nucleico-proteína.
- En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento en el que los monómeros de HCR comprenden un sitio de unión a la etiqueta.
- 45 En algunas realizaciones, el procedimiento incluye además: el lavado de la muestra para eliminar los monómeros de horquilla de HCR no polimerizados; la adición de una sonda de etiqueta que comprende un complemento del sitio de unión a la etiqueta y una molécula reportera; el lavado de la sonda de etiqueta no unida; y la detección de la presencia o ausencia de la molécula reportera.
- En algunas realizaciones, se proporciona una composición en la que el primer monómero de horquilla además comprende un sitio de unión a la etiqueta que está configurado para hibridarse con un complemento del sitio de unión

a la etiqueta, en el que el complemento del sitio de unión a la etiqueta además comprende una molécula reportera. En algunas realizaciones, ambos monómeros de horquilla pueden comprender un sitio de unión a la etiqueta. En algunas realizaciones, sólo uno de los monómeros de horquilla comprende un sitio de unión a la etiqueta.

### Breve descripción de los dibujos

- 5 La FIG. 1 representa algunas realizaciones de la amplificación *in situ* por medio de la reacción en cadena de hibridación (HCR).  
 La FIG. 2 representa esquemas de HCR *in situ* mediante el uso de protocolos de dos o tres etapas.  
 La FIG. 3 representa algunas disposiciones para dos secciones diana adyacentes y dos sondas iniciadoras fraccionarias que se hibridan a estas secciones diana adyacentes para colocalizar dos iniciadores fraccionarios.  
 10 La FIG. 4 representa algunas realizaciones de sondas iniciadoras fraccionarias colocalizadas por una molécula diana.  
 La FIG. 5 representa algunas realizaciones de sondas iniciadoras fraccionarias colocalizadas por un complejo diana.  
 La FIG. 6 representa la obtención de imágenes de ARNm diana en embriones de pollo montados en su totalidad mediante el uso de sondas estándar no optimizadas y sondas iniciadoras fraccionarias.  
 15 La FIG. 7 representa algunas formas de desencadenar la HCR mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias y muestra datos de tubos de ensayo que demuestran el desencadenamiento de la HCR mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias colocalizadas por una diana. Sólo se representa una parte de las sondas iniciadoras fraccionarias y no se representa la diana que coordina las dos sondas iniciadoras fraccionarias. I1 denota un iniciador completo formado por dos sondas iniciadoras fraccionarias colocalizadas por una diana.  
 20 La FIG. 8 representa algunas realizaciones de HCR *in situ* mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias.  
 La FIG. 9 representa el fondo y la relación señal/fondo mediante el uso de sondas estándar y sondas iniciadoras fraccionarias.  
 La FIG. 10 representa la imagen multiplexada de la expresión de ARNm con una alta relación señal/fondo en un embrión de pollo fijo y completo mediante el uso de sondas iniciadoras de fracciones sin optimización del conjunto de sondas.  
 25 La FIG. 11 representa la imagen cuantitativa de la expresión de ARNm con resolución subcelular en embriones de pollo fijados y montados en su totalidad mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias.  
 La FIG. 12 representa algunas realizaciones de hibridación de una primera sonda iniciadora fraccionaria y una segunda sonda iniciadora fraccionaria a una molécula diana.  
 30 La FIG. 13 representa algunas realizaciones de autoensamblaje desencadenado de un polímero de amplificación de HCR a partir de monómeros de horquilla tras la iniciación por un iniciador de HCR. 1050 en la FIG. 13 representa un iniciador completo, de dos partes. Sólo se representa una parte de las sondas iniciadoras fraccionarias. I1 (1050) denota un iniciador completo formado por dos sondas iniciadoras fraccionarias colocalizadas por una diana.  
 35 La FIG. 14 representa algunas realizaciones de la amplificación de HCR mediante el uso de monómeros de horquilla activados por un iniciador de HCR. Sólo se representa una parte de las sondas iniciadoras fraccionarias. I1 denota un iniciador completo formado por dos sondas iniciadoras fraccionarias colocalizadas por una diana.  
 La FIG. 15 representa algunas formas de realización de un protocolo de HCR *in situ* de tres etapas que utiliza sondas iniciadoras fraccionarias con monómeros de horquilla que llevan sitios de unión a la etiqueta.  
 40 La FIG. 16 representa algunas realizaciones de un mecanismo de HCR mediante el uso de monómeros de horquilla de HCR simplificados.

### Descripción detallada

La reacción en cadena de hibridación (HCR) es un procedimiento para la hibridación desencadenada de moléculas de ácido nucleico a partir de monómeros de horquilla metaestables u otras estructuras de ácido nucleico metaestables. Véase, por ejemplo, Dirks, R. y Pierce, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(43): 15275 a 15278 (2004), y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 11/087.937, presentada el 22 de marzo de 2005, la Patente de los Estados Unidos Núms. US 8.105.778, 31 de enero de 2012, y 8.507.204, del 13 de agosto de 2013. La HCR no requiere ninguna enzima y puede funcionar de forma isotérmica.

El HCR puede incluir dos o más monómeros de horquilla metaestables. Cada uno de los monómeros de horquilla tiene por lo menos un punto de apoyo monocatenario, un bucle monocatenario y un vástago bicatenario. La energía que impulsa la cascada de autoensamblaje se almacena en los segmentos de bucle monocatenario y en los segmentos de punto de apoyo de las horquillas.

Cada monómero queda atrapado en una trampa cinética, lo que impide que el sistema se equilibre rápidamente. Es decir, los pares de monómeros no se pueden hibridar entre sí en ausencia de un iniciador. La introducción de una hebra iniciadora hace que los monómeros sufran una reacción en cadena de eventos de hibridación para formar un polímero de doble hebra mellado. La HCR se puede utilizar, por ejemplo, para detectar la presencia de un analito de interés en una muestra, por medio de la detección del analito con una sonda que lleva un iniciador de HCR, que a su vez desencadena la amplificación de la señal de HCR. La amplificación de la señal de HCR permite aumentar la relación señal/fondo para aplicaciones de detección molecular y de imagen, al potenciar la señal por encima del fondo procedente de la muestra.

Algunas realizaciones proporcionadas en la presente memoria proporcionan una relación señal/fondo aún mayor mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias que dividen el iniciador de HCR entre dos o más sondas. Si estas sondas individuales se unen de forma inespecífica en la muestra, no activan la HCR. Sin embargo, si se unen específicamente a su diana afín, los iniciadores fraccionarios se colocan para formar un iniciador completo, lo que permite desencadenar la amplificación de la señal de HCR. En algunas realizaciones, la separación del iniciador en partes (dos o más), que sólo se colocan efectivamente en presencia de una diana, proporciona una supresión automática del fondo durante la etapa de detección. Cuando se combina con la supresión de fondo automática proporcionada por el HCR durante la amplificación, el nuevo proceso proporciona una supresión de fondo automática durante todo el protocolo (por ejemplo, si un reactivo, ya sea una sonda individual o un monómero de horquilla individual se une en la muestra, no dará lugar a la generación de fondo amplificado).

Las técnicas anteriores no introdujeron iniciadores fraccionarios (o sondas de los mismos) como mecanismo para lograr la supresión automática del fondo durante la etapa de detección. Como resultado, con las técnicas anteriores, si una sonda que lleva un iniciador de HCR completo se une de forma no específica en la muestra, podría no obstante desencadenar la HCR, lo que genera un fondo amplificado que disminuiría la relación señal/fondo de la medición.

### **Definiciones y realizaciones**

Los "Ácidos Nucleicos", como se utilizan en la presente memoria, incluyen oligómeros de alguna forma de ADN y/o ARN. Los ácidos nucleicos también pueden incluir análogos del ADN o del ARN con modificaciones en las bases o en la columna vertebral. Por ejemplo, el ácido nucleico, como se utiliza en la presente memoria, incluye el uso de ácidos nucleicos peptídicos (PNA). El término "ácidos nucleicos" también incluye las moléculas quiméricas. La frase incluye construcciones artificiales, así como derivados, etc. La frase incluye, por ejemplo, uno o más de ADN, ARN, 2'Ome-ARN, ARNL, análogo de ácido nucleico sintético y ARNP.

El término "extremo pegajoso" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que está disponible para hibridarse con una secuencia de ácido nucleico complementaria. La estructura secundaria del "extremo pegajoso" es tal que el extremo pegajoso está disponible para hibridarse con un ácido nucleico complementario bajo las condiciones de reacción apropiadas sin sufrir un cambio conformacional. Normalmente, el extremo pegajoso es un ácido nucleico monocatenario.

Los "monómeros" son oligómeros individuales de ácido nucleico. Típicamente, se utilizan al menos dos monómeros en las reacciones de hibridación en cadena, aunque se pueden utilizar tres, cuatro, cinco, seis o más monómeros. Típicamente, cada monómero comprende al menos una región que es complementaria a al menos otro monómero que se utiliza para la reacción HCR.

La composición puede incluir un primer monómero de horquilla (1510), que comprende: a) un primer dominio de entrada (1852), que comprende un primer punto de apoyo (1851) y una primera sección de vástago, b) un primer dominio de salida (1854), que comprende un primer bucle de horquilla (1853) y un complemento de la primera sección de vástago, y c) una primera molécula reportera (1850). La composición puede incluir además un segundo monómero de horquilla (1610), que comprende: a) un segundo dominio de entrada (1952), que comprende un segundo punto de apoyo (1951) y una segunda sección de vástago, b) un segundo dominio de salida (1954), que comprende un segundo bucle de horquilla (1953) y un complemento de la segunda sección de vástago, y c) una segunda molécula reportera (1950).

En algunas realizaciones, los monómeros son "metaestables". Es decir, en ausencia de un iniciador están cinéticamente desfavorecidos para asociarse con otros monómeros que comprenden regiones complementarias. Los monómeros "HCR" son monómeros capaces de ensamblarse tras la exposición a un ácido nucleico iniciador para formar un polímero.

Como se utiliza en la presente memoria, la "polimerización" se refiere a la asociación de dos o más monómeros para formar un polímero. El "polímero" puede comprender enlaces covalentes, enlaces no covalentes o ambos. Por ejemplo, en algunas realizaciones dos especies de monómeros son capaces de hibridarse en un patrón alterno para formar un polímero que comprende un polímero de doble cadena mellada. Los polímeros también se denominan en la presente memoria como "productos de HCR".

Un "iniciador completo" proviene de la combinación de dos o más iniciadores fraccionarios que, cuando se colocan, son capaces de iniciar la polimerización de HCR. Algunos iniciadores comprenden una región de ácido nucleico que es complementaria a la región del complemento del iniciador de un monómero de HCR. Un iniciador fraccionario es aquel que, por sí solo, no es suficiente para desencadenar la polimerización de HCR, pero que, cuando se coloca con uno (o más) de otros iniciadores fraccionarios para formar un iniciador completo, puede desencadenar la polimerización de HCR.

Los siguientes términos, en la Tabla 1, se indican como opciones alternativas (que pueden variar en amplitud dependiendo del contexto) para los términos utilizados en la presente memoria. La divulgación del término más amplio no sólo denota el concepto más amplio, sino también el más estrecho.

TABLA 1

|                                     |                                         |
|-------------------------------------|-----------------------------------------|
| Sonda iniciadora dividida           | Sonda iniciadora fraccionaria           |
| Secuencia de unión a la diana       | Sección de unión a la diana             |
| Subsecuencia proximal               | Sección diana                           |
| Sitio diana proximal cognitivo      | Sección diana                           |
| Región de unión a la diana          | Sección de unión a la diana             |
| Iniciador de HCR 11                 | Iniciador de HCR completo               |
| Horquilla H1                        | Primer Monómero de Horquilla            |
| Horquilla H2                        | Segundo Monómero de Horquilla           |
| Horquilla de HCR                    | Monómero de Horquilla                   |
| Par de sondas iniciadoras divididas | Par de sondas iniciadoras fraccionarias |
| Sitio diana cognitivo               | Sección diana                           |
| Iniciador I1                        | Iniciador de HCR completo               |
| Sonda 1                             | Primera sonda iniciadora fraccionaria   |
| Sonda 2                             | Segunda sonda iniciadora fraccionaria   |

Los títulos de las secciones utilizados en la presente memoria son sólo para fines de organización y no se deben interpretar como una limitación de la materia descrita de ninguna manera. Se apreciará que hay un "aproximadamente" implícito antes de las temperaturas, concentraciones, tiempos, etc. discutidos en las presentes enseñanzas, de forma que las desviaciones leves e insustanciales están dentro del alcance de las enseñanzas de la presente memoria. En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Asimismo, el uso de "comprender", "comprende", "que comprende", "contener", "contiene", "que contiene", "incluir", "incluye" e "que incluye" no pretende ser limitativo. Se debe entender que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada que sigue son solamente ejemplares y explicativas y no son restrictivas. A menos que se definan de otro modo, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que los entendidos comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Véase, por ejemplo Singleton *et al.*, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 2da ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994) Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, N.Y. 1989). Se debe entender que tanto la descripción general como la descripción detallada son sólo ejemplares y explicativas y no son restrictivas de la invención como se reivindica. En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluyen", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitativo. Asimismo, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto los elementos y componentes que comprenden una unidad como los elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario. Asimismo, el uso del término "porción" puede incluir parte de una fracción o la totalidad de la misma.

### **Composiciones**

Algunas realizaciones de las composiciones se describen en las FIGs. 12 y 13, así como otras figuras proporcionadas en la presente memoria. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende una primera sonda iniciadora fraccionaria (1190) que comprende un primer iniciador fraccionario (1151), y una segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290) que comprende un segundo iniciador fraccionario (1251). En algunas realizaciones, el primer y el segundo iniciador fraccionario (1151, 1251) forman juntos un iniciador completo (1050), a partir del cual puede progresar la HCR, a través del primer y el segundo monómero de horquilla ((1510, 1610). En algunas realizaciones, la primera sonda iniciadora fraccionaria (1190) además comprende una primera sección de unión a la diana (1141) y la segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290) además comprende una segunda sección de unión a la diana (1241), en la que la primera sección de unión a la diana (1141) está configurada para unirse a una primera sección de diana (1100) y la segunda sección de unión a la diana (1241) está configurada para unirse a una segunda sección de diana

(1200). Estas secciones de unión a la diana están localizadas efectivamente adyacentes en la molécula diana, de forma que cuando ambas sondas iniciadoras fraccionarias están unidas a ambas dianas, el primer y el segundo iniciador fraccionario (dentro de las sondas iniciadoras fraccionarias) están lo suficientemente cerca como para formar un iniciador completo (1050), a partir del cual puede ocurrir la HCR. En algunas realizaciones, estas sondas iniciadoras fraccionarias se pueden suministrar como un kit, junto con monómeros de horquilla para la polimerización de HCR.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende un primer monómero de horquilla (1510), un segundo monómero de horquilla (1610), una primera sonda iniciadora fraccionaria (1190) que comprende un primer iniciador fraccionario (1151), y una segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290) que comprende un segundo iniciador fraccionario (1251). En algunas realizaciones, el primer y el segundo iniciador fraccionario (1151, 1251) forman juntos un iniciador completo (1050), a partir del cual puede progresar la HCR, a través del primer y el segundo monómero de horquilla (1510, 1610).

En algunas realizaciones, las sondas iniciadoras fraccionarias y los monómeros de horquilla se pueden introducir en la misma muestra al mismo tiempo. En algunas realizaciones, las sondas iniciadoras fraccionarias se pueden introducir en la muestra, seguidas por un lavado, y luego los monómeros de horquilla se pueden introducir en la muestra, seguidos por un lavado. En algunas realizaciones, las sondas iniciadoras fraccionarias y los monómeros de horquilla se pueden introducir en la muestra en momentos diferentes.

En algunas realizaciones, uno o más de los monómeros de horquilla pueden incluir una molécula reportera, de forma que la polimerización de los monómeros de horquilla (primero y segundo, y opcionalmente más), dará lugar a un evento de señalización que es detectable. En algunas realizaciones, la molécula reportera puede estar asociada covalentemente con el/los monómero(s) de la horquilla. En algunas realizaciones, la molécula reportera se puede unir posteriormente al polímero de HCR después de la polimerización (por ejemplo, en un evento de hibridación posterior). En algunas realizaciones, el primer monómero de horquilla (1510) comprende un sitio de unión a la etiqueta (no representado) que está configurado para hibridarse con un complemento del sitio de unión a la etiqueta (no representado). En algunas realizaciones, el complemento del sitio de unión a la etiqueta además comprende una molécula reportera.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye un primer monómero de horquilla (1510), que comprende: a) un primer dominio de entrada (1852), que comprende un primer punto de apoyo (1851) y una primera sección de vástago (1755), b) un primer dominio de salida (1854), que comprende un primer bucle de horquilla (1853) y un complemento de la primera sección de vástago (1756), y c) una primera molécula reportera (1850). La composición puede incluir además un segundo monómero de horquilla (1610), que comprende: a) un segundo dominio de entrada (1952), que comprende un segundo punto de apoyo (1951) y una segunda sección de vástago (1855), b) un segundo dominio de salida (1954), que comprende un segundo bucle de horquilla (1953) y un complemento de la segunda sección de vástago (1856), y c) una segunda molécula reportera (1950). La composición puede incluir además a) una primera sonda iniciadora fraccionaria (1190) que comprende un primer iniciador fraccionario (1151), y b) una segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290) que comprende un segundo iniciador fraccionario (1251). Como se ha indicado anteriormente, el primer y el segundo monómero de horquilla se pueden introducir en la muestra junto con la primera y la segunda sonda iniciadora fraccionaria o por separado. En algunas realizaciones, los monómeros se pueden proporcionar juntos, pero separados de la primera y la segunda sonda iniciadora fraccionaria. En algunas realizaciones, los monómeros de horquilla y las sondas iniciadoras fraccionarias se pueden introducir en la misma muestra al mismo tiempo. En algunas realizaciones, los monómeros de horquilla y las sondas iniciadoras fraccionarias se pueden introducir en la misma muestra, pero en tiempos diferentes y no superpuestos (con un lavado para eliminar las moléculas no unidas).

En algunas realizaciones, la primera sección de vástago tiene la misma secuencia que la segunda sección de vástago. En algunas realizaciones, el complemento de la primera sección de vástago tiene la misma secuencia que el complemento de la segunda sección de vástago. En algunas realizaciones, el complemento de la primera sección de vástago tiene la misma secuencia que el complemento de la segunda sección de vástago, y la primera sección de vástago tiene la misma secuencia que la segunda sección de vástago. En algunas realizaciones, la secuencia del punto de apoyo de los dos monómeros de horquilla es la misma y la secuencia del bucle de los dos monómeros de horquilla es la misma (aunque la polaridad de los dos monómeros de horquilla está invertida, por lo que los dos monómeros de horquilla no son idénticos).

En algunas realizaciones, el primer punto de apoyo (1851) es complementario al segundo bucle de horquilla. En algunas realizaciones, el segundo punto de apoyo es complementario al primer bucle de horquilla. En algunas realizaciones, esta circularidad permite que se produzca la reacción en cadena de hibridación. En algunas realizaciones, el primer punto de apoyo no es 100% complementario al segundo bucle de horquilla, pero es suficiente para permitir la hibridación.

En algunas realizaciones, se pueden emplear más de dos dominios de entrada diferentes, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 100, 1000, 2000, 4000 o más dominios de entrada. En algunas realizaciones, se puede utilizar un número correspondiente de subpartes para cada dominio de entrada.

En algunas realizaciones, cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria comprende una molécula

- diana (1020) que comprende una primera sección diana (1100) y una segunda sección diana (1200) (como se muestra, por ejemplo, en la FIG. 12). En algunas realizaciones, la molécula diana comprende secciones diana adicionales, por ejemplo, tres secciones diana, cuatro secciones diana, cinco secciones diana, seis secciones diana, siete secciones diana o más (por ejemplo, 10, 50, 100, etc.). En algunas realizaciones, el número de secciones diana significará que hay un número correspondiente de secciones de unión a la diana (por ejemplo, 1141, 1241). En algunas realizaciones, esto permite una mayor especificidad/selectividad para la formación inicial del iniciador completo (dado que requiere que más secciones de unión a la diana se unan a las secciones diana). En algunas realizaciones, esto permite ensayar en paralelo más de una secuencia diana a la vez (para de ese modo permitir ensayar múltiples dianas a la vez, cada una de ellas con dos o más secciones de unión a la diana/sondas iniciadoras fraccionarias).
- En algunas realizaciones, cualquiera de las primeras sondas iniciadoras fraccionarias (1190) descritas en la presente memoria además comprende una primera sección de unión a la diana (1141) y cualquiera de las segundas sondas iniciadoras fraccionarias (1290) descritas en la presente memoria además comprende una segunda sección de unión a la diana (1241). En algunas realizaciones, la primera sección de unión a la diana (1141) está configurada para unirse a la primera sección diana (1100). En algunas realizaciones, la segunda sección de unión a la diana (1241) está configurada para unirse a la segunda sección diana (1200). En algunas realizaciones, la primera y la segunda sonda iniciadora fraccionaria comprenden secciones de unión a la diana adicionales, por ejemplo, dos secciones de unión a la diana, tres secciones de unión a la diana, cuatro secciones de unión a la diana, cinco secciones de unión a la diana, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 1000, 10.000, o más.
- En algunas realizaciones, la primera sección de unión a la diana está configurada para unirse a la primera sección diana a través de interacciones selectivas proteína-proteína (tal como a través de un anticuerpo como la primera sección de unión a la diana). En algunas realizaciones, la primera sección de unión a la diana está configurada para unirse a la primera sección diana a través de interacciones selectivas ácido nucleico-proteína (tal como un aptámero como la primera sección de unión a la diana). En algunas realizaciones, la segunda sección de unión a la diana está configurada para unirse a la segunda sección diana a través de interacciones selectivas proteína-proteína (tal como por medio de un anticuerpo como la segunda sección de unión a la diana). En algunas realizaciones, la segunda sección de unión a la diana está configurada para unirse a la segunda sección diana a través de interacciones selectivas ácido nucleico-proteína (tal como un aptámero como la segunda sección de unión a la diana). En algunas realizaciones, la primera sección de unión a la diana está configurada para unirse a la primera sección diana por medio de hibridación. En algunas realizaciones, la segunda sección de unión a la diana está configurada para unirse a la segunda sección diana por medio de hibridación. En algunas realizaciones, la primera sección de unión a la diana está configurada para unirse a la primera sección diana a través de la unión covalente o la unión iónica. En algunas realizaciones, la segunda sección de unión a la diana está configurada para unirse a la segunda sección diana a través de un enlace covalente o iónico.
- En algunas realizaciones, se puede emplear cualquier molécula reportera cuya presencia o ausencia pueda ser monitoreada. En algunas realizaciones, la molécula reportera comprende una molécula fluorescente, tal como un fluorocromo, o un compuesto colorimétrico, que permite visualizar los polímeros resultantes. En algunas realizaciones, la molécula reportera es directamente observable. En algunas realizaciones, la molécula reportera es observable indirectamente. En algunas realizaciones, la molécula reportera comprende una enzima o es enzimática, y/o puede mediar la señalización enzimática después de la polimerización del HCR. En algunas realizaciones, la presentación de informes se logra por medio de la deposición catalizada del reportero ("CARD"). En algunas realizaciones, un sitio de unión a la etiqueta en cada monómero de horquilla puede proporcionar la unión de un complemento al sitio de unión a la etiqueta, en el que el complemento al sitio de unión a la etiqueta lleva una molécula reportera. En algunas realizaciones, un tipo de molécula reportera transportada por los monómeros de horquilla o el complemento del sitio de unión a la etiqueta puede mediar la amplificación de la señal enzimática (CARD) después de la polimerización de HCR) de forma que un segundo tipo de moléculas reporteras depositadas en la vecindad de los polímeros HCR/moléculas diana serán entonces detectadas. En algunas realizaciones, la molécula reportera es al menos una de las moléculas luminiscentes, moléculas FRET, pares moleculares fluorocromo/secuenciador u otros marcadores detectables. En algunas realizaciones, la molécula reportera puede permitir que se emplee una molécula secundaria (tal como un anticuerpo secundario) para la detección del evento de polimerización. En algunas realizaciones, los monómeros de horquilla pueden ser etiquetados con moléculas reporteras (por ejemplo, un fluorocromo y un inactivador) de forma que los monómeros de horquilla se inactivan pero el cambio de conformación que se produce durante la polimerización de HCR conduce a polímeros de amplificación de HCR fluorescentes.

### **Procedimientos**

- En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento. El procedimiento comprende (i) proporcionar una primera sonda iniciadora fraccionaria, (1190) una segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290), un primer monómero de horquilla (1510), un segundo monómero de horquilla (1610), y una molécula diana (1020) (ii) incubar para permitir la unión, y (iii) detectar una señal.
- En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento para llevar a cabo HCR. El procedimiento comprende (i) añadir un primer iniciador fraccionario (1151) y un segundo iniciador fraccionario (1251) a una muestra, en la que juntos el primer iniciador fraccionario (1151) y el segundo iniciador fraccionario (1251) proporcionan un iniciador de HCR completo y (ii) añadir un conjunto de monómeros de horquilla de HCR a la muestra para permitir que se produzca

la HCR en presencia del iniciador de HCR completo. El conjunto de monómeros de horquilla de HCR está configurado para polimerizar por medio de HCR.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento. El procedimiento comprende (a) proporcionar: I. una primera sonda iniciadora fraccionaria (1190) que comprende un primer iniciador fraccionario (1151), II. una segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290) que comprende un segundo iniciador fraccionario (1251). El procedimiento puede comprender además proporcionar III. un primer monómero de horquilla (1510), que comprende: a. un primer dominio de entrada (1852), que comprende un primer punto de apoyo (1851) y una primera sección de vástago (1755), b. un primer dominio de salida (1854), que comprende un primer bucle de horquilla (1853) y un complemento de la primera sección de vástago (1756), y c. una primera molécula reportera (1850). Se proporciona además IV. un segundo monómero de horquilla (1610), que comprende: a. un segundo dominio de entrada (1952), que comprende un segundo punto de apoyo (1951) y una segunda sección de vástago (1855), b. un segundo dominio de salida (1954), que comprende un segundo bucle de horquilla (1953) y un complemento de la segunda sección de vástago (1856), y c. una segunda molécula reportera (1950). Además, se proporciona V. una molécula diana (1020). El procedimiento además comprende (b) incubar la primera sonda iniciadora fraccionaria proporcionada y la segunda sonda iniciadora fraccionaria con una diana. Como se indica en la presente memoria, las sondas iniciadoras fraccionarias pueden incluir además secciones de unión a la diana, para colocalizar dos iniciadores fraccionarios y de ese modo formar el iniciador completo.

En algunas realizaciones, las sondas iniciadoras fraccionarias se pueden añadir inicialmente a la muestra que puede incluir una diana y luego la solución a granel se lava, manteniendo las sondas iniciadoras fraccionarias unidas, y luego los monómeros de horquilla se pueden añadir de forma que las sondas iniciadoras fraccionarias que están específicamente unidas a la diana colocalicen los iniciadores fraccionarios y desencadenen la HCR, pero las sondas iniciadoras fraccionarias individuales que están unidas de manera no específica no colocalizarán un iniciador completo y no desencadenarán la HCR.

En cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria, se puede detectar y/o ensayar cualquiera de los siguientes elementos: moléculas, moléculas de ADN, moléculas de ARN, moléculas de proteínas, moléculas pequeñas, moléculas sintéticas o complejos de moléculas. En algunas realizaciones, la diana es más de una diana, tal como un complejo de proteínas, o un complejo de una proteína y un ácido nucleico, etc. Por lo tanto, la asociación de proteínas se puede ensayar por medio del presente enfoque de iniciador fraccionario. En algunas realizaciones, también se pueden ensayar materiales inorgánicos o no orgánicos. En algunas realizaciones, se puede detectar cualquier diana, siempre que haya una sección de unión a la diana correspondiente que se pueda unir a la diana que pueda formar parte de la sonda iniciadora fraccionaria. En algunas realizaciones, la diana es cualquier molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la diana es una proteína. En algunas realizaciones, la diana consiste en al menos una de las siguientes: ARNm, ARNm, ARNi, ARNr, ARN no codificante o ADN genómico. En algunas realizaciones, la diana está compuesta por una secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, la diana está compuesta por un complejo de moléculas. En algunas realizaciones, la diana es al menos uno de: Moléculas o complejos diana de ADN, ARN, proteínas o moléculas pequeñas *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. En algunas realizaciones, la diana es un complejo de moléculas que está formado por al menos uno de: Moléculas diana de ADN, ARN, proteínas o moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, la diana comprende una molécula o un complejo *in vitro*, *in situ* o *in vivo*.

En algunas realizaciones, la molécula diana puede ser un complejo de moléculas de forma que cuando los sitios de unión a la diana dentro de un par de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) se unen específicamente a sus sitios diana dentro del complejo, las dos mitades del iniciador de HCR se ponen en proximidad, de forma que el iniciador completo se vuelve capaz de iniciar la amplificación de la señal de HCR. La Figura 5 ilustra la detección de un complejo diana mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) (panel a), la detección de un complejo diana de ácidos nucleicos mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) de ácidos nucleicos (panel b), la detección de un complejo diana de proteínas mediante el uso de sondas de anticuerpos de iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido) (panel c), detección de un complejo diana de proteínas mediante el uso de sondas de anticuerpos primarios y sondas de anticuerpos secundarios con iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido) (panel d), detección de un complejo diana de proteínas/ácidos nucleicos mediante el uso de sondas de anticuerpos y ácidos nucleicos con iniciador dividido (panel e).

En algunas realizaciones, cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria se puede utilizar como parte de un proceso *in situ* para obtener imágenes de dianas de ADN, ARN, proteínas o moléculas pequeñas, que incluyen la hibridación *in situ* de ADN (ISH), la hibridación *in situ* de ARN (ISH) o la inmunohistoquímica de proteínas (IHC).

En algunas realizaciones, cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria además comprende la aplicación de uno o más de los componentes a una diana. En algunas realizaciones, la diana está hidratada. En algunas realizaciones, la diana está en una solución, pero puede ser inmovilizada a un soporte sólido. En algunas realizaciones, la diana está en una solución. En algunas realizaciones, la diana se inmoviliza en una perla u otro soporte. En algunas realizaciones, el soporte es una malla o un gel o una superficie rígida. En algunas realizaciones, la diana no está inmovilizada. En algunas realizaciones, la detección se produce *in vivo*, *in vitro* o *in situ*. En algunas

realizaciones, se proporciona un procedimiento de HCR que comprende un procedimiento *in vitro* en el que la diana se inmoviliza en una perla o microarray. En algunas realizaciones, la diana se inmoviliza en una perla. En algunas realizaciones, la diana se inmoviliza en un microarray. En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de HCR que comprende un procedimiento *in vivo* o *in vitro* en el que la diana no está inmovilizada. En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de HCR que comprende un procedimiento *in vivo* o *in vitro* en el que se inmoviliza la diana.

En algunas realizaciones, la incubación resulta en la unión de la primera sonda iniciadora fraccionaria (1190) a la molécula diana y en la unión de la segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290) a una molécula diana. La molécula diana puede ser una sola molécula o múltiples moléculas asociadas. En algunas realizaciones, la incubación se produce a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, la incubación se produce a 4 °C. En algunas realizaciones, la incubación se produce a 37 °C. En algunas realizaciones, la incubación se produce a 45 °C. En algunas realizaciones, la incubación se produce a 50 °C. En algunas realizaciones, la incubación se produce a 55 °C. En algunas realizaciones, la incubación se produce a 60 °C. En algunas realizaciones, la incubación comprende un período de incubación de al menos 1 minuto, por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos o 1 hora. En algunas realizaciones, el período de incubación es superior a 1 hora, por ejemplo, 2 horas, 4 horas, 12 horas, 16 horas o 24 horas. En algunas realizaciones, la incubación se produce en un tampón de hibridación que contiene 0% de formamida. En algunas realizaciones, la incubación se produce en un tampón de hibridación que comprende formamida. En algunas realizaciones, la concentración porcentual de formamida está entre el 1% y el 80%, por ejemplo, entre el 10% y el 70%, o entre el 30% y el 60%. En algunas realizaciones, el tampón de hibridación comprende ácido cítrico. En algunas realizaciones, la concentración molar de ácido cítrico está entre 1nM y 30nM, por ejemplo, entre 5nM y 15nM o entre 8nM y 12nM. En algunas realizaciones, el tampón de hibridación comprende Tween. En algunas realizaciones, la concentración porcentual de Tween está entre el 0% y el 1,0%, por ejemplo, entre el 0,05% y el 0,5%. En algunas realizaciones, el tampón de hibridación comprende heparina. En algunas realizaciones, la concentración de heparina está entre 20µg/mL y 80µg/mL, por ejemplo, entre 30µg/mL y 70 µg/mL, por ejemplo, entre 40µg/mL y 60µg/mL. En algunas realizaciones, el tampón de hibridación comprende una solución de Denhardt. En algunas realizaciones, el tampón de hibridación comprende sulfato de dextrano. En algunas realizaciones, la concentración porcentual de sulfato de dextrano está entre el 1% y el 60%, por ejemplo, entre el 40% y el 60%.

En algunas realizaciones el primer iniciador fraccionario (1151) de cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria es parte de una primera sonda iniciadora fraccionaria (1190) y el segundo iniciador fraccionario (1251) es parte de una segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290). En algunas realizaciones, la primera sonda iniciadora fraccionaria (1190) además comprende una primera sección de unión a la diana (1141) y la segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290) además comprende una segunda sección de unión a la diana (1241). En algunas realizaciones, la primera sección de unión a la diana (1141) está configurada para unirse de forma adyacente a la segunda sección de unión a la diana (1241) en una diana, cuando la primera sonda iniciadora fraccionaria (1190) y la segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290) están ambas unidas específicamente a una diana (1020).

Si bien el término "adyacente" se utiliza para la unión de la primera y la segunda sonda iniciadora fraccionaria (y/o las secciones de unión a la diana primera y segunda), la unión no tiene por qué ser inmediatamente adyacente, siempre que la primera y la segunda sonda iniciadora estén lo suficientemente cerca entre sí para formar un iniciador completo capaz de desencadenar la HCR. En algunas realizaciones, la primera sección de unión a la diana se une al menos dentro de 10 aminoácidos de la segunda sección de unión a la diana, por ejemplo dentro de 5 aminoácidos o dentro de 1 aminoácido. En algunas realizaciones, la primera sección de unión a la diana se une al menos dentro de 10 nucleótidos de la segunda sección de unión a la diana, por ejemplo dentro de 5 nucleótidos o dentro de 1 nucleótido. En algunas realizaciones, la primera y la segunda sondas iniciadoras fraccionarias (y/o la primera y la segunda secciones de unión a la diana), están a una distancia de 2, 5, 10, 50, 100, 1000, Angstroms entre sí. En algunas realizaciones, la primera y la segunda sonda iniciadora fraccionaria pueden incluir espaciadores, para dejar más espacio entre las dos secciones diana. Dichos espaciadores podrían incluir una secuencia de ácido nucleico adicional, a fin de proporcionar más flexibilidad para la ubicación de la primera y la segunda (o las adicionales) secciones diana. En algunas realizaciones, cada sección diana está lo suficientemente próxima a la otra para permitir que los dos o más iniciadores fraccionarios coloquen un iniciador completo.

En algunas realizaciones, la primera sonda iniciadora fraccionaria (1190) comprende más de una sección de unión a la diana, por ejemplo, dos secciones de unión a la diana, tres secciones de unión a la diana, cuatro secciones de unión a la diana o cinco secciones de unión a la diana. Esto puede permitir el ensayo de múltiples dianas posibles a la vez. En algunas realizaciones, la primera sonda iniciadora fraccionaria (1190) comprende más de cinco secciones de unión a la diana. En algunas realizaciones, la segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290) comprende más de una sección de unión a la diana, por ejemplo, dos secciones de unión a la diana, tres secciones de unión a la diana, cuatro secciones de unión a la diana o cinco secciones de unión a la diana. En algunas realizaciones, la segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290) comprende más de cinco secciones de unión a la diana.

En algunas realizaciones, la sección de unión a la diana (por ejemplo, la región) dentro de cada uno de los pares de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) puede estar hecha de ADN, ARN, 2'OMe-ARN, ARNP, aminoácidos, o cualquier análogo de ácido nucleico sintético, o cualquier análogo de aminoácido sintético. La Figura 4 ilustra la detección de una molécula diana mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) (panel a), la detección de un ARNm diana mediante el uso de sondas de

ácido nucleico de iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido) (panel b), la detección de una proteína diana mediante el uso de sondas de anticuerpos de iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido) (panel c), y la detección de una proteína diana mediante el uso de una sonda de anticuerpo primario y sondas de anticuerpo secundario de iniciador dividido (panel d). En cada caso, la unión selectiva de la pareja de sondas a la molécula diana afín colocaliza las dos mitades del iniciador de HCR completo, lo que desencadena el crecimiento de un polímero de amplificación de HCR anclado. La molécula diana puede ser una proteína o una molécula pequeña, de forma que cuando los sitios de unión a la diana dentro del par de sondas del iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido) se unen específicamente a sus sitios diana en la proteína o molécula pequeña, las dos mitades del iniciador de HCR se acercan, de forma que el iniciador completo es capaz de iniciar la amplificación de la señal de HCR.

En algunas realizaciones, los monómeros de horquilla de HCR pueden ser etiquetados con moléculas reporteras que no son fluorescentes (por ejemplo, elementos de tierras raras isotópicamente puros, cromóforos, etc.).

Para el Esquema E, cada sonda dentro de un par de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) contiene un sitio de unión a la diana y la mitad de un iniciador de HCR de forma que cuando las sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) se emparejan en base específicamente a sus secciones diana (por ejemplo, esta funcionalidad se puede lograr por medio de la disposición de los sitios de unión a la diana y los fragmentos del iniciador dentro del par de sondas del iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido) en una variedad de configuraciones (Figura 3).

En algunas realizaciones, el iniciador de HCR dentro de un par de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) puede ser dividido entre dos sondas (no necesariamente mitad y mitad) de forma que la amplificación de HCR sólo se inicia si ambas sondas son proximales.

En algunas realizaciones, el iniciador de HCR se puede dividir entre dos o más sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido).

En algunas realizaciones, el ARNm diana se puede detectar mediante el uso de un conjunto de sondas iniciadoras fraccionarias (o conjunto de sondas) que contiene uno o más pares de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido); cada par de sondas contiene sitios de unión a la diana que se dirigen a diferentes subsecuencias del ARNm diana. Dentro de un conjunto de sondas iniciadoras fraccionarias, cada par de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) se colocaliza para formar la misma secuencia de iniciador de HCR, para de este modo permitir el crecimiento simultáneo de polímeros de amplificación de HCR a partir de múltiples pares de sondas unidas al mismo ARNm diana.

En algunas realizaciones, la molécula diana puede ser un ARNm, un ARNm<sub>i</sub>, un ARN<sub>ic</sub>, un ARN<sub>r</sub>, ADN genómico o cualquier molécula de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, el iniciador que se divide entre las dos sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) dentro de un par podría estar hecho de ADN, ARN, 2'OMe-ARN, PNA, o cualquier polímero sintético capaz de iniciar la amplificación de HCR.

En algunas realizaciones, cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria comprende la adición de más de un primer iniciador fraccionario (1151) y un segundo iniciador fraccionario (1251), por ejemplo, la adición de 10, 20, 50, 100, 1000, 10.000, etc.

En algunas realizaciones, cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria puede comprender un enfoque de 2 etapas con un lavado después de cada etapa. En algunas realizaciones, la diana está inmovilizada y/o la muestra está fijada. En algunas realizaciones, la primera etapa es una etapa de detección que comprende la unión de la(s) sonda(s) iniciadora(s) fraccionada(s) a una diana y el lavado de la(s) sonda(s) iniciadora(s) fraccionada(s) no unida(s) y la segunda etapa es una etapa de amplificación en la que se produce la amplificación de HCR. A continuación se pueden lavar los monómeros de HCR no polimerizados (tales como los monómeros de horquilla). En algunas realizaciones, hay más de un lavado después de cada etapa, por ejemplo, dos lavados, tres lavados, cuatro lavados o cinco lavados. En algunas realizaciones, el procedimiento de HCR comprende una sola etapa sin lavados.

En algunas realizaciones, los monómeros de horquilla de HCR comprenden un sitio de unión a la etiqueta, en lugar de incorporar directamente una molécula reportera en el propio monómero de horquilla. En algunas realizaciones, cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria además comprende el lavado de la muestra para eliminar los monómeros de horquilla de HCR no polimerizados, la adición de una sonda de etiqueta que comprende un complemento del sitio de unión a la etiqueta y una molécula reportera; el lavado de la sonda de etiqueta no unida, y la detección de la presencia o ausencia de la molécula reportera. En algunas realizaciones, la sonda de etiqueta es una molécula de horquilla que comprende, además, un par fluorocromo/amortiguador, de forma que el fluorocromo se inactiva cuando el monómero de horquilla está cerrado, pero cuando la sonda de etiqueta se une al sitio de unión a la etiqueta en un polímero de HCR, el fluorocromo no se inactiva. En algunas realizaciones, la sonda de etiqueta es un dúplex con una hebra que lleva un fluorocromo y la otra hebra que lleva un inactivador de forma que cuando la sonda de etiqueta se une al sitio de unión a la etiqueta en un polímero de HCR, la hebra etiquetada con inactivador se desplaza y la hebra etiquetada con fluorocromo se une al sitio de unión a la etiqueta en el polímero de HCR. En

algunas realizaciones, los monómeros de horquilla llevan un reportero que es una parte de un par FRET, y la sonda de etiqueta lleva la otra parte de un par FRET, de forma que tras la unión de la sonda de etiqueta al sitio de unión a la etiqueta en un polímero de HCR, las dos partes del par FRET se ponen en proximidad y pueden sufrir FRET. En algunas realizaciones, la eliminación del monómero de horquilla de HCR no polimerizado a través del lavado da como resultado la eliminación de más del 50% de los monómeros de horquilla de HCR no polimerizados, por ejemplo, más del 55%, más del 60%, más del 65%, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 99%, más del 99,9%, más del 99,99%, más del 99,999% o más del 99,9999999%.

En algunas realizaciones, cualquiera de los lavados proporcionados en la presente memoria puede dar lugar a la eliminación de más del 50% del iniciador fraccionario (y/o la sonda iniciadora fraccionaria), por ejemplo, más del 55%, más del 60%, más del 65%, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 99%, más del 99,9%, más del 99,99%, más del 99,999% o más del 99,9999999%.

En algunas realizaciones, un lavado resulta en la eliminación de al menos 50 a 99% de las sondas que no están unidas específicamente a la diana. En algunas realizaciones, el lavado resulta en la eliminación de más del 50% de las sondas, por ejemplo, más del 55%, más del 60%, más del 65%, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, o más del 95%, más del 99%, más del 99,9%, más del 99,99%, más del 99,999%, o más del 99,9999999%.

Cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria puede comprender además un primer lavado. En algunas realizaciones, el primer lavado elimina la primera sonda iniciadora fraccionaria no unida (1190) y la segunda sonda iniciadora fraccionaria no unida (1290) de una muestra que contiene una primera molécula diana. En algunas realizaciones, tras el primer lavado, la primera y la segunda sonda iniciadora colocadas en las moléculas diana se unen al primer monómero de horquilla (1510), que a su vez se une al segundo monómero de horquilla (1610), lo que da lugar a la amplificación de HCR. En algunas realizaciones, tras el primer lavado, los monómeros de horquilla no ligados son lavados de la muestra. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende lavados adicionales, por ejemplo 2 lavados, 3 lavados, 4 lavados, 5 lavados, 6 lavados o 7 lavados. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende más de 7 lavados.

En algunas realizaciones, un iniciador fraccionario puede tener una longitud de 1 a 1000 nucleótidos, por ejemplo, de 10 a 80, de 10 a 60, de 10 a 50, de 20 a 50, de 20 a 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, puede ser de cualquier longitud funcional.

En algunas realizaciones, cada sección diana puede tener una longitud de 1 a 1000 nucleótidos, por ejemplo, de 10 a 80, de 10 a 60, de 10 a 50, de 20 a 50, de 20 a 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, puede ser de cualquier longitud funcional.

En algunas realizaciones, cada sección de unión a la diana puede tener una longitud de 1 a 1000 nucleótidos, por ejemplo, de 10 a 80, de 10 a 60, de 10 a 50, de 20 a 50, de 20 a 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, puede ser de cualquier longitud funcional. En algunas realizaciones, la sección de unión a la diana y/o la sección diana no son ácidos nucleicos, y por lo tanto pueden ser proteínas, etc., como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, las secciones de unión a la diana pueden ser cada una de átomos individuales hasta cientos de kDa (por ejemplo, anticuerpos, etc.) o más grandes.

En algunas realizaciones, cada iniciador completo puede ser tan largo como la suma de los iniciadores fraccionarios que forman el iniciador completo. En algunas realizaciones, cada iniciador fraccionario puede ser aproximadamente  $\frac{1}{2}$  del tamaño del iniciador completo. En algunas realizaciones, el tamaño fraccionario del iniciador fraccionario depende del número de iniciadores fraccionarios para completar el iniciador completo. De este modo, cuando se emplean 2, 3, 4, 5, etc. iniciadores fraccionarios en un solo iniciador completo, entonces  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{5}$ , etc. del iniciador estará presente en cada iniciador fraccionario. En algunas realizaciones, el tamaño del iniciador no necesita ser dividido uniformemente para cada iniciador fraccionario. El tamaño del iniciador completo es adecuado para permitir que la HCR se produzca a través del iniciador completo.

En algunas realizaciones, cualquiera de los procedimientos y/o composiciones descritos en la presente memoria comprenden la adición de al menos una sonda iniciadora fraccionaria adicional, por ejemplo, la adición de tres iniciadores fraccionarios, la adición de cuatro iniciadores fraccionarios, la adición de cinco iniciadores fraccionarios, la adición de seis iniciadores fraccionarios, la adición de siete iniciadores fraccionarios, la adición de ocho iniciadores fraccionarios, la adición de nueve iniciadores fraccionarios, la adición de 10 iniciadores fraccionarios, la adición de 11 iniciadores fraccionarios, la adición de 12 iniciadores fraccionarios, o la adición de 14 iniciadores fraccionarios, la adición de 15 iniciadores fraccionarios. En algunas realizaciones, se añaden más de 15 iniciadores fraccionarios, por ejemplo, entre 16 y 100 iniciadores fraccionarios o más, por ejemplo, 500, 1000, etc.

En algunas realizaciones, la molécula diana (1020) comprende una primera sección diana (1100) y una segunda sección diana (1200). La primera sonda iniciadora fraccionaria (1190) puede comprender una primera sección de unión a la diana (1141) y la segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290) comprende una segunda sección de unión a la diana (1241). La primera sección diana (1100) está configurada para unirse a (o ser unida por) la primera sección de unión a la diana (1141) y la segunda sección diana (1200) está configurada para unirse a (o ser unida por) la segunda

sección de unión a la diana (1241).

En algunas realizaciones, cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria además comprende: unir el primer monómero de horquilla (1510) al primer iniciador fraccionario (1151) y al segundo iniciador fraccionario (1251), unir el segundo monómero de horquilla (1610) al primer monómero de horquilla (1510), y detectar una señal. La señal se puede generar o amplificar por medio del paso del primer y el segundo monómero de horquilla por una reacción de hibridación en cadena para añadir y/o concentrar de este modo una cantidad de molécula reportera que esté asociada a uno o ambos del primer y/o el segundo monómero de horquilla.

Las etapas de lavado se pueden llevar a cabo antes de la adición de los monómeros de horquilla y/o la detección. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende un lavado para eliminar la primera y la segunda sonda iniciadora fraccionaria no unidas de una muestra que contiene una diana. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende más de un lavado, por ejemplo, 2 lavados, 3 lavados, 4 lavados o 5 lavados. En algunas realizaciones, las sondas individuales del iniciador fraccionario que permanecen dentro de la muestra y/o la solución después del lavado y no están específicamente unidas a la diana no colocan un iniciador completo y, por lo tanto, no desencadenan la HCR.

En algunas realizaciones, cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria comprende la unión de un primer monómero de horquilla adicional (1510) al segundo monómero de horquilla (1610) (que ya está unido a un primer monómero de horquilla). De este modo, la extensión de la cadena de monómeros se puede lograr por medio de la polimerización de HCR. En algunas realizaciones, hay al menos 10 primeros monómeros de horquilla adicionales. En algunas realizaciones hay al menos 100 primeros monómeros de horquilla adicionales, por ejemplo, 1000, 10000, etc. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende la unión de un segundo monómero de horquilla adicional al primer monómero de horquilla adicional, que ya está unido a un segundo monómero de horquilla). En algunas realizaciones, hay al menos 10 monómeros de segunda horquilla adicionales. En algunas realizaciones, hay al menos 100 monómeros de segunda horquilla adicionales, por ejemplo, 1000, 10000, etc. En algunas realizaciones, cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria comprende una cascada alternante de eventos de polimerización en la que un iniciador completo se une a un primer monómero de horquilla (1510) que a su vez se une a un segundo monómero de horquilla (1610) que a su vez se une a otro primer monómero de horquilla que a su vez se une a otro segundo monómero de horquilla, y así sucesivamente, de forma que el polímero crece a través de la adición alternante de primeros y segundos monómeros de horquilla. En algunas realizaciones la cascada alternante comprende la unión de más de dos monómeros de horquilla, por ejemplo, tres monómeros de horquilla, cuatro monómeros de horquilla, cinco monómeros de horquilla, seis monómeros de horquilla, siete monómeros de horquilla, ocho monómeros de horquilla, nueve monómeros de horquilla, 10 monómeros de horquilla, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000, o más.

En algunas realizaciones, en cualquiera de las reacciones de unión descritas en la presente memoria, la unión comprende la hibridación. En algunas realizaciones, la unión comprende la interacción selectiva proteína-proteína. En algunas realizaciones, la unión comprende la interacción selectiva ácido nucleico-proteína. En algunas realizaciones, la unión comprende la unión iónica. En algunas realizaciones, la unión comprende la unión covalente.

En algunas realizaciones, en cualquiera de los procedimientos o composiciones descritos en la presente memoria, la molécula reportera es una molécula fluorescente. En algunas realizaciones, la molécula reportera comprende una disposición inactivada o FRET, en la que una molécula fluorescente en un monómero de horquilla es activada cuando se alcanza una configuración de polímero por el primer y el segundo monómero de horquilla. En algunas realizaciones, la molécula reportera es una molécula no fluorescente. En algunas realizaciones, la molécula reportera es un elemento de tierras raras.

En algunas realizaciones, los monómeros de la primera y segunda horquilla forman un par FRET cuando se combinan como polímero. En algunas realizaciones, el par FRET se forma debido a un cambio en la inactivación o FRET que se produce cuando los monómeros de horquilla se abren y polimerizan. De este modo, en algunas realizaciones, los monómeros de horquilla están configurados para permitir la FRET (por ejemplo, cumpliendo los requisitos de proximidad y de emparejamiento de la molécula reportera para que los cambios en la FRET sean monitorizados).

En algunas realizaciones, la primera sonda iniciadora fraccionaria (1190) puede comprender una secuencia de aminoácidos y la segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290) puede comprender una secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, la sonda también incluirá una secuencia de ácido nucleico para hibridar con la(s) secuencia(s) diana. Pueden ser las primeras secciones de unión a la diana y las segundas secciones de unión a la diana. En algunas realizaciones, las secciones de unión a la diana son complementarias a las secciones diana primera y segunda (1100 y 1200). En algunas realizaciones, las sondas del primer y el segundo iniciador fraccionario también incluirán el primer y el segundo iniciador fraccionario, que pueden comprender nucleótidos, para proporcionar una secuencia de ácido nucleico de longitud adecuada, que cuando se coloca, forma el iniciador completo. En algunas realizaciones, la primera sonda iniciadora fraccionaria (1190) comprende una secuencia de ácido nucleico y la segunda sonda iniciadora fraccionaria (1290) comprende una secuencia de ácido nucleico. En algunas realizaciones, el primer y el segundo iniciador fraccionario (1151, 1251) se pueden emparejar en base con el primer monómero de horquilla (1510). En algunas realizaciones, la primera sonda iniciadora fraccionaria comprende una o más de las siguientes: ADN, ARN, 2'Ome-ARN, LNA, análogo de ácido nucleico sintético, aminoácido, análogo de aminoácido sintético y PNA y la segunda sonda iniciadora fraccionaria comprende uno o más de los siguientes: ADN, ARN, 2'Ome-ARN, LNA, análogo

de ácido nucleico sintético, aminoácido, análogo de aminoácido sintético y PNA.

En algunas realizaciones, cualquiera de los tampones de lavado descritos en la presente memoria comprende formamida. En algunas realizaciones, la concentración porcentual de formamida está entre el 0% y el 80%, por ejemplo, entre el 10% y el 70%, o entre el 30% y el 60%. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende ácido cítrico. En algunas realizaciones, la concentración molar de ácido cítrico está entre 1nM y 30nM, por ejemplo, entre 5nM y 15nM o entre 8nM y 12nM. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende Tween. En algunas realizaciones, la concentración porcentual de Tween está entre el 0% y el 1,0%, por ejemplo, entre el 0,05% y el 0,5%. En algunas realizaciones, el tampón de lavado comprende heparina. En algunas realizaciones, la concentración de heparina está entre 20µg/mL y 80µg/mL, por ejemplo, entre 30µg/mL y 70 µg/mL, por ejemplo, entre 40µg/mL y 60µg/mL.

Un iniciador fraccionario es diferente de otras sondas condicionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un iniciador fraccionario no es una sonda que cambia la conformación (por ejemplo, el Esquema B de la FIG. 2). En algunas realizaciones, el iniciador fraccionario es uno que implica dos hebras separadas de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el iniciador fraccionario depende de al menos dos eventos de unión separados a al menos dos secciones diana diferentes (aunque las dos secciones pueden estar en una sola molécula).

En algunas realizaciones, el procedimiento proporcionado en la presente memoria se puede utilizar para mejorar la relación señal/fondo para la amplificación de la señal *in situ* por medio de la reacción en cadena de hibridación (HCR).

La Figura 15 representa otras realizaciones que implican HCR, en particular, un protocolo de HCR *in situ* de tres etapas que utiliza sondas iniciadoras fraccionarias con monómeros de horquilla que llevan sitios de unión a la etiqueta. Panel (a) Etapa de detección: los pares de sondas del iniciador fraccionario se hibridan con el ARNm diana y las sondas no utilizadas se lavan de la muestra. Cada conjunto de sondas iniciadoras fraccionarias contiene uno o más pares de sondas que se unen selectivamente a diferentes subsecuencias a lo largo del ARNm diana. Cada sonda dentro de un par lleva una parte del iniciador de HCR I1 (por ejemplo, ½). La hibridación selectiva de las dos sondas dentro de un par a sus sitios de unión a la diana afines colocaliza las dos mitades del iniciador I1 de la HCR completa. Panel (b) Etapa de amplificación: el iniciador de HCR completo I1 desencadena el autoensamblaje de los polímeros de amplificación anclados y los monómeros de horquilla H1 y H2 no utilizados son lavados de la muestra. Cada monómero de horquilla lleva un sitio de unión a la etiqueta. Los sitios de unión a la etiqueta decoran el polímero de amplificación de HCR resultante. Panel (c) Etapa de etiquetado: las sondas de etiqueta que comprenden un complemento del sitio de unión a la etiqueta y que además comprenden un reportero fluorocromo se hibridan con los polímeros de amplificación y luego las sondas de etiqueta no unidas son lavadas de la muestra. Las estrellas denotan los fluorocromos. Cada una de las etapas se puede repetir, combinar o separar en función de los resultados deseados. En algunas realizaciones, las etapas ocurren en el orden enumerado.

La Figura 16 representa un mecanismo de HCR que utiliza horquillas HCR simplificadas. Las horquillas fluorescentes metafísicas se autoensamblan en polímeros de amplificación fluorescentes tras la detección de un iniciador afín. El iniciador I1 se nuclea con la horquilla H1 a través del emparejamiento de bases con el punto de apoyo monocatenario 'a', que media una migración de rama que abre la horquilla para formar el complejo I1•H1 que contiene el segmento monocatenario 'a'-b'. Este complejo se nuclea con el segundo monómero de horquilla (horquilla H2) por medio del emparejamiento de bases con el punto de apoyo 'a', que media una migración de rama que abre la horquilla para formar el complejo I1•H1•H2 que contiene el segmento monocatenario 'b'-a'. De este modo, la secuencia del iniciador se regenera, para proporcionar la base para una reacción en cadena de etapas de polimerización H1 y H2 alternados. Las estrellas denotan los fluorocromos. La punta de la flecha denota el extremo 3' de cada cadena. Obsérvese que las dos horquillas tienen los mismos dominios de secuencia pero con polaridad de hebra opuesta (a-b-a\*-b\* para el monómero de horquilla H1 que va de 5' a 3') y (a-b-a\*-b\* para el monómero de horquilla H2 que va de 3' a 5').

En algunas realizaciones, el "dominio a" es el mismo que el dominio "c" (por ejemplo, como se muestra en la FIG. 13). Es decir, ambas horquillas utilizan las mismas secuencias de bucles y puntos de apoyo. Se trata de un caso especial del caso HCR estándar que utiliza menos espacio de secuencia para lograr la misma funcionalidad.

## **FISH**

En algunas realizaciones, el procedimiento forma parte de un protocolo biotecnológico. En algunas realizaciones, el procedimiento puede formar parte de la Hibridación *In Situ* con Fluorescencia (FISH). Los procedimientos de hibridación fluorescente *in situ* proporcionan a los biólogos una ventana crucial a la organización espacial de los circuitos biológicos endógenos, por medio de la revelación de los patrones de expresión de los ARNm diana dentro de las células, los tejidos, los órganos, los organismos y los ecosistemas (1 a 7). Si la autofluorescencia dentro de la muestra es baja, se puede generar una señal suficiente mediante el uso de un conjunto de sondas iniciadoras fraccionarias que contengan una o más sondas de ácido nucleico, cada una de ellas portadora de una o más moléculas reporteras fluorescentes, y cada una de ellas con una secuencia de unión a la diana complementaria a una porción del ARNm diana (8 a 14); en numerosos contextos, que incluyen embriones de vertebrados de montaje completo y secciones gruesas del cerebro, este enfoque no produce suficiente señal, por lo que las sondas se utilizan para mediar en la amplificación de la señal *in situ* para aumentar la relación señal/fondo (3, 6, 7, 11, 15 a 31).

En algunas realizaciones, el procedimiento permite mapear ARNm diana dentro de una muestra con una alta relación señal/fondo. En algunas realizaciones, un procedimiento FISH incorpora la amplificación de la señal *in situ*, en cuyo caso toda la fluorescencia dentro de la muestra es señal amplificada o alguna forma de fondo:

5 Señal Amplificada. La señal amplificada se genera cuando las sondas se hibridan específicamente con sus dianas afines y posteriormente median en la generación de productos de amplificación fluorescentes en el lugar de la molécula diana.

Fondo. El resto de la fluorescencia en la muestra es una forma de fondo:

Autofluorescencia. La autofluorescencia es la fluorescencia de fondo inherente a la muestra.

10 Fondo Amplificados. El fondo amplificado se genera cuando la unión inespecífica de un reactivo en cualquier etapa de un protocolo conduce a la generación de un producto de amplificación en las etapas posteriores del protocolo.

Fondo no Amplificado. El fondo no amplificado se genera si un reactivo fluorescente se une de forma no específica en la muestra, pero no conduce a la generación de productos de amplificación.

15 Por lo tanto, el rendimiento de la técnica depende tanto de lo que va bien (generación de señal amplificada) como de lo que va mal (generación de fondo de cualquiera de las tres fuentes: autofluorescencia, fondo no amplificado, fondo amplificado). Para lograr una alta relación señal/fondo en un vóxel dentro de una imagen, es útil generar una señal amplificada que sea significativamente mayor que el fondo total dentro del vóxel.

20 La amplificación *in situ* programable basada en el mecanismo de reacción en cadena de hibridación (HCR) (32) permite una multiplexación directa, una penetración profunda de la muestra, una alta relación señal/fondo y una resolución subcelular en diversos organismos (33 a 35). Un amplificador de HCR incluye dos moléculas de horquilla de ácido nucleico cinéticamente atrapadas (H1 y H2) que coexisten metaestablemente en ausencia de una hebra iniciadora afín (II; Figura 1a). La llegada del iniciador desencadena una reacción en cadena en la que las horquillas H1 y H2 se nuclean secuencialmente y se abren para ensamblarse en un largo polímero de amplificación de doble cadena mellada (32). Mediante el uso de la HCR *in situ*, las sondas de ADN complementarias a las dianas de ARNm llevan iniciadores de HCR de ADN que desencadenan reacciones en cadena en las que horquillas de ADN etiquetadas con fluorocromos metaestables se autoensamblan en polímeros de amplificación fluorescentes amarrados (Figura 1b). Se utiliza el mismo protocolo de hibridación *in situ* en dos etapas, independientemente del número de ARN diana (Figura 1c): en la etapa de detección, todos los conjuntos de sondas iniciadoras fraccionarias se hibridan en paralelo; en la etapa de amplificación, los amplificadores de HCR ortogonales funcionan en paralelo.

30 La HCR se basa en los principios de las disciplinas de programación molecular y nanotecnología dinámica de ácidos nucleicos para proporcionar una amplificación isotérmica de la señal sin enzimas en diversos entornos tecnológicos (36 a 39) y es particularmente adecuada para las exigencias de la amplificación *in situ* (33, 34). En primer lugar, el HCR es programable, lo que proporciona la base para una multiplexación directa mediante el uso de amplificadores ortogonales que funcionan de forma independiente y llevan fluorocromos espectralmente diferentes. El uso de un protocolo de dos etapas independiente del número de ARNm diana es conveniente para cualquier muestra, pero es esencial para las muestras delicadas, tales como los embriones de erizo de mar, que se dañan fácilmente durante los protocolos de multiplexación en serie. En segundo lugar, los monómeros de horquilla de HCR no se autoensamblan hasta que se encuentran con una sonda que lleva el iniciador afín, lo que permite una penetración profunda de la muestra antes del crecimiento de los polímeros de amplificación brillante en el lugar de las moléculas diana. El uso de reactivos de amplificación que son horquillas estructuradas con un vástago dúplex reduce el potencial de hibridación no específica dentro de la muestra y también aumenta la facilidad de diseñar múltiples amplificadores ortogonales. El hecho de que los polímeros de amplificación puedan llevar cientos de fluorocromos (34) permite conseguir una alta relación señal/fondo incluso cuando la autofluorescencia es alta (por ejemplo, en embriones de vertebrados montados en su totalidad (34, 40, 41) o en bacterias contenidas en muestras ambientales u otros organismos (42 a 44)). En tercer lugar, los polímeros de amplificación de HCR permanecen amarrados a sus sondas de inicio, lo que impide que la señal se difunda fuera de las dianas, y conduce a la resolución subcelular. En cuarto lugar, dado que las secuencias del amplificador de HCR son independientes de las secuencias diana del ARNm, los amplificadores previamente validados (34) se pueden utilizar para nuevos estudios sin necesidad de modificarlos. Para mapear un nuevo ARNm diana, todo lo que se necesita es un nuevo conjunto de sondas iniciadoras fraccionarias de ADN que lleven iniciadores de ADN para un amplificador de HCR de ADN existente. En conjunto, las propiedades de la HCR *in situ* permiten una multiplexación sencilla, una penetración profunda de la muestra, una elevada relación señal/fondo y una resolución subcelular en diversos organismos, lo que ofrece a los biólogos una ventana espectacularmente mejorada de la organización espacial de los circuitos biológicos. A continuación se describen cinco Esquemas (A, B, C, D, E) que adoptan diferentes enfoques para optimizar la relación señal/fondo mediante el uso de la amplificación de la señal *in situ* HCR (Figura 2). Un enfoque estándar de HCR *in situ* representado en la Figura 1b (34) corresponde al Esquema A.

Esquema A: Protocolo de dos etapas: Detección de la diana con una sonda no estructurada, seguida por la detección de la sonda y la amplificación de HCR mediante el uso de monómeros de horquilla de HCR. Una sonda no estructurada contiene una sección de unión a la diana (por ejemplo, la secuencia de unión a la diana) y una secuencia iniciadora

de HCR no estructurada. El iniciador es accesible para iniciar la HCR tanto si la sonda está hibridada con el ARNm diana afín como si no. Los monómeros de horquilla de HCR no interactúan, salvo cuando son iniciados por un iniciador de HCR afín; la iniciación desencadena la polimerización por medio de la nucleación y apertura secuencial de la horquilla, lo que da lugar a un polímero de amplificación de HCR emparejado por bases con el iniciador.

5 Etapa 1: Detección de dianas por medio de una sonda no estructurada: Las sondas se hibridan dentro de la muestra fijada y las sondas no utilizadas se eliminan por lavado. Las sondas se unen predominantemente al ARNm diana correspondiente, pero una fracción no despreciable de las sondas se unen en otras partes de la muestra. Las sondas que permanezcan en la muestra desencadenarán la amplificación durante la Etapa 2, independientemente de que se unan o no al ARNm diana afín.

10 Etapa 2: Detección de sondas y amplificación de HCR por medio de monómeros de horquilla de HCR : Los monómeros de horquilla de HCR se hibridan dentro de la muestra fijada y las horquillas no utilizadas se eliminan por lavado. Las sondas dentro de la muestra inician el crecimiento de los polímeros de amplificación de HCR anclados, para generar una señal amplificada en el lugar de las sondas unidas a las moléculas diana y un fondo amplificado en el lugar de las sondas unidas en otras partes de la muestra. Los monómeros de horquilla de HCR que se unen de forma no específica en la muestra no desencadenan la polimerización de HCR y, por lo tanto, no contribuyen a la generación del fondo amplificado, sino que aportan una cantidad insignificante de fondo no amplificado.

Implicaciones de rendimiento: El Esquema A es vulnerable a la unión inespecífica de la sonda durante la Etapa 1, lo que conduce a la generación de un fondo amplificado durante la Etapa 2. Debido a que la sonda no está estructurada, el Esquema A tiene la ventaja de que la secuencia de unión a la diana y la secuencia del iniciador de HCR son independientes; como resultado, los iniciadores de HCR validados y los monómeros de horquilla de HCR se pueden utilizar para diversas sondas y dianas nuevas sin cambiar las secuencias del iniciador de HCR y del monómero de horquilla de HCR.

Esquema B: Protocolo de dos etapas: Detección de la diana por medio de una sonda de horquilla, seguida por la detección de la sonda y la amplificación de HCR por medio de monómeros de horquilla de HCR. Una sonda en forma de horquilla contiene una sección de unión a la diana (por ejemplo, la secuencia de unión a la diana) y una secuencia iniciadora de HCR; el iniciador de HCR es inicialmente inaccesible debido al emparejamiento de bases dentro de la sonda en forma de horquilla; si la sonda en forma de horquilla se empareja con su ARNm diana correspondiente, la sonda cambia de conformación y el iniciador de HCR se vuelve accesible y capaz de iniciar la amplificación de HCR. Los monómeros de horquilla de HCR no interactúan, salvo cuando son iniciados por un iniciador de HCR afín; la iniciación desencadena la polimerización por medio de la nucleación y apertura secuencial de la horquilla, lo que da lugar a un polímero de amplificación de HCR emparejado por bases con el iniciador.

Etapa 1: Detección de dianas por medio de una sonda de horquilla: Las sondas se hibridan dentro de la muestra fijada y las sondas no utilizadas se eliminan por lavado. Las sondas se unen predominantemente al ARNm diana correspondiente, pero una fracción no despreciable de las sondas se unen en otras partes de la muestra. Una sonda hibridada con un ARNm diana afín cambia de conformación para exponer un iniciador de HCR accesible, lo que lleva a la generación de una señal amplificada en la Etapa 2. Una sonda unida en otro lugar de la muestra tiene un iniciador de HCR inaccesible y, por lo tanto, no desencadena la amplificación de HCR, lo que evita la generación de fondo amplificado en la Etapa 2.

Etapa 2: Detección de sondas y amplificación de HCR por medio de monómeros de horquilla de HCR : Los monómeros de horquilla de HCR se hibridan dentro de la muestra fijada y las horquillas no utilizadas se eliminan por lavado. Una sonda hibridada con su diana afín desencadena el crecimiento de un polímero de amplificación de HCR anclado, para generar una señal amplificada en el lugar de la molécula diana. Una sonda unida en otro lugar de la muestra no desencadena la amplificación, lo que evita la generación de un fondo amplificado. Los monómeros de horquilla de HCR que se unen de forma no específica en la muestra no desencadenan la polimerización de HCR y, por lo tanto, no contribuyen a la generación del fondo amplificado, sino que aportan una cantidad insignificante de fondo no amplificado.

Implicaciones de rendimiento: El Esquema B no es vulnerable a la unión inespecífica de la sonda durante la Etapa 1, dado que las sondas unidas de forma inespecífica no desencadenan la amplificación de HCR durante la Etapa 2. Por lo tanto, el Esquema B tiene la propiedad de que incluso si los reactivos se unen de forma no específica en cualquier etapa del protocolo, no se generará predominantemente un fondo amplificado. El inconveniente del Esquema B es que, al utilizar sondas de horquilla, hay cierto grado de complementariedad de secuencia entre la secuencia de unión a la diana y la secuencia iniciadora de HCR. Como resultado, el cambio de la sección de unión a la diana (por ejemplo, la secuencia de unión a la diana) requiere el cambio de las secuencias del iniciador de HCR y del monómero de horquilla de HCR, lo cual es una desventaja en comparación con la simplicidad del Esquema A.

Esquema C: Protocolo de tres etapas: Detección de la diana con pares de sondas no estructuradas, seguida por la detección de pares de sondas con un puente no estructurado, seguida por la detección con un puente y de la amplificación de HCR mediante el uso de monómeros de horquilla de HCR. Las sondas no estructuradas vienen en pares; cada sonda contiene una sección de unión a la diana (por ejemplo, secuencia de unión a la diana) y la mitad de una secuencia de nucleación no estructurada; para las dos sondas dentro de un par de sondas, las dos secciones

de unión a la diana (por ejemplo, las dos secciones de unión a la diana (por ejemplo, la secuencia de unión a la diana) son complementarias a las secciones de la diana (por ejemplo, las subsecuencias proximales) del ARNm de la diana, de forma que cuando las dos sondas se unen específicamente a sus secciones de la diana (por ejemplo, los sitios de la diana afines), las dos mitades de la secuencia de nucleación se aproximan. Una hebra puente no estructurada contiene secuencias de unión proximal complementarias a las dos mitades de la secuencia de nucleación; la hebra puente no estructurada también contiene un iniciador de HCR que es accesible para iniciar la HCR tanto si la hebra puente está específicamente emparejada en base a su sitio de nucleación afín como si no. Los monómeros de horquilla de HCR no interactúan, salvo cuando son iniciados por un iniciador de HCR afín; la iniciación desencadena la polimerización por medio de la nucleación y apertura secuencial de la horquilla, lo que da lugar a un polímero de amplificación de HCR emparejado por bases con el iniciador.

Etapas 1: Detección de dianas por medio de pares de sondas no estructuradas: Las sondas se hibridan dentro de la muestra fijada y las sondas no utilizadas se eliminan por lavado. Los pares de sondas se unen predominantemente a sus secciones diana (por ejemplo, sitios diana afines), para colocar las dos mitades de la secuencia de nucleación; una fracción no despreciable de las sondas se unen en otras partes de la muestra, pero las sondas que se unen de forma no específica no colocan las dos mitades de la secuencia de nucleación.

Etapas 2: Detección de pares de sondas por medio de un puente no estructurado: Las hebras puente no estructuradas se hibridan dentro de la muestra fija en condiciones experimentales tales que una hebra puente se empareja predominantemente de forma estable con la secuencia de nucleación completa creada por un par de sondas afines que se emparejan específicamente con las secciones diana proximales (por ejemplo, los sitios diana afines); además, las condiciones experimentales son tales que la hebra puente no se empareja predominantemente de forma estable con el medio sitio de nucleación transportado por una sonda individual que no es proximal a su sonda afín. Una fracción no despreciable de puentes se une de forma no específica en la muestra; los puentes unidos de forma no específica activarán la amplificación de HCR durante la Etapa 3, lo que genera un fondo amplificado.

Etapas 3: Detección de puentes y amplificación de HCR mediante el uso de monómeros de horquilla de HCR: Los monómeros de horquilla de HCR se hibridan dentro de la muestra fijada y las horquillas no utilizadas se eliminan por lavado. Las hebras puente dentro de la muestra inician el crecimiento de los polímeros de amplificación de HCR anclados; para las hebras puente emparejadas por bases con su sitio de nucleación afín formado por un par de sondas afines emparejadas por bases con secciones diana proximales (por ejemplo, sitios diana afines), estos polímeros representan la señal amplificada. En el caso de las hebras puente unidas en otra parte de la muestra, estos polímeros corresponden al fondo amplificado. Los monómeros de horquilla de HCR que se unen de forma no específica en la muestra no desencadenan la polimerización de HCR y, por lo tanto, no contribuyen a la generación del fondo amplificado, sino que aportan una cantidad insignificante de fondo no amplificado.

Implicaciones de rendimiento: El Esquema C no es vulnerable a la unión inespecífica de la sonda en la Etapa 1, dado que los puentes no se emparejan de forma estable con las sondas aisladas en la Etapa 2. Sin embargo, el Esquema C es vulnerable a la unión inespecífica de los puentes en la Etapa 2, lo que conduce a la generación de un fondo amplificado en la Etapa 3. Nótese que el puente no estructurado en la Etapa 2 del Esquema C está sujeto a la misma debilidad conceptual que la sonda no estructurada en la Etapa 1 del Esquema A. La ventaja del Esquema C en relación con el Esquema A es que mediante el uso del Esquema C se puede optimizar una biblioteca de secuencias de puentes para su uso en una especie determinada y luego esas secuencias de puentes se pueden reutilizar para diversas sondas y dianas nuevos sin cambiar las secuencias de los puentes. En comparación, mediante el uso del Esquema A, cada nueva secuencia de sonda tendría que ser optimizada para su uso en una especie determinada. Sin embargo, incluso mediante el uso de secuencias de puentes optimizadas con el Esquema C, una fracción no despreciable de puentes se unirá de forma no específica en la muestra, lo que genera un fondo amplificado en la siguiente etapa del protocolo. Asimismo, incluso mediante el uso de secuencias de sonda optimizadas por medio del Esquema A, una fracción no despreciable de sondas se unirá de forma no específica en la muestra, lo que genera un fondo amplificado en la siguiente etapa del protocolo.

Esquema D: Protocolo de tres etapas: Detección de la diana con pares de sondas no estructuradas, seguida por la detección de pares de sondas por medio de un puente de horquillas, seguida por la detección de puentes y la amplificación de HCR por medio de monómeros de horquilla de HCR. Las sondas no estructuradas vienen en pares; cada sonda contiene una sección de unión a la diana (por ejemplo, secuencia de unión a la diana) y la mitad de una secuencia de nucleación no estructurada; para las dos sondas dentro de un par de sondas, las dos secciones de unión a la diana (por ejemplo, las dos secciones de unión a la diana (por ejemplo, la secuencia de unión a la diana) son complementarias a las secciones de la diana (por ejemplo, las subsecuencias proximales) del ARNm de la diana, de forma que cuando las dos sondas se unen específicamente a sus secciones de la diana (por ejemplo, los sitios de la diana afines), las dos mitades de la secuencia de nucleación se aproximan. Un puente de horquilla contiene secuencias de unión proximal complementarias a las dos mitades de la secuencia de nucleación; el puente de horquilla también contiene un iniciador de HCR que es inicialmente inaccesible debido al emparejamiento de bases dentro del puente de horquilla; si el puente de horquilla se empareja con las dos mitades de su secuencia de nucleación afín, el puente cambia de conformación y el iniciador de HCR se vuelve accesible y capaz de iniciar la amplificación de HCR. Los monómeros de horquilla de HCR no interactúan, salvo cuando son iniciados por un iniciador de HCR afín; la iniciación desencadena la polimerización por medio de la nucleación y apertura secuencial de la horquilla, lo que da lugar a un polímero de amplificación de HCR emparejado por bases con el iniciador.

Etapa 1: Detección de dianas por medio de pares de sondas no estructuradas: Las sondas se hibridan dentro de la muestra fijada y las sondas no utilizadas se eliminan por lavado. Los pares de sondas se unen predominantemente a sus secciones diana (por ejemplo, sitios diana afines), para colocalizar las dos mitades de la secuencia de nucleación; algunas sondas se unen en otras partes de la muestra, pero las sondas que se unen de forma no específica no colocalizan las dos mitades de la secuencia de nucleación.

Etapa 2: Detección de pares de sondas por medio de un puente de horquilla: Las hebras de los puentes de horquilla se hibridan dentro de la muestra fijada y los puentes no utilizados se eliminan por lavado. Las hebras de los puentes de horquilla se emparejan predominantemente con la secuencia de nucleación completa creada por un par de sondas afines que se emparejan específicamente con las secciones diana proximales (por ejemplo, los sitios diana afines); un puente de horquilla específicamente unido cambia de conformación para exponer un iniciador de HCR accesible, lo que lleva a la generación de una señal amplificada en la Etapa 3. Un puente de horquilla unido en otro lugar de la muestra tiene un iniciador de HCR inaccesible y no desencadena la amplificación de HCR, lo que evita la generación de fondo amplificado en la Etapa 3.

Etapa 3: Detección de puentes y amplificación de HCR por medio de monómeros de horquilla de HCR : Los monómeros de horquilla de HCR se hibridan dentro de la muestra fijada y las horquillas no utilizadas se eliminan por lavado. Los puentes de horquilla unidos específicamente con iniciadores de HCR expuestos desencadenarán el crecimiento de polímeros de amplificación fluorescentes amarrados, lo que genera una señal amplificada en el lugar de las moléculas diana. Los monómeros de horquilla de HCR que se unen de forma no específica en la muestra no desencadenan la polimerización de HCR y, por lo tanto, no contribuyen a la generación del fondo amplificado, sino que aportan una cantidad insignificante de fondo no amplificado.

Implicaciones de rendimiento: El Esquema D no es vulnerable a la unión inespecífica de la sonda en la Etapa 1, dado que los puentes de horquilla no se emparejan de forma estable con las sondas aisladas en la Etapa 2. Además, el Esquema D no es vulnerable a la unión inespecífica de los puentes de horquilla en la Etapa 2, dado que los puentes de horquilla unidos de forma inespecífica no desencadenan la amplificación durante la Etapa 3. Por lo tanto, el Esquema D comparte la importante propiedad con el Esquema B de que incluso si los reactivos se unen de forma no específica en cualquier etapa del protocolo, no se generará predominantemente un fondo amplificado. La ventaja del Esquema D en relación con el Esquema B es que los sitios de nucleación del puente, y por lo tanto las secuencias del iniciador de HCR y del monómero de horquilla de HCR, son independientes de los sitios de unión a la diana en las sondas; como resultado, un iniciador de HCR y un amplificador validados se pueden utilizar para diversas sondas y dianas nuevas sin cambiar las secuencias del iniciador de HCR y del amplificador.

Un inconveniente del Esquema D en relación con el Esquema B es el aumento del número de etapas de dos a tres.

Esquema E: Protocolo de dos etapas: Detección de la diana con pares de sondas iniciadoras fraccionarias no estructuradas (también conocidas como iniciadores divididos), seguida por la detección de pares de sondas y la amplificación de HCR por medio de monómeros de horquilla de HCR. Las sondas iniciadoras fraccionarias no estructuradas (también conocidas como iniciadores divididos) vienen en pares; cada sonda contiene una sección de unión a la diana (por ejemplo, secuencia de unión a la diana) y la mitad de un iniciador de HCR no estructurado; para las dos sondas dentro de un par de sondas, las dos secciones de unión a la diana (por ejemplo, las dos secciones de unión a la diana (por ejemplo, secuencia de unión a la diana) son complementarias a las secciones de la diana (por ejemplo, subsecuencias proximales) del ARNm de la diana, de forma que cuando las dos sondas se unen específicamente a sus secciones de la diana (por ejemplo, sitios de la diana afines), las dos mitades del iniciador de HCR se aproximan. Los monómeros de las horquillas HCR no interactúan, excepto cuando son iniciados por un iniciador de HCR afín (iniciador completo); la iniciación desencadena la polimerización a través de la nucleación y la apertura secuencial de las horquillas, lo que da lugar a un polímero de amplificación de HCR emparejado en base con el iniciador (iniciador completo).

Etapa 1: Detección de dianas por medio de pares de sondas iniciadoras fraccionarias no estructuradas (también conocidos como iniciadores divididos) : Las sondas se hibridan dentro de la muestra fijada y las sondas no utilizadas se eliminan por lavado. Los pares de sondas se unen predominantemente a sus secciones diana (por ejemplo, los sitios diana afines), colocalizar las dos mitades del iniciador de HCR; algunas sondas se unen en otras partes de la muestra, pero las sondas que se unen de forma no específica no colocalizar las dos mitades del iniciador de HCR.

Etapa 2: Detección de pares de sondas y amplificación de HCR por medio de monómeros de horquilla de HCR: Los monómeros de horquilla de HCR se hibridan dentro de la muestra fijada y las horquillas no utilizadas se eliminan por lavado. Los pares de sondas que se hibridan específicamente a sus secciones diana (por ejemplo, sitios diana afines) colocalizar las dos mitades de un iniciador de HCR, lo que inicia cooperativamente el crecimiento de polímeros de amplificación de HCR fluorescentes amarrados, y genera una señal amplificada en el sitio de las moléculas diana. Las sondas unidas de forma no específica no colocalizan las dos mitades de un iniciador de HCR, no desencadenan la amplificación de HCR y, por lo tanto, evitan generar un fondo amplificado. Los monómeros de horquilla de HCR que se unen de forma no específica en la muestra no desencadenan la polimerización de HCR y, por lo tanto, no contribuyen a la generación del fondo amplificado, sino que aportan una cantidad insignificante de fondo no amplificado.

Implicaciones de rendimiento: El Esquema E no es vulnerable a la unión inespecífica de la sonda en la Etapa 1, dado que las sondas aisladas de iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido) no inician la amplificación de HCR en la Etapa 2. Por lo tanto, el Esquema E comparte la importante propiedad con los Esquemas B y D de que la supresión de fondo activa se proporciona en cada etapa del protocolo: incluso si los reactivos se unen de forma no específica en cualquier etapa del protocolo, predominantemente no se generará fondo amplificado.

En comparación con el Esquema D, el Esquema E tiene, entre otras ventajas, la de que un monómero de horquilla de HCR cumple la función de puente de horquilla, para eliminar de este modo la necesidad de un puente de horquilla separado y reducir el número de etapas del protocolo de tres a dos. En comparación con el Esquema C, los Esquemas D y E tienen, entre otras, la ventaja de que el puente no contribuirá a la generación de fondo amplificado si se une de forma no específica. En comparación con el Esquema B, el Esquema E tiene, entre otras, la ventaja de que las secuencias del iniciador de HCR y de los monómeros de horquilla de HCR son independientes de la sección de unión a la diana (por ejemplo, las secuencias de unión a la diana) en las sondas. Como resultado, los iniciadores de HCR validados y los monómeros de horquilla de HCR se pueden utilizar para diversas sondas y dianas nuevos sin cambiar las secuencias del iniciador de HCR y del monómero de horquilla de HCR. En general, el Esquema E tiene todos los beneficios y ninguno de los inconvenientes de los Esquemas A, B, C y D: la simplicidad de un protocolo de dos etapas, la versatilidad para reutilizar los iniciadores de HCR validados y los monómeros de horquilla de HCR con nuevas secuencias diana, y la solidez para evitar la generación de un fondo amplificado incluso si los reactivos se unen de forma no específica en la muestra en cualquier etapa del protocolo.

La Figura 1 describe la amplificación *in situ* por medio de la reacción en cadena de hibridación (HCR). (a) Mecanismo de HCR. Las horquillas fluorescentes metafísicas se autoensamblan en polímeros de amplificación fluorescentes tras la detección de un iniciador afín. El iniciador I1 se nuclea con el primer monómero de horquilla (por ejemplo, la horquilla H1) a través del emparejamiento de bases con el punto de apoyo monocatenario 'a', que media una migración de rama que abre la horquilla para formar el complejo I1 H1 que contiene el segmento monocatenario 'c'-b'. Este complejo se nuclea con el segundo monómero de horquilla (horquilla H2) por medio del emparejamiento de bases con el punto de apoyo 'c', que media una migración de rama que abre la horquilla para formar el complejo I1 1 H2 que contiene el segmento monocatenario 'b'-a'. De este modo, la secuencia del iniciador se regenera, para proporcionar la base para una reacción en cadena de etapas de polimerización H1 y H2 alternados. Las estrellas denotan los fluorocromos. La punta de la flecha denota el extremo 3' de cada cadena. (b) Protocolo de hibridación *in situ* (mediante el uso de las sondas estándar del Esquema A).

Con respecto a la etapa de detección: los conjuntos de sondas iniciadoras fraccionarias se hibridan con las dianas de ARNm y las sondas no utilizadas se lavan de la muestra. En lo que respecta a la etapa de amplificación: los iniciadores desencadenan el autoensamblaje de los polímeros de amplificación fluorescentes anclados y las horquillas no utilizadas son lavadas de la muestra. (c) Cronología experimental. Se utiliza el mismo protocolo de dos etapas, independientemente del número de ARNm diana. Para los experimentos multiplexados (ejemplo de tres colores representado), los conjuntos de sondas iniciadoras fraccionarias para diferentes ARNm diana (cinco sondas representadas por conjunto) llevan iniciadores ortogonales que desencadenan cascadas de amplificación de HCR ortogonales etiquetadas por fluorocromos espectralmente diferentes.

La Figura 2 proporciona los esquemas mencionados anteriormente para cinco esquemas, en forma resumida. Esquema A: Protocolo de dos etapas: Detección de la diana con una sonda no estructurada, seguida por la detección de la sonda y la amplificación de HCR mediante el uso de monómeros de horquilla de HCR. Esquema B: Protocolo de dos etapas: Detección de la diana por medio de una sonda de horquilla, seguida por la detección de la sonda y la amplificación de HCR por medio de monómeros de horquilla de HCR. Esquema C: Protocolo de tres etapas: Detección de la diana con pares de sondas no estructuradas, seguida por la detección de pares de sondas con un puente no estructurado, seguida por la detección con un puente y de la amplificación de HCR mediante el uso de monómeros de horquilla de HCR. Esquema D: Protocolo de tres etapas: Detección de la diana con pares de sondas no estructuradas, seguida por la detección de pares de sondas por medio de un puente de horquillas, seguida por la detección de puentes y la amplificación de HCR por medio de monómeros de horquilla de HCR. Esquema E: Protocolo de dos etapas: Detección de la diana con pares de sondas iniciadoras fraccionarias no estructuradas (también conocidas como iniciadores divididos), seguida por la detección de pares de sondas y la amplificación de HCR por medio de monómeros de horquilla de HCR. La punta de la flecha denota el extremo 3' de cada cadena.

Figura 3: Disposiciones alternativas para dos sitios de unión a la diana y dos iniciadores fraccionarios (fragmentos iniciadores de HCR) dentro de un par de sondas iniciadoras divididas. Para cada Disposición (1,2,3,4,5), cada sonda dentro de un par de sondas lleva la mitad del iniciador de HCR completo (también conocido como la mitad del iniciador de HCR I1); la unión específica de las dos sondas dentro de un par a la molécula diana afín conduce a la colocación de las dos mitades del iniciador de HCR completo (también conocido como la mitad del iniciador de HCR II). La punta de la flecha denota el extremo 3' de cada cadena.

La Figura 4 proporciona realizaciones adicionales en las que las sondas iniciadoras divididas son colocadas por una molécula diana. (a) sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido). La primera sonda iniciadora fraccionaria (Sonda 1) y la segunda sonda iniciadora fraccionaria (Sonda 2) llevan cada una la mitad del iniciador de HCR I1; la unión selectiva de la primera sonda iniciadora fraccionaria (Sonda 1) y la segunda sonda iniciadora fraccionaria (Sonda 2) a la molécula diana coloca las dos mitades del iniciador de HCR I1. (b) Sondas

de ácido nucleico con iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido). La sonda de ácido nucleico 1 y la sonda de ácido nucleico 2 llevan cada una la mitad del iniciador I1 de la HCR; la unión selectiva de la sonda de ácido nucleico 1 y la sonda de ácido nucleico 2 al ARNm diana colocaliza las dos mitades del iniciador I1 de la HCR. (c) Sondas de anticuerpos con iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido). La sonda de anticuerpos 1 y la sonda de anticuerpos 2 llevan cada una la mitad del iniciador I1 de la HCR; la unión selectiva de la sonda de anticuerpos 1 y la sonda de anticuerpos 2 a la proteína diana colocaliza las dos mitades del iniciador I1 de la HCR. (d) Sondas de anticuerpos secundarios con iniciador dividido. La sonda de anticuerpo primario 1 se une selectivamente a la proteína diana; la sonda de anticuerpo secundario 2 y la sonda de anticuerpo secundario 3 llevan cada una la mitad del iniciador I1 de la HCR; la unión selectiva de la sonda de anticuerpo secundario 2 y la sonda de anticuerpo secundario 3 a la sonda de anticuerpo primario 1 colocaliza las dos mitades del iniciador I1 de la HCR.

La Figura 5 ofrece otras realizaciones relativas a las sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) colocalizadas por un complejo diana. (a) Sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido). El complejo diana comprende la molécula 1 unida a la molécula 2; la primera sonda iniciadora fraccionaria (sonda 1) y la segunda sonda iniciadora fraccionaria (sonda 2) llevan cada una la mitad del iniciador de HCR I1; la unión selectiva de la sonda 1 a la molécula 1 dentro del complejo diana y la unión selectiva de la sonda 2 a la molécula 2 dentro del complejo diana colocalizan las dos mitades del iniciador de HCR I1. (b) Sondas de ácido nucleico con iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido). El complejo diana comprende la diana de ácido nucleico 1 unida a la diana de ácido nucleico 2; la sonda de ácido nucleico 1 y la sonda de ácido nucleico 2 llevan cada una la mitad del iniciador de HCR I1; la unión selectiva de la sonda de ácido nucleico 1 a la diana de ácido nucleico 1 dentro del complejo diana y la unión selectiva de la sonda de ácido nucleico 2 a la diana de ácido nucleico 2 dentro del complejo diana colocalizan las dos mitades del iniciador de HCR I1. (c) Sondas de anticuerpos con iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido).

El complejo diana comprende la proteína diana 1 unida a la proteína diana 2; la sonda del primer iniciador fraccionario de anticuerpos (sonda 1) y la sonda del segundo iniciador fraccionario de anticuerpos (sonda 2) llevan cada una la mitad del iniciador de HCR I1; la unión selectiva de la sonda del primer iniciador fraccionario de anticuerpos (sonda 1) a la proteína diana 1 dentro del complejo diana y la unión selectiva de la sonda del segundo iniciador fraccionario de anticuerpos (sonda 2) a la proteína diana 2 dentro del complejo diana colocalizan las dos mitades del iniciador de HCR I1. (d) Sondas de anticuerpos secundarios con iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido). El complejo diana comprende la proteína diana 1 unida a la proteína diana 2; la sonda iniciadora fraccionaria del primer anticuerpo primario (sonda 1) se une selectivamente a la proteína diana 1 dentro del complejo diana y la sonda iniciadora fraccionaria del segundo anticuerpo primario (sonda 2) se une selectivamente a la proteína diana 2 dentro del complejo diana; la sonda de anticuerpo secundario 3 y la sonda de anticuerpo secundario 4 llevan cada una la mitad del iniciador I1 de la HCR; la unión selectiva de la sonda de anticuerpo secundario 3 a la sonda del primer iniciador fraccionario del anticuerpo primario (sonda 1) y la unión selectiva de la sonda de anticuerpo secundario 4 a la sonda del segundo iniciador fraccionario del anticuerpo primario (sonda 2) colocalizan las dos mitades del iniciador I1 de la HCR. (e) Sondas de anticuerpos y ácidos nucleicos con iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido). El complejo diana comprende la proteína diana 1 unida a la diana de ácido nucleico 2; la sonda de anticuerpos 1 y la sonda de ácido nucleico 2 llevan cada una la mitad del iniciador de HCR I1; la unión de la sonda de anticuerpos 1 a la proteína diana 1 dentro del complejo diana y la unión de la sonda de ácido nucleico 2 a la diana de ácido nucleico 2 dentro del complejo diana colocalizan las dos mitades del iniciador de HCR I1.

El esquema de la Figura 8 resume la HCR *in situ* para la obtención de imágenes de moléculas diana de ácido nucleico mediante el uso de sondas de ácido nucleico con iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido) (Esquema E). HCR *in situ* mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) (Esquema E). (a) Protocolo de HCR *in situ* en dos etapas. Etapa de detección: los pares de sondas del iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido) se hibridan con el ARNm diana y las sondas que no se utilizan se eliminan de la muestra. Cada conjunto de sondas iniciadoras fraccionarias contiene uno o más pares de sondas que se unen selectivamente a diferentes subsecuencias a lo largo del ARNm diana. Cada sonda dentro de un par lleva la mitad del iniciador de HCR I1. La hibridación selectiva de las dos sondas dentro de un par a sus sitios de unión a la diana afines colocaliza las dos mitades del iniciador I1 de HCR. Etapa de amplificación: el iniciador de HCR completo I1 desencadena el autoensamblaje de los polímeros de amplificación fluorescentes anclados y las horquillas H1 y H2 no utilizadas son lavadas de la muestra. Las estrellas denotan los fluorocromos. (b) Línea de tiempo experimental para un experimento multiplexado. Se utiliza un protocolo de dos etapas, independientemente del número de ARNm diana.

### **Monómeros de horquilla**

En una reacción HCR se utilizan preferentemente dos o más especies diferentes de monómeros de horquilla de ácido nucleico. Cada especie de monómero de horquilla comprende típicamente al menos una región que es complementaria a una porción de otra especie de monómero de horquilla. Sin embargo, los monómeros están diseñados de forma que están cinéticamente atrapados y el sistema es incapaz de equilibrarse en ausencia de una molécula iniciadora que pueda alterar la estructura secundaria de uno de los monómeros. De este modo, los monómeros no pueden polimerizar en ausencia del iniciador. La introducción de una especie de iniciador completo desencadena una reacción en cadena de escapes cinéticos alternados por las dos o más especies de monómeros que dan lugar a la formación de un polímero. En algunas realizaciones, dos monómeros de horquilla se polimerizan en presencia de un iniciador para

formar un polímero mellado de doble cadena.

En algunas realizaciones, se emplean dos o más monómeros de horquilla que tienen una estructura de horquilla. Los monómeros de horquilla pueden comprender bucles protegidos por vástagos largos. En algunas realizaciones, se proporcionan monómeros con una estructura secundaria diferente. Sin embargo, la estructura secundaria puede ser tal que los monómeros sean metaestables en las condiciones de reacción en ausencia de un ácido nucleico iniciador. En presencia de un iniciador completo, la estructura secundaria de un primer monómero de horquilla cambia de forma que es capaz de hibridarse a un extremo pegajoso de una segunda especie de monómero de horquilla. Esto, a su vez, conduce a un cambio en la estructura secundaria del segundo monómero de horquilla, que es capaz de hibridarse con otro monómero de la primera horquilla y continuar el proceso. De este modo, una vez que una sola copia del primer monómero de horquilla interactúa con una sola copia del iniciador, se produce una reacción en cadena tal que los monómeros de horquilla son capaces de ensamblarse en un polímero que comprende especies de monómeros de horquilla alternados.

Se puede utilizar un número de criterios para diseñar los monómeros para conseguir las propiedades deseadas. Estos incluyen, por ejemplo y sin limitación, la minimización de la simetría de la secuencia, la probabilidad de adoptar la estructura secundaria diana en el equilibrio, el defecto de conjunto correspondiente al número medio de nucleótidos incorrectamente emparejados en el equilibrio en relación con la estructura diana, el defecto de conjunto de la probeta correspondiente a la concentración de nucleótidos incorrectamente emparejados en el equilibrio, y la cinética de hibridación.

Los monómeros se pueden sintetizar mediante el uso de procedimientos estándar, que incluyen sintetizadores de ácidos nucleicos disponibles en el mercado u obtenidos de fuentes comerciales tales como *Integrated DNA Technologies* (Coralville, IA).

En algunas realizaciones, los monómeros se derivatizan con un compuesto o molécula para aumentar el peso molecular del polímero resultante del HCR. Preferentemente se derivatizan en un lugar que no interfiera con su capacidad de hibridación. En algunas realizaciones, los monómeros se derivatizan con el sitio de unión a la etiqueta. En otras realizaciones los monómeros comprenden un fluorocromo o un compuesto colorimétrico que permite visualizar los polímeros resultantes.

### **Iniciador**

El iniciador completo puede ser una molécula de ácido nucleico. El iniciador completo es complementario a una porción de un monómero de horquilla, preferentemente una porción del monómero de horquilla que está disponible para la hibridación con el iniciador completo mientras el monómero de horquilla está en su estado cinéticamente atrapado. El iniciador completo también comprende preferentemente una secuencia que es complementaria a una porción del monómero de horquilla adyacente al extremo pegajoso, de forma que la hibridación del iniciador completo con el extremo pegajoso provoca un cambio conformacional en el monómero de horquilla y comienza la reacción en cadena HCR. Por ejemplo, el iniciador completo puede comprender una región complementaria a la primera región complementaria del monómero de horquilla, como se ha descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, la secuencia del iniciador completo es complementaria al extremo pegajoso (región complementaria del iniciador) y a la primera región complementaria de un primer monómero de horquilla. Como se describe en la presente memoria, en algunas realizaciones esto también influirá en la secuencia de la segunda región complementaria y el bucle de la segunda especie de monómero de horquilla.

En algunas realizaciones, el iniciador completo es un ácido nucleico que se debe detectar en una muestra o una porción de un ácido nucleico que se debe detectar. En este caso, la secuencia del ácido nucleico diana se tiene en cuenta en el diseño de los monómeros de horquilla de HCR. Por ejemplo, la región complementaria iniciadora, preferentemente un extremo pegajoso, de un monómero de horquilla está diseñada para ser complementaria a una porción de la secuencia de ácido nucleico diana. Dado que el segundo monómero de horquilla se hibridará con el primer monómero de horquilla, la secuencia del segundo monómero de horquilla también reflejará al menos una porción de la secuencia del ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, la amplificación de diversos eventos de reconocimiento se logra por medio del acoplamiento de HCR a activadores de aptámeros de ácido nucleico. Se identifica un aptámero capaz de unirse específicamente a un analito de interés. El analito no se limita a un ácido nucleico, sino que puede ser, por ejemplo, un polipéptido o una molécula pequeña. El aptámero está ligado a un ácido nucleico que comprende una región iniciadora de forma que el iniciador no está disponible para estimular la HCR en ausencia de la unión del analito al aptámero.

### **Detección de HCR**

Los productos de HCR son fácilmente detectables por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica para la detección de ácidos nucleicos, que incluyen, por ejemplo, la electroforesis en gel de agarosa, la electroforesis en gel de poliácridamida, la electroforesis capilar y la electroforesis capilar en gel. Como los polímeros comprenden ácidos nucleicos, se pueden visualizar por medio de técnicas estándar, tales como la tinción con bromuro de etidio. También pueden ser adecuados otros procedimientos, que incluyen la espectroscopia de dispersión de luz, tales como la

dispersión de luz dinámica (DLS), la medición de la viscosidad, los sistemas colorimétricos y la espectroscopia de fluorescencia. Como se discute con más detalle, en algunos procedimientos para la obtención de imágenes y la detección *in situ*, los productos de HCR están etiquetados con fluorescencia.

En algunas realizaciones, la HCR se monitoriza por medio de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Algunos monómeros están etiquetados con tintes fluorescentes para que los cambios conformacionales resultantes de la HCR puedan ser monitorizados por medio de la detección de cambios en la fluorescencia. En una realización, uno de los pares de moléculas de horquilla está etiquetado con un fluorocromo en la unión de la región complementaria a la hebra iniciadora y la región dúplex y etiquetado en el lado opuesto de la región dúplex con una molécula inactivadora. Tras la polimerización, el fluorocromo y el inactivador se separan espacialmente en la estructura de ácido nucleico agregada, lo que proporciona un alivio de la inactivación de fluorescencia. En este caso, la presencia de un único iniciador se ve amplificada por la cadena de eventos fluorescentes provocados por la HCR. En el contexto de la obtención de imágenes *in situ*, la presencia de una sola molécula diana puede ser amplificada por la cadena de eventos de fluorescencia. Además, para la obtención de imágenes *in situ*, la inactivación de la fluorescencia en los monómeros que no han reaccionado reduce el ruido de fondo. De este modo, los monómeros que no reaccionan no necesitan ser eliminados de la muestra.

La abundancia relativa de la diana se puede cuantificar para diferentes muestras por medio de la inmovilización de las dianas (por ejemplo, por medio de la fijación dentro de un embrión, o por medio de la reticulación a un blot, o por medio de la unión a una perla) y luego la detección de las dianas mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias que se colocan por la diana para desencadenar la HCR, lo que genera una señal que escala linealmente con la abundancia de la diana. Si una o más de las muestras tiene una abundancia conocida de la diana, se puede llevar a cabo una cuantificación absoluta para las otras muestras.

#### **Aplicación a las imágenes *in situ***

Algunas realizaciones de HCR proporcionan un enfoque libre de enzimas para la amplificación *in situ* que puede ser multiplexada en paralelo. Además, la amplificación de HCR desencadenada por sondas iniciadoras fraccionarias proporciona un medio para reducir la señal de fondo resultante de la unión inespecífica de la sonda. Las sondas iniciadoras fraccionarias colocan un iniciador completo sólo si se unen específicamente a la diana afín. Por lo tanto, desencadenan la HCR si, y sólo si, se detecta específicamente la diana, lo que conduce al autoensamblaje de un "polímero" no covalente amarrado (a la diana) construido a partir de monómeros de HCR, preferentemente monómeros de horquilla como se ha descrito anteriormente. Los monómeros de HCR pueden ser etiquetados con fluorescencia para que los polímeros puedan ser detectados y determinar la presencia y/o localización de la diana.

Los monómeros de horquilla de HCR también se denominan en la presente memoria "amplificadores" porque la polimerización de los monómeros al ser desencadenados por un iniciador de HCR completo produce una señal detectable, que se amplifica en comparación con la señal que se produciría por la unión de una sola sonda a la diana. Cada uno de los amplificadores puede estar etiquetado con el mismo o con diferentes fluorocromos. Por ejemplo, el sistema se puede diseñar para utilizar más de dos especies de monómeros por diana, con al menos una especie etiquetada fluorescentemente. Un amplificador de HCR que comprenda dos tipos de monómeros de horquilla puede tener un tipo de fluorocromo diferente que etiqueta cada uno de los dos tipos de monómeros de horquilla. Un amplificador de HCR que comprende cuatro tipos de monómeros de horquilla puede tener cuatro fluorocromos diferentes, uno para cada tipo de monómero de horquilla. En tales casos, los polímeros de amplificación de HCR estarían decorados con múltiples tipos de fluorocromos en una proporción conocida (por ejemplo, 1:1 para un polímero hecho de dos tipos alternados de monómero de horquilla, o 1:1:1 para un polímero hecho de cuatro tipos alternados de monómero de horquilla). Las etiquetas fluorescentes son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, las que aparecen en el "*The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*", 10ma edición.

En algunas realizaciones, los amplificadores dentro del sistema están etiquetados con un fluorocromo y un inactivador para formar una construcción análoga a una "baliza molecular" (Tyagi *et al. Nature Biotechnology* 14:303 a 308, 1996). Por ejemplo, un monómero en forma de horquilla puede comprender tanto un fluorocromo como un inactivador, de forma que el inactivador reduce la fluorescencia mientras el monómero está en forma de horquilla pero no cuando el monómero se incorpora a un polímero de HCR. De este modo, las versiones de baliza molecular de los monómeros de HCR pueden reducir la señal de fondo resultante de cualquier monómero no polimerizado, tales como los que se unen de forma no específica o que simplemente permanecen sin reaccionar en la muestra.

Para la obtención de imágenes de muestras biológicas, puede ser ventajoso utilizar componentes de amplificación que sean de tamaño pequeño para permitir la penetración en la muestra. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utilizan componentes de HCR de menos de aproximadamente 20 nanómetros, por ejemplo, menos de 15 nm, 10 nm, y entre unos 8 y 16 nm. En algunas realizaciones, los monómeros de horquilla de HCR tienen menos de aproximadamente 8 nm. Los procedimientos estándar para la obtención de imágenes *in situ* se pueden utilizar para hacer que los productos de HCR entren en la muestra. El artesano experto podrá seleccionar los procedimientos apropiados para hacer que los componentes de HCR entren en la muestra.

Las ventajas de la HCR para la obtención de imágenes *in situ* incluyen, sin limitación, la capacidad de amplificar

rápida una señal basada en una pequeña cantidad de analito presente y la capacidad de obtener imágenes de una diversidad de analitos en la misma muestra.

Como se ha descrito en la presente memoria, el uso de HCR para la detección e imagen *in situ* proporciona una número de ventajas. La especificidad se puede lograr mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias que colocan un iniciador completo sólo de dos o más sondas iniciadoras fraccionarias se unen específicamente a sus secciones diana (por ejemplo, sitios diana afines). La especificidad se puede lograr mediante el uso de sondas desencadenadas que protegen los iniciadores hasta que las sondas se unen específicamente a las dianas. Los monómeros de HCR de autoinactivación pueden ser etiquetados con pares fluorocromo/inactivador que se separan durante el autoensamblaje en polímeros de amplificación amarrados. Esta supresión automática del fondo es especialmente útil para aplicaciones *in vivo* en las que los componentes de amplificación no utilizados no se pueden lavar antes de la obtención de imágenes. La versatilidad se puede lograr por medio de la selección de aptámeros que cambian de estructura (Ellinton *et al.* *Nature* 346:818 a 822, 1990 y Tuerk *et al.* *Science* 249:505 a 510, 1990) que generalizan el concepto de sonda desencadenada a la detección de proteínas y moléculas pequeñas. Los monómeros de sonda y amplificación pequeños, preferentemente con dimensiones máximas de 8 a 16 nm facilitan la penetración de la muestra. Las condiciones isotérmicas son ideales para la amplificación de HCR, dado que evitan dañar la morfología de las muestras fijadas o sus componentes y facilitan la obtención de imágenes *in vivo*. La multiplexación se deriva naturalmente del uso de amplificadores de HCR independientes que funcionan simultáneamente, por ejemplo, mediante el uso de fluorocromos espectralmente diferentes para codificar firmas combinatorias únicas directamente en la estructura de cada producto de HCR. La amplificación cuantitativa sensible se puede lograr mediante el uso de mecanismos HCR no lineales que ofrecen un crecimiento exponencial en polímeros amarrados de un tamaño finito prescrito. Por último, la biocompatibilidad para aplicaciones *in vivo* se deriva del uso de componentes amplificadores de ácidos nucleicos.

#### **Obtención de imágenes de múltiples analitos**

La amplificación de HCR permite amplificar múltiples dianas simultáneamente. La HCR dirigida a un número de analitos (por ejemplo, transcritos de genes o proteínas) se puede utilizar simultáneamente. En algunas realizaciones, cada sistema HCR está etiquetado con un colorante espectralmente distinguible. En consecuencia, el número de analitos es igual al número de colorantes espectralmente distinguibles que están disponibles. Para numerosas situaciones, esto será suficiente.

Para estudiar la expresión de múltiples ARNm o proteínas, es deseable llevar a cabo una amplificación multiplexada de todos los eventos de reconocimiento simultáneamente mediante el uso de amplificadores de HCR ortogonales. Para aumentar el número de dianas diferentes que se pueden visualizar mediante el uso de un suministro limitado de fluorocromos espectralmente diferentes, el enfoque de multiplexación combinatoria no amplificada de Levisky y colaboradores (Levisky *et al.* *Science* 297:836 a 840, 2002) se pueden adaptar para la amplificación de HCR por medio del etiquetado de los monómeros de cada amplificador con diferentes combinaciones de colorantes únicos. El uso de códigos de barras con un mínimo de dos colores proporciona una base para el cribado de las señales de un solo color resultantes de las sondas que no están unidas específicamente.

Por lo tanto, en algunas realizaciones sólo se utiliza un único par de sondas para cada diana y el multiplexado combinatorio se lleva a cabo por medio del etiquetado de los monómeros para cada amplificador de HCR con diferentes combinaciones únicas de colorantes.

Si las horquillas H1 y H2 están etiquetadas con diferentes colorantes, el producto de HCR llevará un número igual de cada colorante por construcción. En general, se pueden utilizar N fluorocromos espectralmente diferentes para abordar  $T = N! / [(N-2)!2!]$  dianas con amplificadores de dos colores (por ejemplo, 4 tintes para 6 dianas, 5 tintes para 10 dianas). Sin embargo, dado que los códigos de barras combinatorios no se emplean como diagnóstico de fondo mediante el uso de este enfoque, el número de dianas se puede aumentar a  $T = \sum_{i=1}^N N! / [(N-i)!i!] + N$  al permitir amplificadores de un solo color (por ejemplo, 4 tintes para 10 dianas, 5 tintes para 15 dianas). Además, es posible etiquetar los monómeros de HCR con más de un colorante para aumentar el número de dianas que se pueden abordar hasta  $T = \sum_{i=1}^N N! / [(N-i)!i!] = 2N - 1$  (por ejemplo, 4 tintes para 15 dianas, 5 tintes para 31 dianas). También se pueden diseñar sistemas HCR que utilicen M horquillas por amplificador.

#### **Ejemplos y descripción**

##### **Ejemplo 1**

La Figura 6 muestra la obtención de imágenes de dos ARNm diana en embriones de pollo montados en su totalidad mediante el uso de conjuntos de sondas iniciadoras fraccionarias no optimizadas.

Mediante el uso de sondas estándar (Esquema A), la unión no específica de la sonda conduce a un fondo amplificado, lo que resulta en una baja relación señal/fondo. Mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) (Esquema E), la supresión automática del fondo durante ambas etapas del protocolo garantiza que la unión no específica de la sonda no conduzca a un fondo amplificado, lo que resulta en una alta relación señal/fondo incluso mediante el uso de un conjunto de sondas iniciadoras fraccionarias no optimizadas. La propiedad de supresión automática del fondo de las sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como

iniciador dividido) (Esquema E) es extremadamente beneficiosa cuando se mapea el patrón de expresión de un nuevo ARNm diana, permitiendo la rápida generación de resultados de alta calidad sin requerir la tediosa optimización del conjunto de sondas iniciadoras fraccionarias (es decir, la eliminación de las sondas malas que se han observado que se unen de forma no específica en la muestra).

- 5 Los beneficios de la supresión de fondo activa se ilustran en la Figura 6, que representa la obtención de imágenes de ARNm diana en embriones de pollo montados en su totalidad mediante el uso de conjuntos de sondas iniciadoras fraccionarias no optimizadas con sondas estándar (Esquema A) o sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) (Esquema E). Diana ARNm Dmbx1: Embrión en Etapa HH 7; diana ARNm Sox8: Embrión en Etapa HH10. Con las sondas estándar (Esquema A), se observó una baja relación señal/fondo mediante el uso de un conjunto de sondas iniciadoras fraccionarias no optimizadas debido a la unión inespecífica de la sonda, lo que llevó a la generación de un fondo amplificado. Con las sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) (Esquema E), se consigue una alta relación señal/fondo incluso mediante el uso de un conjunto de sondas iniciadoras fraccionarias no optimizadas; las sondas que se unen de forma no específica en la muestra no colocan las dos mitades del iniciador de HCR, y por lo tanto no activan la amplificación de la señal de HCR, evitando la generación de fondo amplificado. El Esquema A utiliza un conjunto de sondas que contiene 12 sondas no estructuradas, cada una de las cuales contiene un sitio de unión a la diana para una subsecuencia diferente del ARNm diana. El Esquema E utiliza un conjunto de sondas iniciadoras fraccionarias que contienen 12 pares de sondas; estos 12 pares se dirigen a las mismas subsecuencias diana que las 12 sondas del Esquema A. Imágenes de referencia de GEISHA (Darnell, D.K., Kaur, S., Stanislaw, S., Davey, S., Konieczka, J.H., Yatskievych, T.A., y Antin, P.B. (2007). GEISHA: *An In situ hybridization gene expression resource for the chicken embryo. Cytogenet. Genome Res.* 117:30 a 35).

## Ejemplo 2

- 25 Iniciación cooperativa de HCR mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) (Esquema E)(FIG. 7). (a) Mecanismo de HCR activado por un iniciador de HCR completo I1. Las horquillas fluorescentes metafísicas se autoensamblan en polímeros de amplificación fluorescentes tras la detección de un iniciador afín. El iniciador I1 se nuclea con el primer monómero de horquilla (horquilla H1) a través de un apareamiento de bases con el punto de apoyo monocatenario 'a', que media una migración de rama que abre la horquilla para formar el complejo I1 H1 que contiene el segmento monocatenario 'c'-b'. Este complejo se nuclea con el segundo monómero de horquilla (horquilla H2) por medio del emparejamiento de bases con el punto de apoyo 'c', que media una migración de rama que abre la horquilla para formar el complejo 11 H2 que contiene el segmento monocatenario 'b'-a'. De este modo, la secuencia del iniciador se regenera, para proporcionar la base para una reacción en cadena de etapas de polimerización H1 y H2 alternados. Las estrellas denotan los fluorocromos. La punta de la flecha denota el extremo 3' de cada cadena. (b) Colocalización mediada por la diana de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) (Esquema E). Las sondas P1 y P2 del iniciador fraccionario (también conocido como iniciador dividido) llevan cada una la mitad del iniciador de HCR I1. La unión selectiva de P1 y P2 al ARNm diana colocaliza las dos mitades del iniciador I1 de la HCR, lo que permite la iniciación cooperativa de la cascada de amplificación de HCR del panel A.

- (c) Validación *in vitro* de la iniciación cooperativa de HCR mediante el uso de sondas iniciadoras divididas P1 y P2 (Esquema E). Condiciones de reacción: horquillas H1 y H2 a 0,5  $\mu$ M cada una (Carriles 1 a 7); oligos I1, P1, P2 y/o Diana a 5 nM cada uno (Carriles como se indica en el gel); tampón 5 SSCT; reacción de una noche a temperatura ambiente. Horquillas H1 y H2 etiquetadas con el fluorocromo Alexa 647. Escala de ADNds de 1 kb teñida previamente con SYBR Gold. Carril 1: Las horquillas metaestables H1 y H2 presentan una fuga mínima de sus estados cinéticos atrapados en ausencia del iniciador de HCR I1. Carril 2: Conversión completa de los monómeros H1 y H2 de la horquilla de HCR en polímero de amplificación en presencia del iniciador de HCR I1 (I1 como oligo). Carril 3: Fuerte conversión de las horquillas H1 y H2 en polímero en presencia de Target y de las sondas P1 y P2 del iniciador fraccionario, lo que demuestra la iniciación cooperativa de la HCR. Carriles 4 a 6: Conversión mínima de los monómeros H1 y H2 de la horquilla de HCR en polímero en presencia de la sonda P1, la sonda P2 o ambas sondas P1 y P2, lo que demuestra una supresión de fondo activa. Carril 7: Conversión mínima de los monómeros de horquilla de HCR H1 y H2 en polímero en presencia de la Diana sola. (d) Cuantificación de las bandas de polímero en el panel c. Se utilizó el software Multi Gauge (Fuji Photo Film) para calcular el perfil de intensidad de Alexa 647 que rodea la banda de polímero para los carriles 1 a 7. Cada perfil de intensidad se muestra para  $\pm$  3 mm de distancia de migración del gel con el valor del pico centrado en 0. Los porcentajes de cuantificación se calcularon mediante el uso de Multi Gauge con autodetección de señal y fondo; los valores calculados se normalizaron al valor medido para el Carril 2.

- 55 El estudio de gel de la Figura 7c demostró la iniciación cooperativa de HCR mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) (Esquema E). El Carril 1 muestra que hay una fuga mínima de las horquillas H1 y H2 fuera de sus estados cinéticamente atrapados en ausencia del iniciador de HCR I1. Como control positivo, el Carril 2 demuestra la conversión de los monómeros de horquilla de HCR metaestables H1 y H2 en polímero en presencia del iniciador de HCR completo I1 (en el que I1 es un oligo simple).

- 60 Mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido), se observó una fuerte conversión de los monómeros metaestables de horquilla de HCR H1 y H2 en polímero si la diana estaba presente junto con las sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) P1 y P2. Sin embargo, se

observó una mínima conversión en polímero si P1 o P2 están presentes solos (Carriles 4 y 5), o si P1 y P2 están presentes juntos pero en ausencia de la Diana (Carril 6).

Estos resultados demostraron las propiedades de supresión de fondo activo de las sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) (Esquema E): las sondas que no se colocan por medio de hibridación selectiva a la diana predominantemente no desencadenan la amplificación de HCR. El hecho de que, en ausencia de la diana, P1 y P2 no desencadenen la HCR incluso cuando ambos están presentes en la solución (carril 6), indica que las sondas iniciadoras fraccionarias proporcionan una supresión automática del fondo incluso en ausencia de lavados.

### Ejemplo 3

La Figura 9 compara el rendimiento de las sondas estándar (Esquema A) y las sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) (Esquema E) a medida que se aumenta el tamaño del conjunto de sondas para la obtención de imágenes de una diana de ARNm en embriones de pollo de montaje completo. Para las pruebas con sondas estándar, se utilizó un conjunto de sondas optimizadas de 5 sondas, y luego estas sondas se aumentaron con sondas adicionales no optimizadas para formar conjuntos de sondas de 10 sondas y 20 sondas. Para las pruebas con sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido), se utilizaron conjuntos de sondas con 5, 10 y 20 pares de sondas, en el que cada par de sondas se dirige aproximadamente al mismo sitio de unión que la sonda estándar correspondiente. Mediante el uso de sondas estándar, el aumento del tamaño del conjunto de sondas dio lugar a un aumento sustancial del fondo (panel a) y a la correspondiente disminución de la relación señal/fondo, como resultado de que un subconjunto de las sondas adicionales se unen de forma no específica dentro de la muestra.

Estos datos ilustran la importancia de la optimización del conjunto de sondas mediante el uso de sondas estándar (Esquema A) que no proporcionan una supresión de fondo activa: si hay alguna sonda mala en el conjunto de sondas, ésta socavaría el rendimiento al generar un fondo amplificado. Por el contrario, mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) (Esquema E), a medida que el número de pares de sondas aumenta de 5 a 10 a 20, el fondo se mantiene aproximadamente constante (panel a) y la relación señal/fondo aumenta monotónicamente (panel b).

Estos datos ilustran el beneficio significativo de la supresión automática del fondo mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido): incluso si hay sondas malas en el conjunto de sondas iniciadoras fraccionarias, no generan un fondo amplificado, lo que hace que sea sencillo aumentar la relación señal/fondo por medio del aumento del número de sondas sin llevar a cabo la optimización del conjunto de sondas. En el panel c se muestran imágenes representativas mediante el uso de los conjuntos de sondas con 20 sondas (sondas estándar) o 20 pares de sondas (sondas iniciadoras fraccionarias (iniciador dividido)). En el panel d se muestran las distribuciones de intensidad de píxeles representativas para estas imágenes.

A continuación se proporciona un poco más de detalle para la FIG. 9, que presenta el fondo y la relación señal/fondo mediante el uso de sondas estándar (Esquema A) y sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) (Esquema E). (a) Fondo fluorescente mediante el uso de conjuntos de sondas con 5, 10 o 20 sondas (sondas estándar) frente a 5, 10 o 20 pares de sondas (sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido)). Las sondas estándar no optimizadas dieron lugar a una unión inespecífica de la sonda, lo que llevó a la generación de un fondo amplificado. Las sondas iniciadoras fraccionarias no optimizadas (también conocido como iniciador dividido) que se unen de forma no específica en la muestra no colocan las dos mitades del iniciador de HCR, y por lo tanto no desencadenan la amplificación de la señal de HCR, lo que evita la generación de fondo amplificado. (b) Relación señal/fondo para los conjuntos de sondas del panel a. Las sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) con supresión de fondo activa superaron a las sondas estándar no optimizadas en las mediciones de señal/fondo. (c) Micrografías confocales en la cresta neural de embriones de pollo fijados en su totalidad. Conjuntos de sondas: 20 sondas para las sondas estándar del Esquema A, 20 pares de sondas para las sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) del Esquema E. (d) Histogramas de intensidad de píxeles para Señal + Fondo (píxeles dentro del límite sólido en el panel c) y Fondo (píxeles dentro del límite discontinuo en el panel c). Para cada imagen, el número total de píxeles dentro de los límites sólidos y discontinuos es el mismo. Embriones fijados: etapa HH10. Diana: Sox10.

### Ejemplo 4

La Figura 10 muestra la obtención de imágenes de 4 ARNm diana en embriones de pollo montados en su totalidad con una alta relación señal/fondo mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias no optimizadas (también conocidas como iniciador dividido) (Esquema E).

Debido a la propiedad de supresión automática del fondo de las sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido), la relación señal/fondo oscila entre aproximadamente 25 y 60 para los cuatro ARNm diana sin llevar a cabo ninguna optimización del conjunto de sondas.

Figura 10. Imagen multiplexada de la expresión de ARNm con una alta relación señal/fondo en un embrión de pollo fijo de montaje completo mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) sin optimización del conjunto de sondas (Esquema E). (a) Esquemas de expresión de cuatro ARNm diana:

FoxD3, EphA4, Sox10, Dmbx1. (b) Micrografías confocales de cuatro canales en la cabeza y la cresta neural. (c) Zoom de la región representada en el panel b. (b) Cuatro canales individuales del panel c con mediciones de la relación señal/fondo. Conjuntos de sondas: 12 a 20 pares de sondas iniciadoras fraccionarias no optimizadas (también conocidas como iniciador dividido) por diana. Amplificadores: cuatro amplificadores de HCR ortogonales que llevan fluorocromos espectralmente diferentes (un amplificador de HCR por diana). Embrión fijado: etapa HH10.

### Ejemplo 5

La Figura 11 demuestra que la HCR *in situ* mediante el uso de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) (Esquema E) permite el análisis cuantitativo de la expresión de ARNm con resolución subcelular dentro de embriones de pollo montados en su totalidad.

Cada ARNm diana se detectó de forma redundante mediante el uso de dos conjuntos de sondas iniciadoras fraccionarias que desencadenaron cada una un amplificador de HCR espectralmente diferente. El trazado de un gráfico de dispersión de 2 canales de las intensidades normalizadas de los vóxeles dio como resultado una estrecha relación lineal con una intercepción de aproximadamente cero, lo que indica que la señal de HCR se escala linealmente con el número de ARNm diana por vóxel de imagen. La exactitud mejora a medida que la distribución se vuelve lineal y el intercepto desaparece; la precisión mejora a medida que la dispersión se hace más estrecha. Los vóxeles de 2×2 µm proporcionaron una resolución subcelular.

Estos resultados demuestran que la HCR *in situ* con sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) permite una cuantificación relativa exacta y precisa de la expresión de ARNm con resolución subcelular en un contexto anatómico sin necesidad de optimizar el conjunto de sondas.

Figura 11. Imágenes cuantitativas de la expresión de ARNm con resolución subcelular en embriones de pollo fijados en su totalidad. (a) Detección redundante de dos canales de ARNm diana. Dianas: Dmbx1 y EphA4. Microscopía confocal: 0,2×0,2 µm píxeles. Conjuntos de sondas: 20 pares de sondas iniciadoras fraccionarias (también conocidas como iniciador dividido) por canal para cada diana. Amplificadores: dos amplificadores de HCR ortogonales que llevan fluorocromos espectralmente diferentes para cada diana. Embriones fijados: etapa HH10. (b) Señal normalizada altamente correlacionada (coeficiente de correlación de Pearson, r) para vóxeles de 2×2 µm en las regiones seleccionadas del panel b.

### Referencias

1. Gall JG & Pardue ML (1969) *Formation and Detection of RNA-DNA Hybrid Molecules in Cytological Preparations*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63:378 a 383.
2. Cox KH, Deleon DV, Angerer LM, & Angerer RC (1984) *Detection of mRNAs in Sea Urchin Embryos by Insitu Hybridization Using Asymmetric RNA Probes*. Dev. Biol. 101(2):485 a 502.
3. Tautz D & Pfeifle C (1989) *A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in Drosophila embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback*. Chromosoma 98:81 a 85.
4. Rosen B & Bedington RSP (1993) *Whole-Mount Insitu Hybridization in the Mouse Embryo: Gene-Expression in three Dimensions*. Trends Genet 9(5):162 a 166.
5. Wallner G, Amann R, & Beisker W (1993) *Optimizing Fluorescent In situ Hybridization with rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for Flow Cytometric Identification of Microorganisms*. Cytometry 14(2):136 a 143.
6. Nieto MA, Patel K, & Wilkinson DG (1996) *Análisis de hibridación in situ de embriones de pollito en secciones de montaje completo y de tisú*. Methods Cell Biol, (Academic Press), Vol. 51, págs. 219 a 235.
7. Thisse C & Thisse B (2008) *High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos*. Nat. Protoc. 3(1):59 a 69.
8. Kislauskis EH, Li Z, Singer RH, & Taneja KL (1993) *Isoform-Specific 3'-Untranslated Sequences Sort  $\alpha$ -Cardiac and  $\beta$ -Cytoplasmic Actin Messenger RNAs to Different Cytoplasmic Compartments*. J. Cell Biol. 123(1):165 a 172.
9. Femino A, Fay FS, Fogarty K, & Singer RH (1998) *Visualization of Single RNA Transcripts In Situ*. Science 280(5363):585 a 590.
10. Levsky JM, Shenoy SM, Pezo RC, & Singer RH (2002) *Single-Cell Gene Expression Profiling*. Science 297:836 a 840.
11. Kosman D, et al. (2004) *Multiplex Detection of RNA Expression in Drosophila Embryos*. Science 305:846.
12. Capodici P, et al. (2005) *Gene Expression Profiling in Single Cells within Tissue*. Nat. Methods 2(9):663 a 665.
13. Chan PM, Yuen T, Ruf F, Gonzalez-Maeso J, & Sealfon SC (2005) *Method for Multiplex Cellular Detection of mRNAs Using Quantum Dot Fluorescent In Situ Hybridization*. Nucleic Acids Res 33(18):e 161.
14. Raj A, van den Bogaard P, Rifkin SA, van Oudenaarden A, & Tyagi S (2008) *Imaging Individual mRNA Molecules Using Multiple Singly Labeled Probes*. Nat. Methods 5(10):877 a 879.
15. Harland RM (1991) *Hibridación in situ: An Improved Whole -Mount Method for Xenopus Embryos*. Methods Cell Biol 36:685 a 695.
16. Lehmann R & Tautz D (1994) *In Situ Hybridization to RNA*. Methods Cell Biol, (Academic Press), Vol. 44, págs. 575 a 598.
17. Kerstens HMJ, Poddighe PJ, & Hanselaar AGJM (1995) *A Novel in-Situ Hybridization Signal Amplification Method Based on the Deposition of Biotinylated Tyramine*. J Histochem Cytochem 43(4):347 a 352.
18. Wiedorn KH, Kuhl H, Galle J, Caselitz J, & Vollmer E (1999) *Comparison of InSitu Hybridization, Direct and*

- Indirect In-Situ PCR as well as Tyramide Signal Amplification for the Detection of HPV. Histochem Cell Biol* 111:89 a 95.
19. Player AN, Shen LP, Kenny D, Antao VP, & Kolberg JA (2001) *Single -Copy Gene Detection Using Branched DNA (bDNA) In Situ Hybridization. J Histochem Cytochem* 49(5):603 a 611.
20. Pernthaler A, Pernthaler J, & Amann R (2002) *Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol.* 68(6):3094 a 3101.
21. Thisse B, et al. (2004) *Spatial and Temporal Expression of the Zebrafish Genome by Large-Scale In Situ Hybridization Screening. The Zebrafish: 2nd Edition Genetics Genomics and Informatics, Methods in Cell Biology*, eds Detrich III HWD, Zon LI, & Westerfield M (Elsevier Academic Press, San Diego, CA), Vol 77, págs. 505 a 519.
22. Denkers N, García-Villalba P, Rodesch CK, Nielson KR, & Mauch TJ (2004) *FISHing for Chick Genes: Triple-Label Whole-Mount Fluorescence In Situ Hybridization Detects Simultaneous and Overlapping Gene Expression in Avian Embryos. Dev. Dyn.* 229(3):651 a 657.
23. Zhou H, et al. (2004) *Two-Color, Rolling-Circle Amplification on Antibody Microarrays for Sensitive, Multiplexed Serum-Protein Measurements. Genome Biol.* 5(4):R28.
24. Larsson C, et al. (2004) *In Situ Genotyping Individual DNA Molecules by Target-Primed Rolling-Circle Amplification of Padlock Probes. Nat. Methods* 1(3):227 a 232.
25. Clay H & Ramakrishnan L (2005) *Multiplex Fluorescent In Situ Hybridization in Zebrafish Embryos Using Tyramide Signal Amplification. Zebrafish* 2(2):105 a 111.
26. Barroso-Chinea P, et al. (2007) *Detection of Two Different mRNAs in a Single Section by Dual In Situ Hybridization: A Comparison Between Colorimetric and Fluorescent Detection. J Neurosci. Methods* 162(1-2):119 a 128.
27. Acloque H, Wilkinson DG, & Nieto MA (2008) *In Situ Hybridization Analysis of Chick Embryos in Whole-Mount and Tissue Sections. Avian Embryology, 2nd Edition, Methods in Cell Biology*, ed Bronner-Fraser M (Elsevier Academic Press, San Diego, CA), Vol. 87, págs. 169 a 185.
28. Piette D, Hendrickx M, Willems E, Kemp CR, & Leyns L (2008) *An optimized procedure for whole-mount in situ hybridization on mouse embryos and embryoid bodies. Nat. Protoc.* 3(7):1194 a 1201.
29. Weiszmänn R, Hammonds AS, & Celniker SE (2009) *Determination of gene expression patterns using high-throughput RNA in situ hybridization to whole -mount Drosophila embryos. Nat. Protoc.* 4(5):605 a 618.
30. Larsson C, Grundberg I, Soderberg O, & Nilsson M (2010) *In Situ Detection and Genotyping of Individual mRNA Molecules. Nat. Methods* 7(5):395 a 397.
31. Wang F, et al. (2012) *RNAscope: A Novel in Situ RNA Analysis Platform for Formalin- Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. J. Mol. Diagnostics* 14(1):22 a 29.
32. Dirks RM & Pierce NA (2004) *Triggered Amplification by Hybridization Chain Reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(43):15275 a 15278.
33. Choi HMT, et al. (2010) *Programmable in situ amplification for multiplexed imaging of mRNA expression. Nat. Biotechnol.* 28(11):1208 a 1212.
34. Choi HMT, Beck VA, & Pierce NA (2014) *Next-generation in situ hybridization chain reaction: higher gain, lower cost, greater durability. ACS Nano* 8(5):4284 a 4294.
35. Shah S, et al. (2016) *Single-molecule RNA detection at depth via hybridization chain reaction and tissue hydrogel embedding and clearing. Development.*
36. Zhang HQ, Li F, Dever B, Li XF, & Le XC (2013) *DNA-Mediated Homogeneous Binding Assays for Nucleic Acids and Proteins. Chem. Rev.* 113(4):2812 a 2841.
37. Wang F, Lu CH, & Willner I (2014) *From Cascaded Catalytic Nucleic Acids to Enzyme- DNA Nanostructures: Controlling Reactivity, Sensing, Logic Operations, and Assembly of Complex Structures. Chem. Rev.* 114(5):2881 a 2941.
38. Jung C & Ellington AD (2014) *Diagnostic applications of nucleic acid circuits. Acc. Chem. Res.* 47(6):1825 a 1835.
39. Ikkal J, Lim GS, & Gao ZQ (2015) *The hybridization chain reaction in the development of ultrasensitive nucleic acid assays. Trac-Trends in Analytical Chemistry* 64:86 a 99.
40. McLennan R, et al. (2015) *Neural crest migration is driven by a few trailblazer cells with a unique molecular signature narrowly confined to the invasive front. Development* 142(11):2014 a 2025.
41. Huss D, et al. (2015) *Combinatorial analysis of mRNA expression patterns in mouse embryos using hybridization chain reaction. Protocols de Cold Spring Harbor Protocols.*
42. Rosenthal AZ, et al. (2013) *Localizing transcripts to single cells suggests an important role of uncultured deltaproteobacteria in the termite gut hydrogen economy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110(40):16163 a 16168.
43. Yamaguchi T, et al. (2015) *In situ DNA-hybridization chain reaction (HCR): a facilitated in situ HCR system for the detection of environmental microorganisms. Environmental Microbiology* 17(7):2532 a 2541.
44. Nikolakakis K, Lehnert E, McFall-Ngai MJ, & Ruby EG (2015) *Use of Hybridization Chain Reaction-Fluorescent In Situ Hybridization To Track Gene Expression by Both Partners during Initiation of Symbiosis. Appl. Environ. Microbiol.* 81(14):4728 a 4735.

## REIVINDICACIONES

## 1. Una composición que comprende:

un primer monómero de horquilla que comprende:

5 un primer dominio de entrada que comprende una primera porción de punto de apoyo y una primera sección de vástago, y  
un primer dominio de salida que comprende un primer bucle de horquilla y un complemento de la primera sección de vástago;

un segundo monómero de horquilla que comprende:

10 un segundo dominio de entrada que comprende una segunda porción de punto de apoyo y una segunda sección de vástago, y  
un segundo dominio de salida que comprende un segundo bucle de horquilla y un complemento de la segunda sección de vástago;  
una primera sonda iniciadora fraccionaria que comprende un primer iniciador fraccionario capaz de  
15 hibridarse con una primera porción del primer dominio de entrada; y  
una segunda sonda iniciadora fraccionaria que comprende un segundo iniciador fraccionario capaz de hibridarse con una segunda porción del primer dominio de entrada adyacente a dicha primera porción.

## 2. La composición de la reivindicación 1, en la que:

20 el primer monómero de horquilla además comprende un sitio de unión a la etiqueta que está configurado para hibridarse con un complemento del sitio de unión a la etiqueta, en el que el complemento del sitio de unión a la etiqueta además comprende una molécula reportera;  
la primera sección de vástago tiene la misma secuencia que la segunda sección de vástago;  
el complemento de la primera sección de vástago tiene la misma secuencia que el complemento de la segunda sección de vástago;  
25 el primer punto de apoyo es complementario al segundo bucle de horquilla;  
el segundo punto de apoyo es complementario al primer bucle de horquilla; o  
que además comprende una molécula diana que comprende una primera sección diana y una segunda sección diana, en la que la primera sonda iniciadora fraccionaria además comprende una primera sección de unión a la diana y la segunda sonda iniciadora fraccionaria además comprende una segunda sección de unión a la diana, en la que la primera sección de unión a la diana está configurada para unirse a la primera sección diana y la segunda sección de unión a la diana está configurada para unirse a la segunda sección diana.

## 3. Un procedimiento para llevar a cabo la Reacción en Cadena de Hibridación (HCR), el procedimiento comprende:

añadir a una muestra:

35 una primera sonda iniciadora fraccionaria que comprende un primer iniciador fraccionario capaz de hibridarse con una primera porción del primer dominio de entrada; y  
una segunda sonda iniciadora fraccionaria que comprende un segundo iniciador fraccionario capaz de hibridarse con una segunda porción del primer dominio de entrada adyacente a dicha primera porción, en el que juntos, el primer y el segundo iniciador fraccionario proporcionan un iniciador de HCR completo; y  
40 añadir un conjunto de monómeros de horquilla de HCR a la muestra para permitir que se produzca la HCR en presencia del iniciador de HCR completo, en el que el conjunto de monómeros de horquilla de HCR comprende:

un primer monómero de horquilla, que comprende un primer dominio de entrada que comprende una primera porción de sujeción y una primera sección de vástago, y un primer dominio de salida que comprende un primer bucle de horquilla y un complemento de la primera sección de vástago; y  
45 un segundo monómero de horquilla, que comprende un segundo dominio de entrada que comprende una segunda porción de sujeción y una segunda sección de vástago, y un segundo dominio de salida que comprende un segundo bucle de horquilla y un complemento de la segunda sección de vástago.

## 4. El procedimiento de la reivindicación 3, que comprende:

50 al menos una copia adicional del primer monómero de horquilla; en el que el primer dominio de salida es capaz de hibridarse con el segundo dominio de entrada y el segundo dominio de salida es capaz de hibridarse con el primer dominio de entrada;  
en el que tras la hibridación de los iniciadores fraccionarios con el primer dominio de entrada, el primer dominio de salida se hibrida con el segundo dominio de entrada, en el que el segundo dominio de salida se hibrida con el primer dominio de entrada de la al menos una copia adicional del primer monómero de horquilla; y  
55 una molécula diana que comprende una primera sección diana y una segunda sección diana, en la que la

primera sonda iniciadora fraccionaria además comprende una primera sección de unión a la diana, y la segunda sonda iniciadora fraccionaria además comprende una segunda sección de unión a la diana, en la que la primera sección de unión a la diana está configurada para unirse a la primera sección diana y la segunda sección de unión a la diana está configurada para unirse a la segunda sección diana, y en la que la primera sección de unión a la diana está configurada para unirse de forma adyacente a la segunda sección de unión a la diana; incubar para permitir la unión; y detectar una señal creada a través de HCR.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que:

- (a) la molécula diana comprende un nucleótido;
- (b) cuando la primera sonda iniciadora fraccionaria y la segunda sonda iniciadora fraccionaria se combinan con la molécula diana, la primera sonda iniciadora fraccionaria no unida y la segunda sonda iniciadora fraccionaria no unida se eliminan de una muestra que contiene la molécula diana por medio de un primer lavado, en el que tras el primer lavado la primera y la segunda sonda iniciadora fraccionaria colocalizadas en la molécula diana se unen al primer monómero de horquilla, que a su vez se une al segundo monómero de horquilla, lo que da lugar a la amplificación de HCR, y el monómero de horquilla no unido se elimina de la muestra que contiene la molécula diana; o
- (c) una cascada alternante de la unión del primer monómero de horquilla y la unión del segundo monómero de horquilla proporciona un evento de polimerización.

6. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que opcionalmente:

- (a) el procedimiento forma parte de un proceso *in situ* para obtener imágenes de ADN, ARN, proteínas o moléculas pequeñas, que incluyen la hibridación *in situ* de ADN (ISH), la hibridación *in situ* de ARN (ISH), la inmunohistoquímica de proteínas (IHC);
- (b) el procedimiento comprende un enfoque de dos etapas con un lavado después de cada etapa, y en el que la molécula diana se inmoviliza, y en el que la muestra se fija;
- (c) el procedimiento se aplica *in vitro* y en el que la molécula diana se inmoviliza en una perla o microarray;
- (d) el procedimiento es *in vitro* o *in vivo* y en el que la molécula diana no está inmovilizada;
- (e) el procedimiento comprende un protocolo de una sola etapa sin lavados;
- (f) la molécula diana es al menos una de las siguientes: ADN, ARN, proteínas, moléculas pequeñas o complejos de las mismas *in vitro*, *in situ* o *in vivo*;
- (g) el primer iniciador fraccionario forma parte de una primera sonda iniciadora fraccionaria que además comprende una primera sección de unión a la diana;
- (h) la molécula diana se selecciona del grupo que consiste en al menos una de las siguientes: ARNm, ARNm<sub>i</sub>, ARN<sub>in</sub>, ARN<sub>r</sub>, ARN no codificante y ADN genómico; o
- (i) en la que los monómeros de HCR comprenden un sitio de unión a la etiqueta.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que

- (A) cuando (b), una primera etapa es una etapa de detección que comprende la unión de sondas a una molécula diana y el lavado de la sonda no unida, y en la que una segunda etapa es una etapa de amplificación, en la que se produce la amplificación de HCR, seguida por el lavado de los monómeros de horquilla no polimerizados;
- (B) cuando (g), el segundo iniciador fraccionario forma parte de una segunda sonda iniciadora fraccionaria que además comprende una segunda sección de unión a la diana;
- (C) cuando (g), la primera sección de unión a la diana está configurada para unirse adyacente a la segunda sección de unión a la diana cuando la primera sonda iniciadora fraccionaria y la segunda sonda iniciadora fraccionaria están ambas unidas específicamente a la molécula diana; o
- (D) cuando (i), el procedimiento además comprende:

lavar la muestra para eliminar los monómeros de horquilla de HCR no polimerizados;  
añadir una sonda de etiquetado que comprende un complemento del sitio de unión a la etiqueta y una molécula reportera;  
lavar la sonda de etiqueta no unida; y  
detectar la presencia o ausencia de la molécula reportera.

8. El procedimiento de la reivindicación 3, que comprende:

proporcionar:

una primera molécula reportera asociada al primer monómero de horquilla;  
una segunda molécula reportera asociada al segundo monómero de horquilla; y  
una molécula diana; e

incubar la primera sonda iniciadora fraccionaria proporcionada y la segunda sonda iniciadora fraccionaria con la molécula diana.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que:

- (A) la incubación une la primera sonda iniciadora fraccionaria a la molécula diana y une la segunda sonda iniciadora fraccionaria a la molécula diana;
- (B) cuando (A), se lleva a cabo un lavado para eliminar la primera y la segunda sonda iniciadora fraccionaria no unidas de una muestra que contiene la molécula diana;
- (C) cuando (B), las sondas individuales del iniciador fraccionario que permanecen dentro de la muestra después del lavado y no están específicamente unidas a la molécula diana no activan la HCR;
- (D) cuando (B), en el que la muestra se lava para eliminar al menos del 50 al 99% de las sondas que no están unidas específicamente a la molécula diana.
- (E) que además comprende la unión de un primer monómero de horquilla adicional al segundo monómero de horquilla;
- (F) que además comprende la unión de un segundo monómero de horquilla adicional al primer monómero de horquilla adicional; o
- (G) la molécula diana además comprende una primera sección diana y una segunda sección diana, en la que la primera sonda iniciadora fraccionaria además comprende una primera sección de unión a la diana y la segunda sonda iniciadora fraccionaria además comprende una segunda sección de unión a la diana, en la que la primera sección diana está configurada para unirse a la primera sección de unión diana y la segunda sección diana está configurada para unirse a la segunda sección de unión diana.

10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que cuando (F), entonces:

- (i) hay al menos 10 primeros monómeros de horquilla adicionales;
- (ii) hay al menos 10 monómeros de segunda horquilla adicionales;
- (iii) hay al menos 100 primeros monómeros de horquilla adicionales; o
- (iv) hay al menos 100 monómeros de segunda horquilla adicionales.

11. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el procedimiento además comprende:

- a) unir el primer monómero de horquilla con el primer iniciador fraccionario y el segundo iniciador fraccionario;
- b) unir el segundo monómero de horquilla al primer monómero de horquilla; y
- c) detectar una señal.

12. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que cuando uno de (A) a (D), el procedimiento además comprende:

- a) unir el primer monómero de horquilla con el primer iniciador fraccionario y el segundo iniciador fraccionario;
- b) unir el segundo monómero de horquilla al primer monómero de horquilla; y
- c) detectar una señal.

13. El procedimiento de cualquiera de los procedimientos anteriores, en el que:

- (A) la molécula reportera es una molécula fluorescente;
- (B) la molécula reportera comprende una disposición inactivada o FRET, en la que una molécula fluorescente en un monómero de horquilla es activada cuando se alcanza una configuración de polímero por el primer y el segundo monómero de horquilla;
- (C) el primer y el segundo monómero de horquilla forman un par FRET cuando se combinan como polímero, en el que el par FRET se forma debido a un cambio en la inactivación o FRET que se produce cuando los monómeros de horquilla se abren y polimerizan;
- (D) la molécula reportera es una molécula reportera no fluorescente;
- (E) la molécula reportera es un elemento de tierras raras;
- (F) que además comprende al menos una sonda iniciadora fraccionaria adicional;
- (G) la molécula diana es cualquier molécula de ácido nucleico;
- (H) la molécula diana es una proteína;
- (I) la molécula diana está compuesta por una secuencia de aminoácidos;
- (J) la molécula diana está formada por un complejo de moléculas;
- (K) la primera sonda iniciadora fraccionaria comprende un polímero sintético y la segunda sonda iniciadora fraccionaria comprende un polímero sintético;
- (L) la primera sonda iniciadora fraccionaria comprende una secuencia de aminoácidos y la segunda sonda iniciadora fraccionaria comprende una secuencia de aminoácidos;
- (M) el primer y el segundo iniciador fraccionario se pueden emparejar en base con el primer monómero de horquilla; o
- (N) la primera sonda iniciadora fraccionaria comprende al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en ADN, ARN, 2'Ome-ARN, ARNL, análogo de ácido nucleico sintético, aminoácido, análogo de aminoácido sintético y ARP y la segunda sonda iniciadora fraccionaria comprende al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en ADN, ARN, 2'Ome-ARN, ARNL, análogo de ácido nucleico sintético, aminoácido, análogo de aminoácido sintético y ARP.

14. El procedimiento o composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

- (a) la unión denota hibridación;
- (b) la unión denota una interacción selectiva proteína-proteína; o
- (c) la unión denota una interacción selectiva ácido nucleico-proteína.

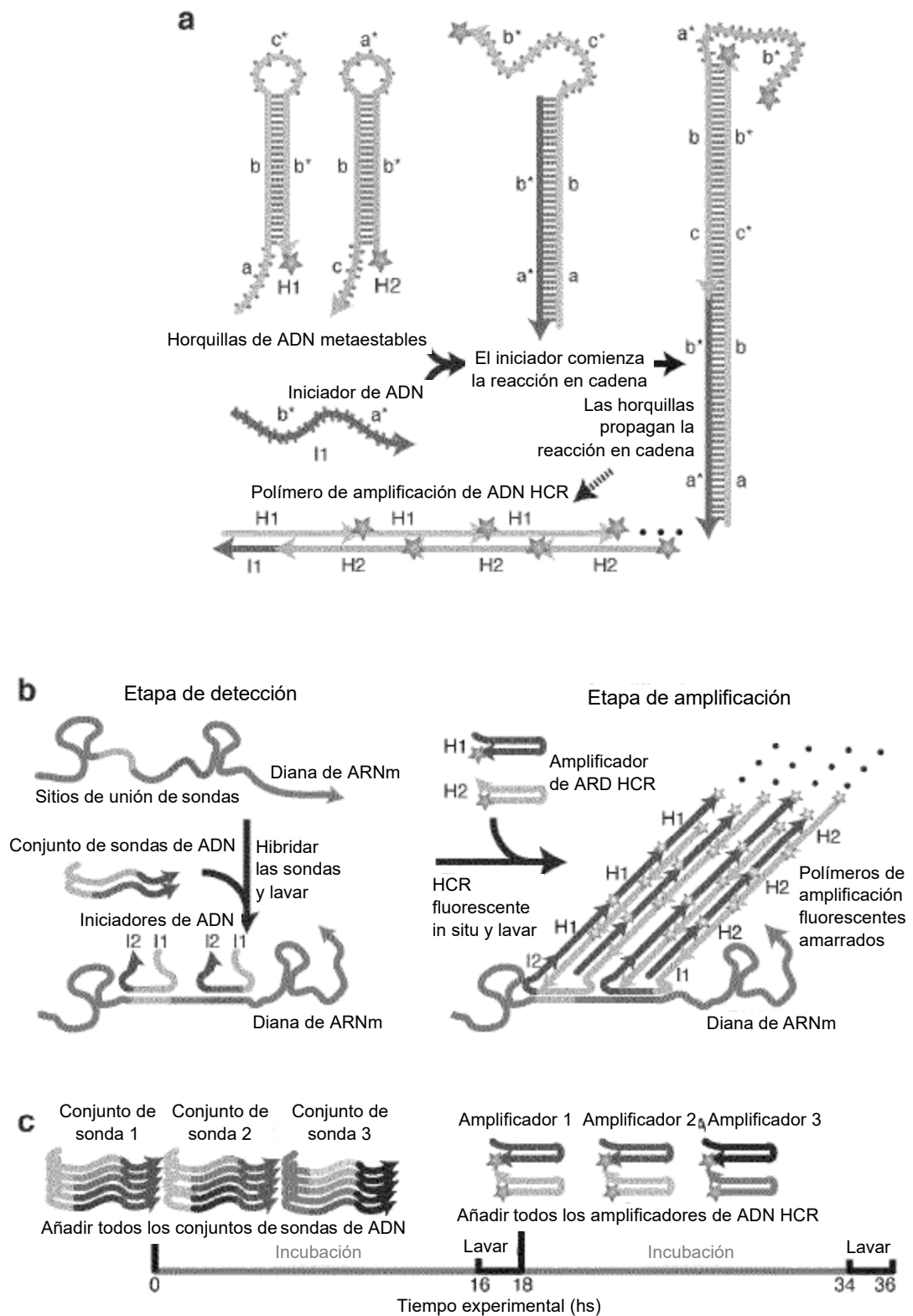
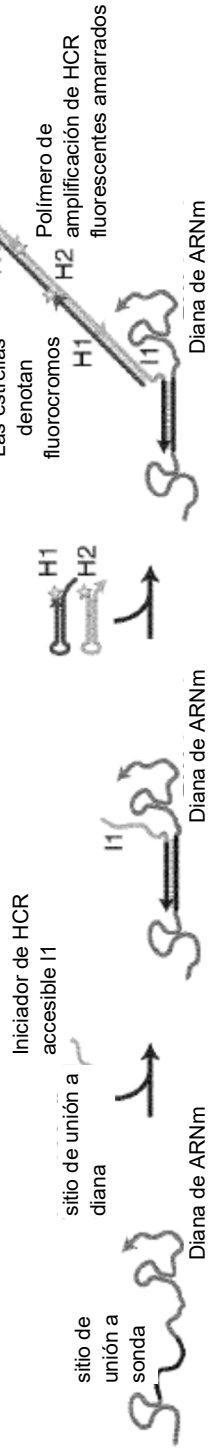


FIG. 1

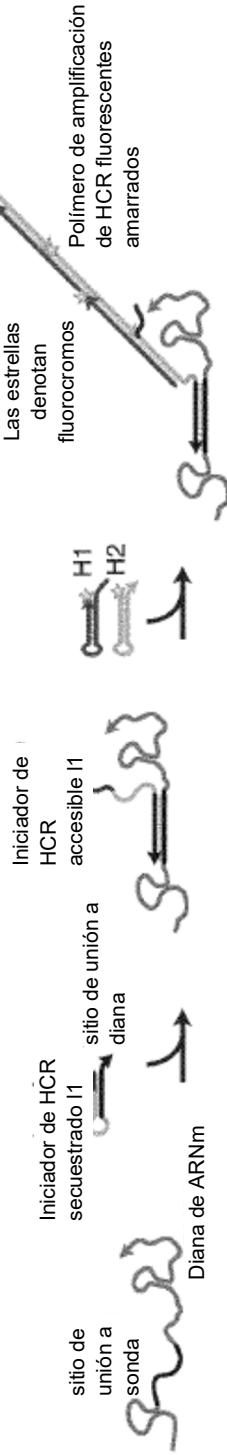
### Esquema A: Protocolo de dos etapas

Etapa 1: Detección de la diana mediante el uso de una sonda no estructurada



### Esquema B: Protocolo de dos etapas

Etapa 1: Detección de la diana mediante el uso de una sonda de horquilla



### Esquema C: Protocolo de tres etapas

Etapa 1: Detección de la diana mediante el uso de pares de sonda no estructurados

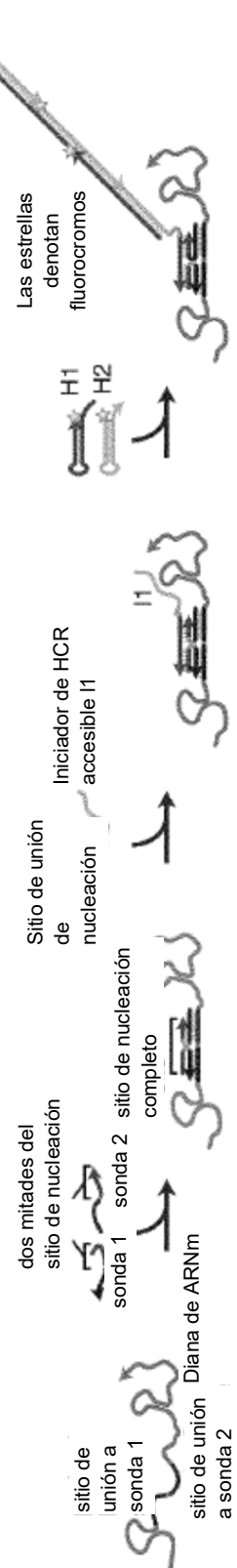
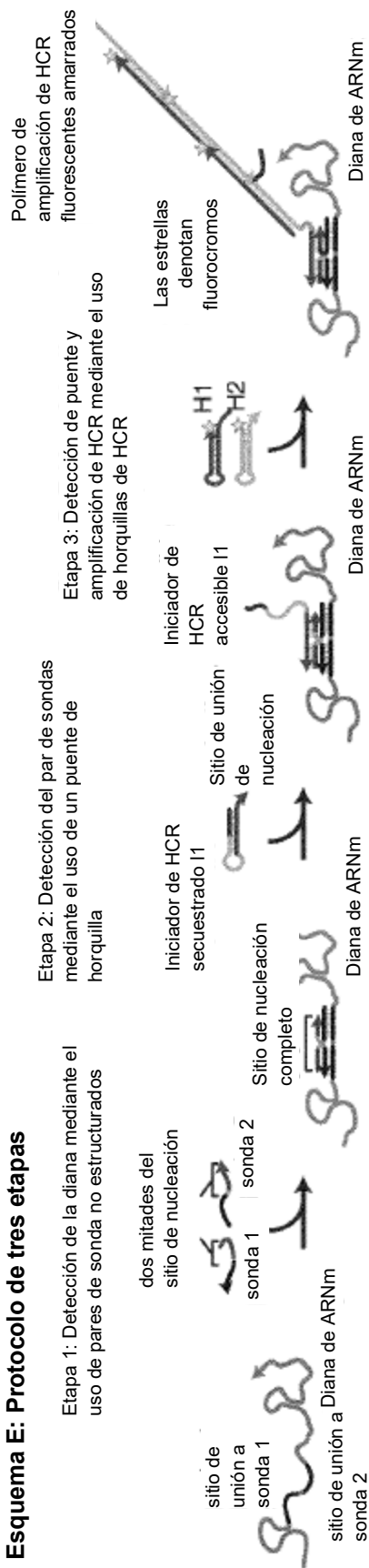


FIG. 2

### Esquema E: Protocolo de tres etapas



### Esquema E: Protocolo de dos etapas

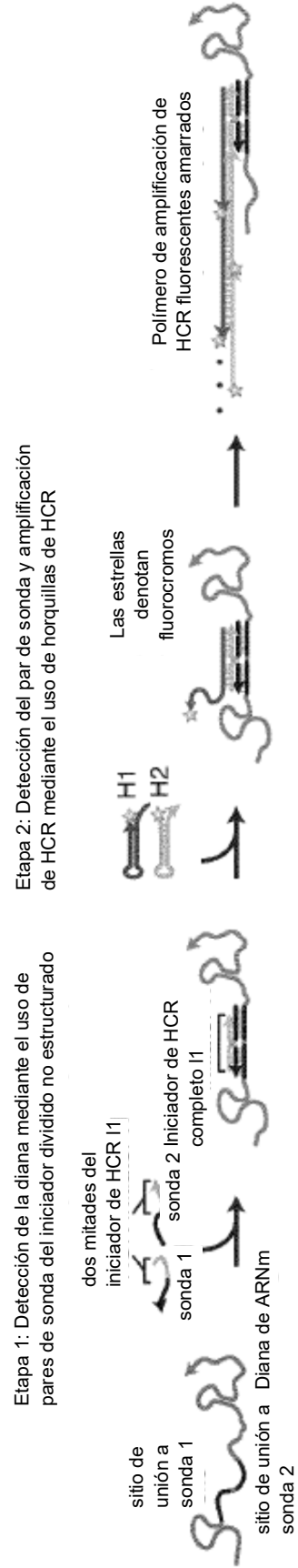
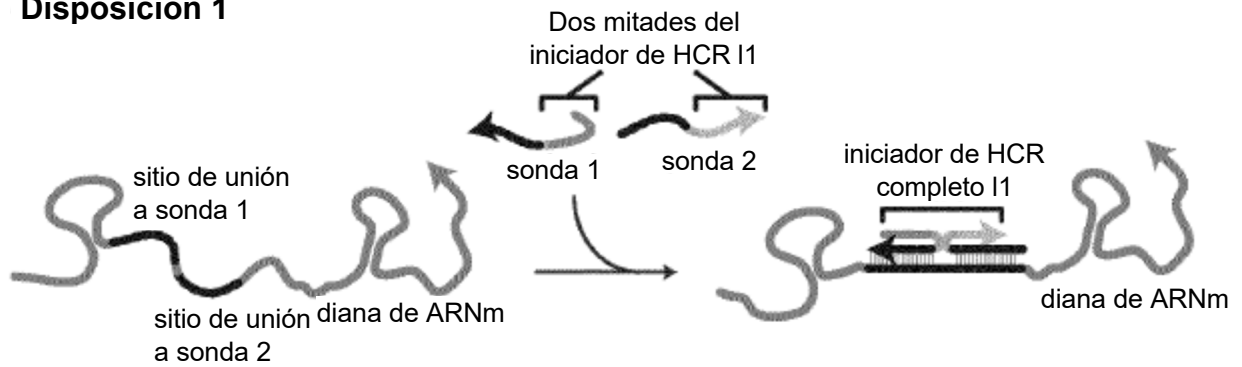
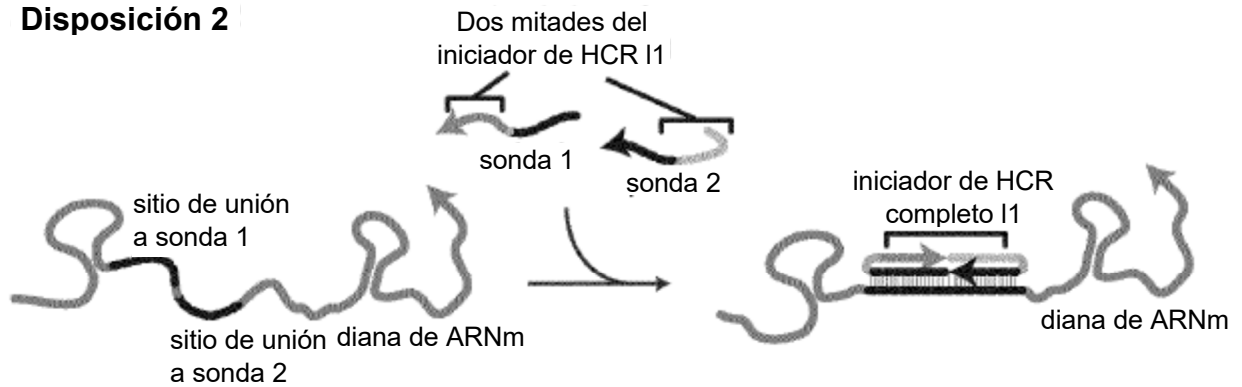


FIG. 2 CONTINUACIÓN

**Disposición 1**



**Disposición 2**



**Disposición 3**

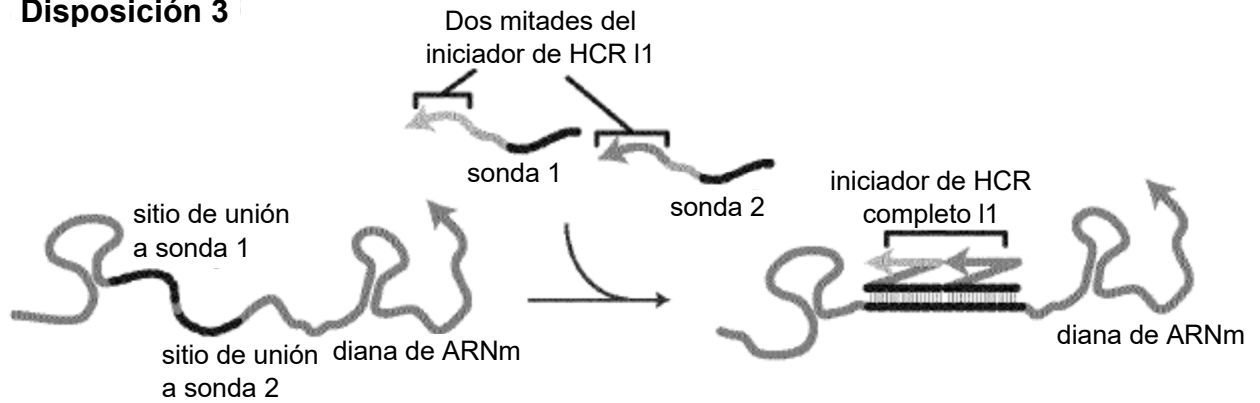
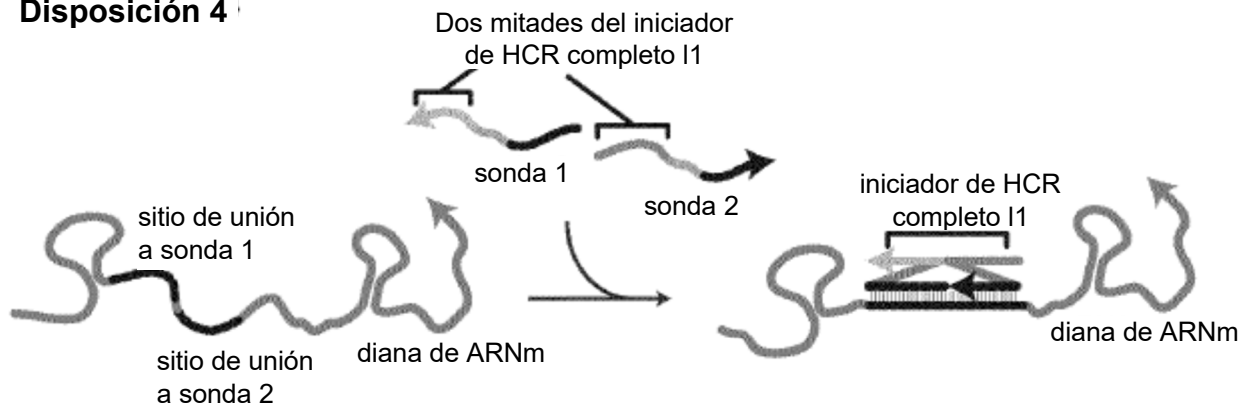


**FIG. 3**

**Disposición 4**



**Disposición 5**

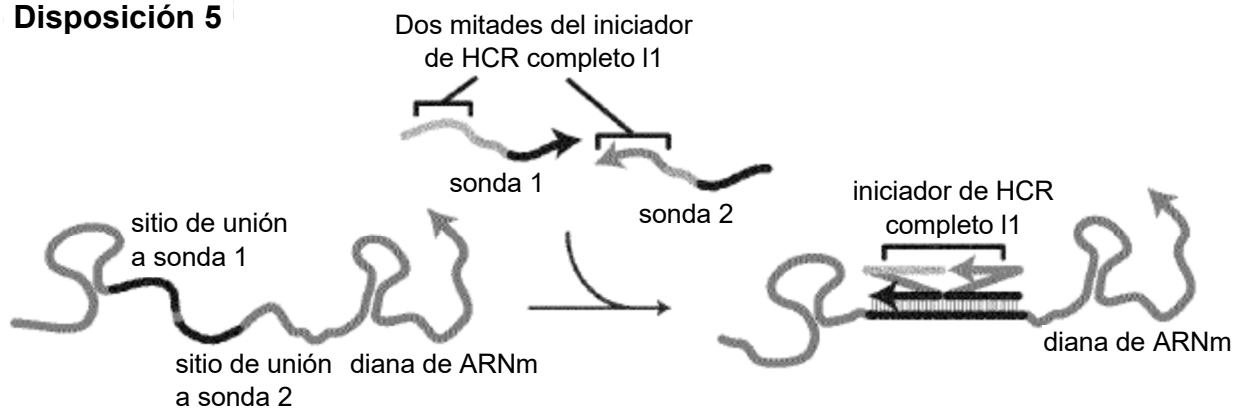


**FIG. 3 CONTINUACIÓN**

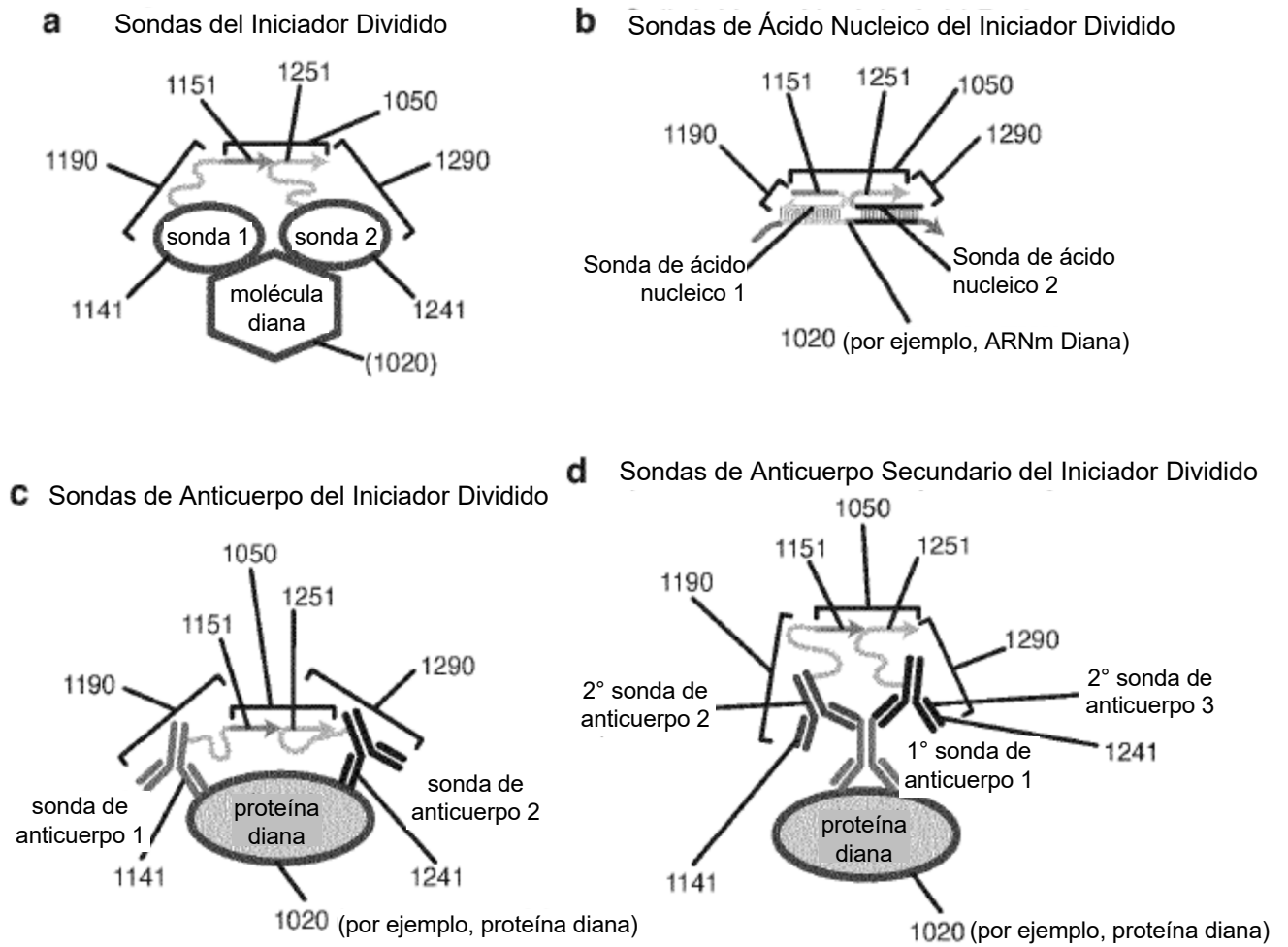


**FIG. 4**

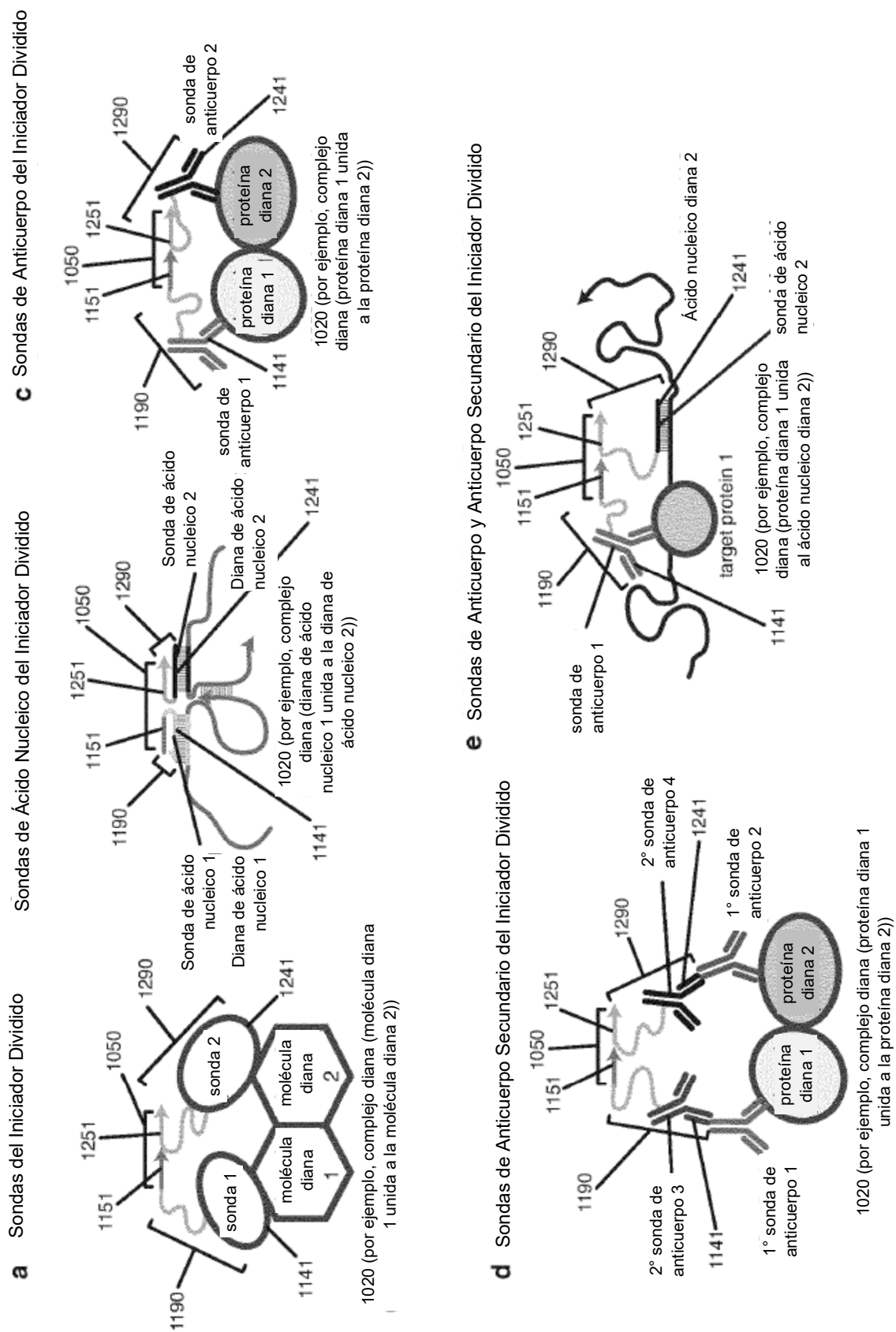


**FIG. 5**

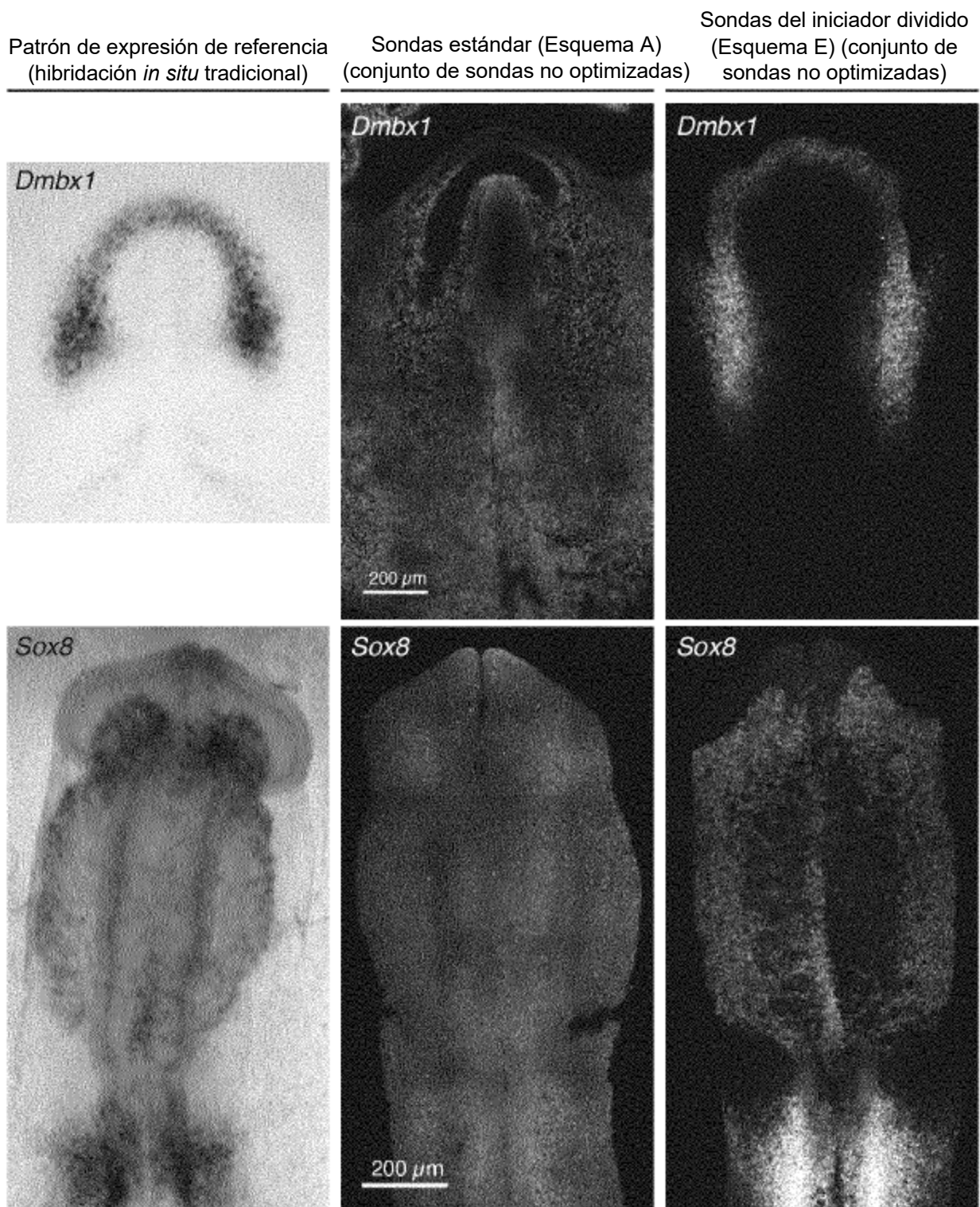


**FIG. 6**

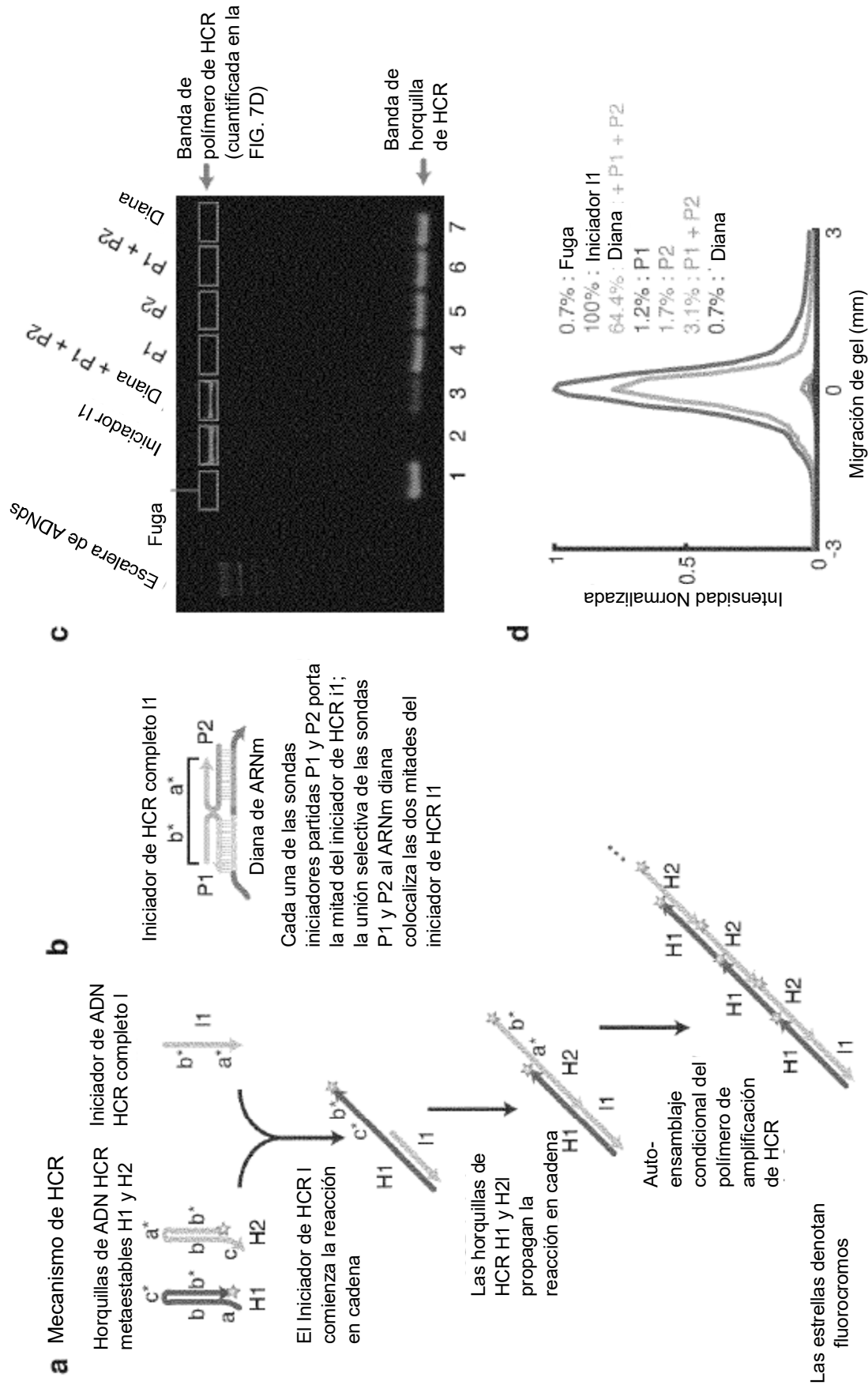
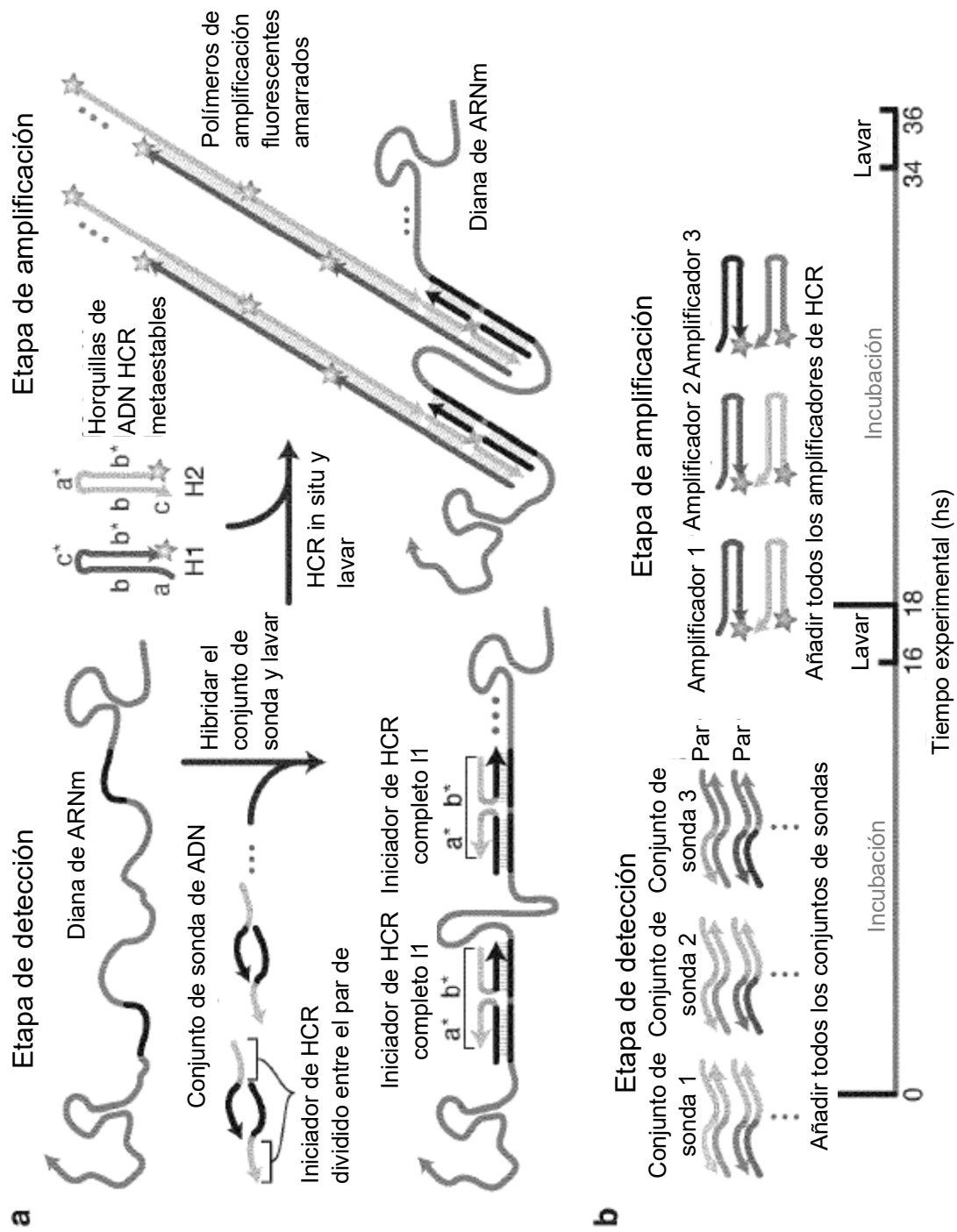
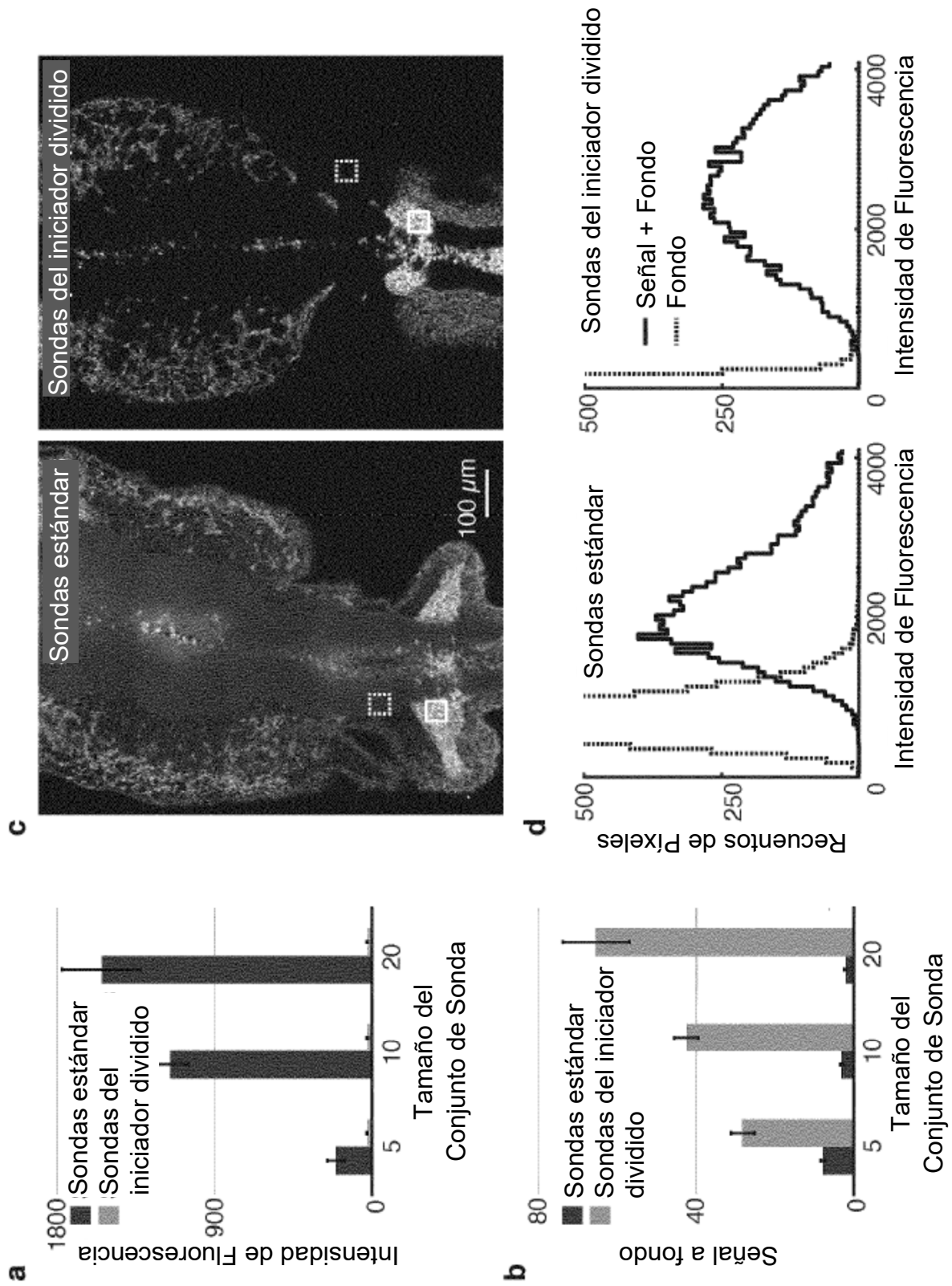


**FIG. 7**





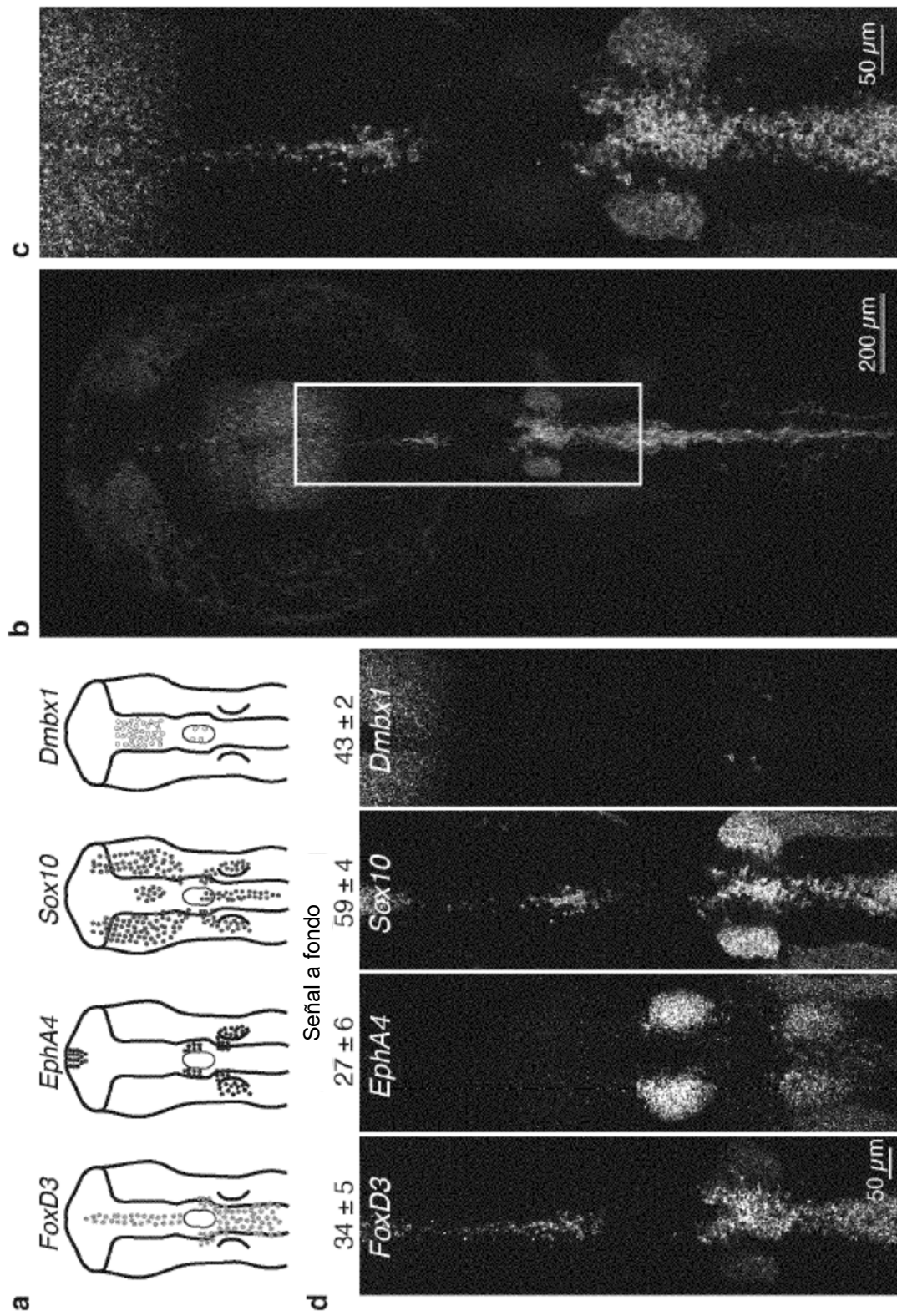


**FIG. 10**

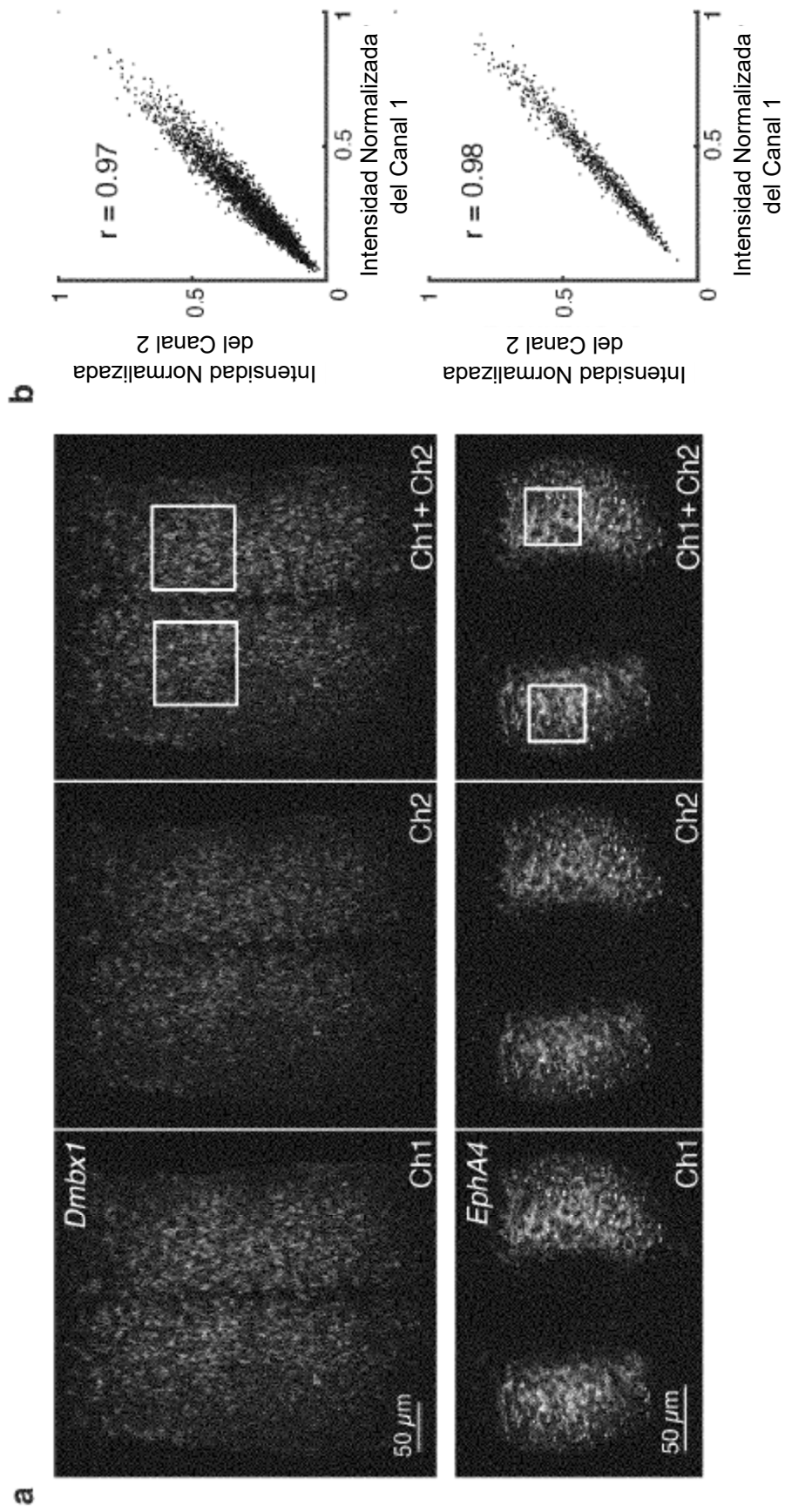


FIG. 11

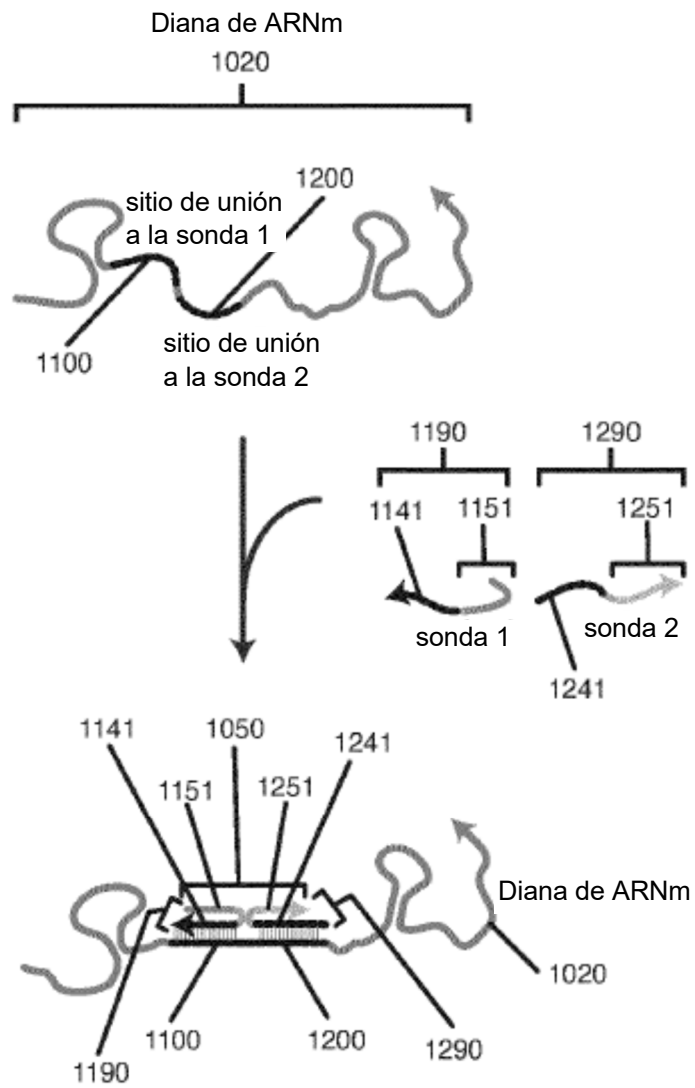


**FIG. 12**

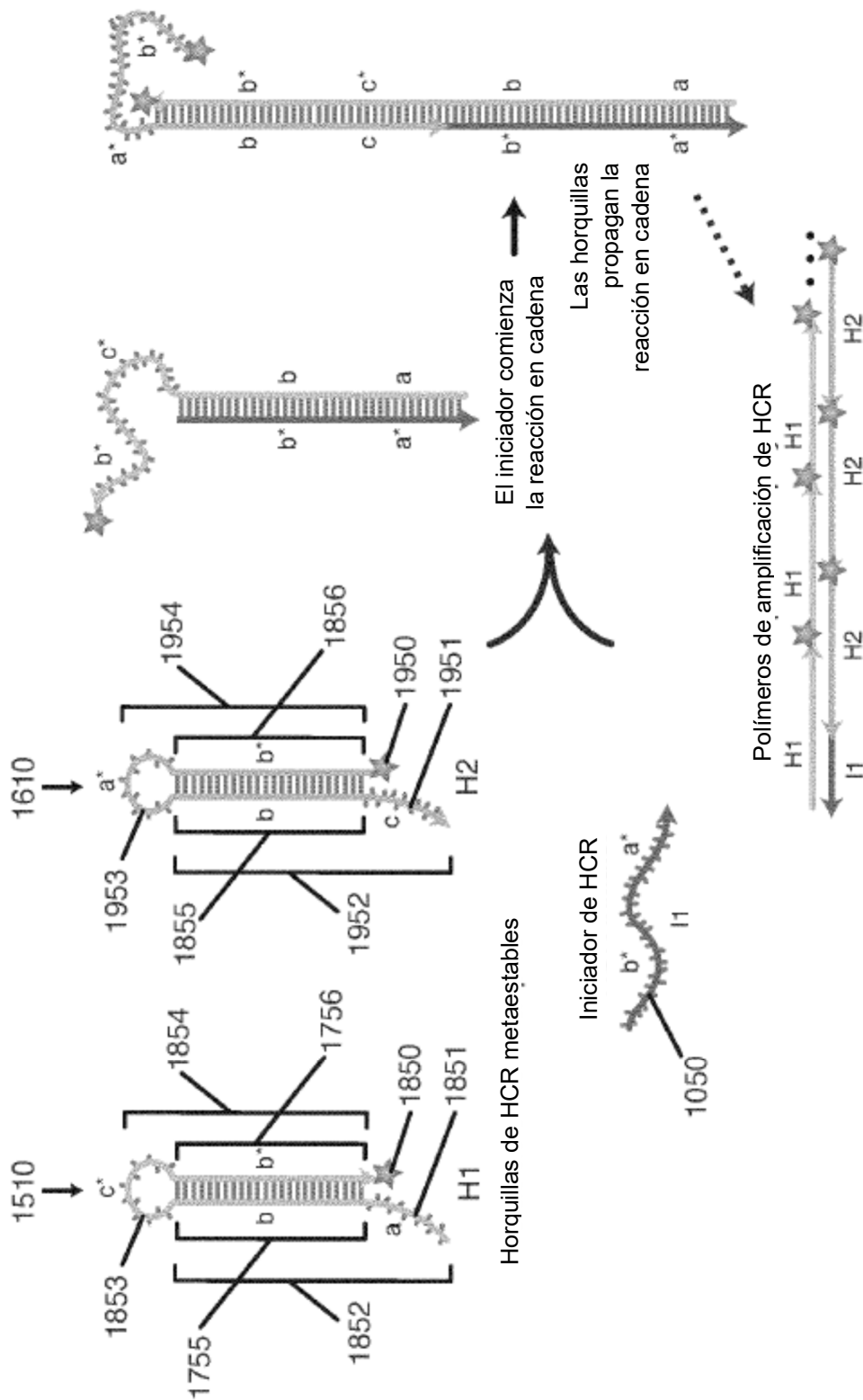


FIG. 13

# Mecanismo de HCR

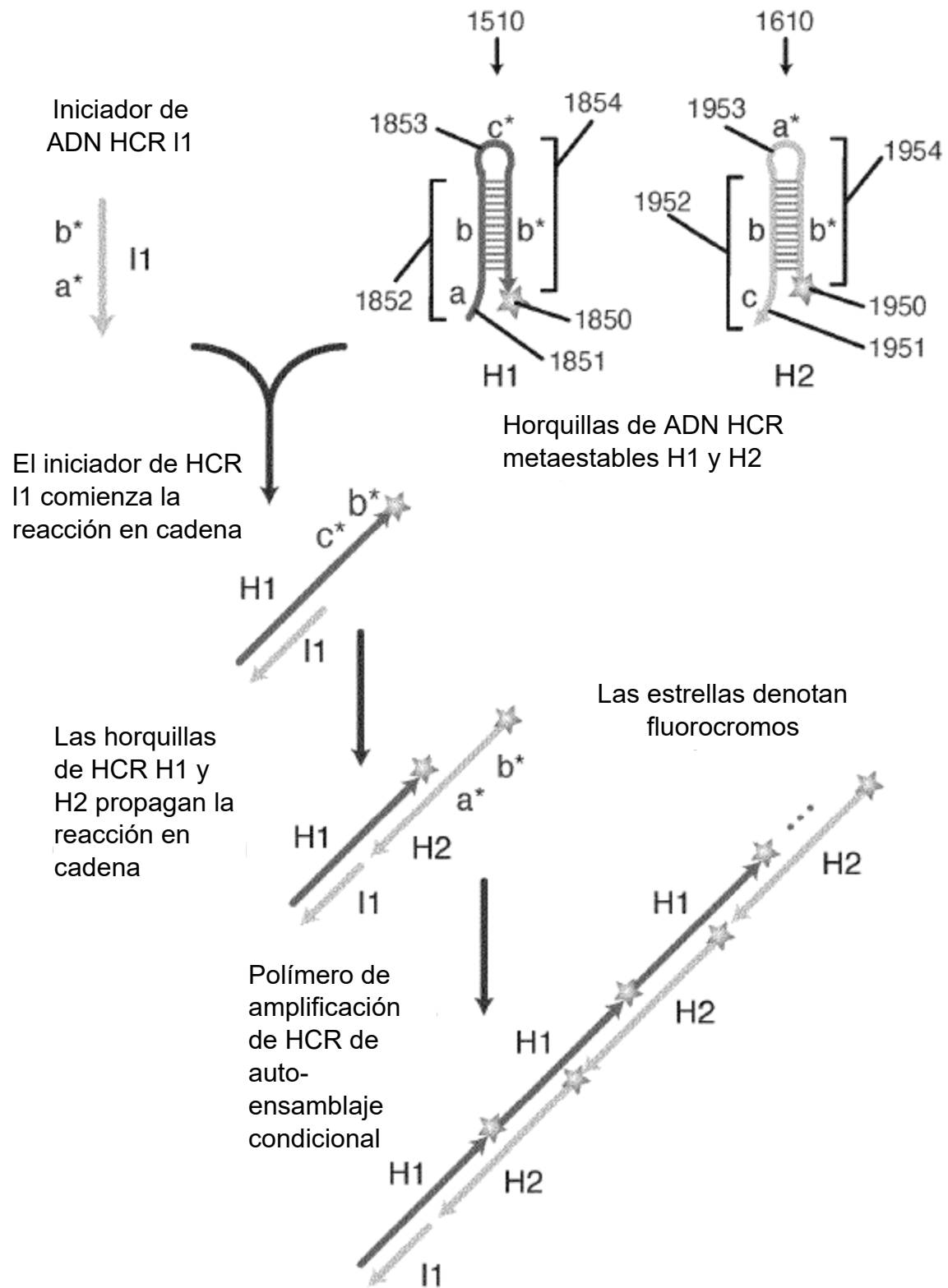


FIG. 14

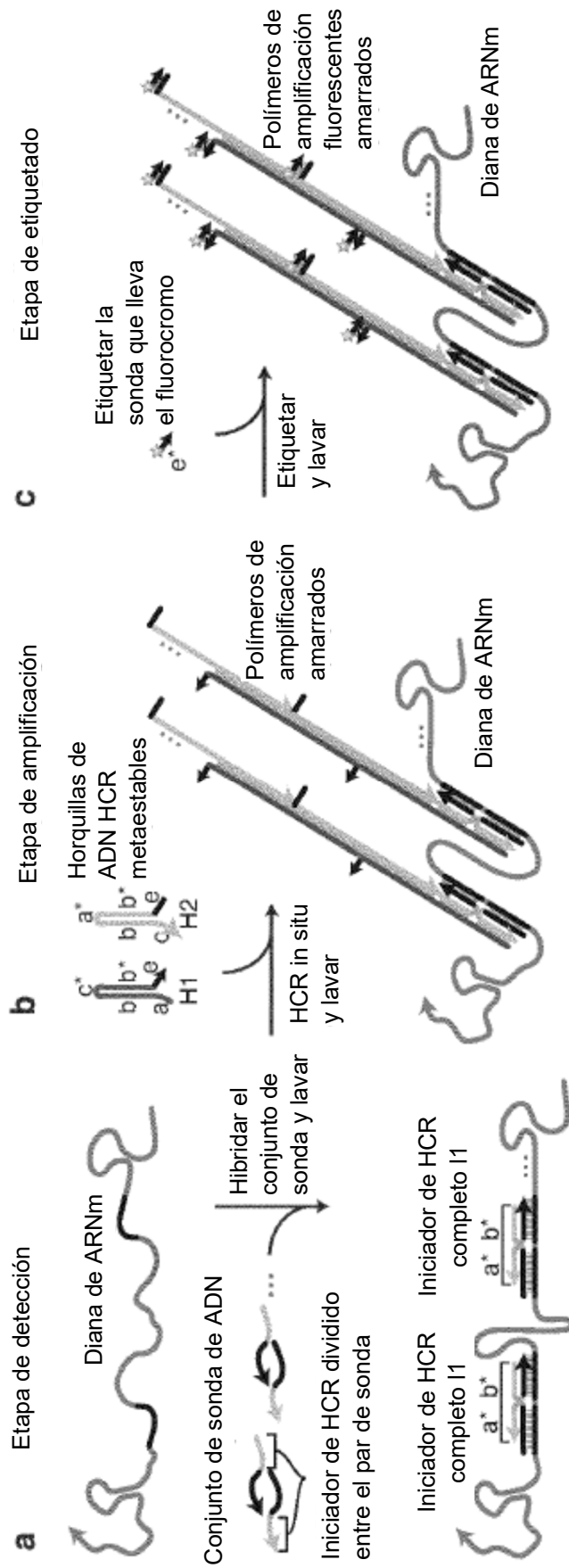


FIG. 15

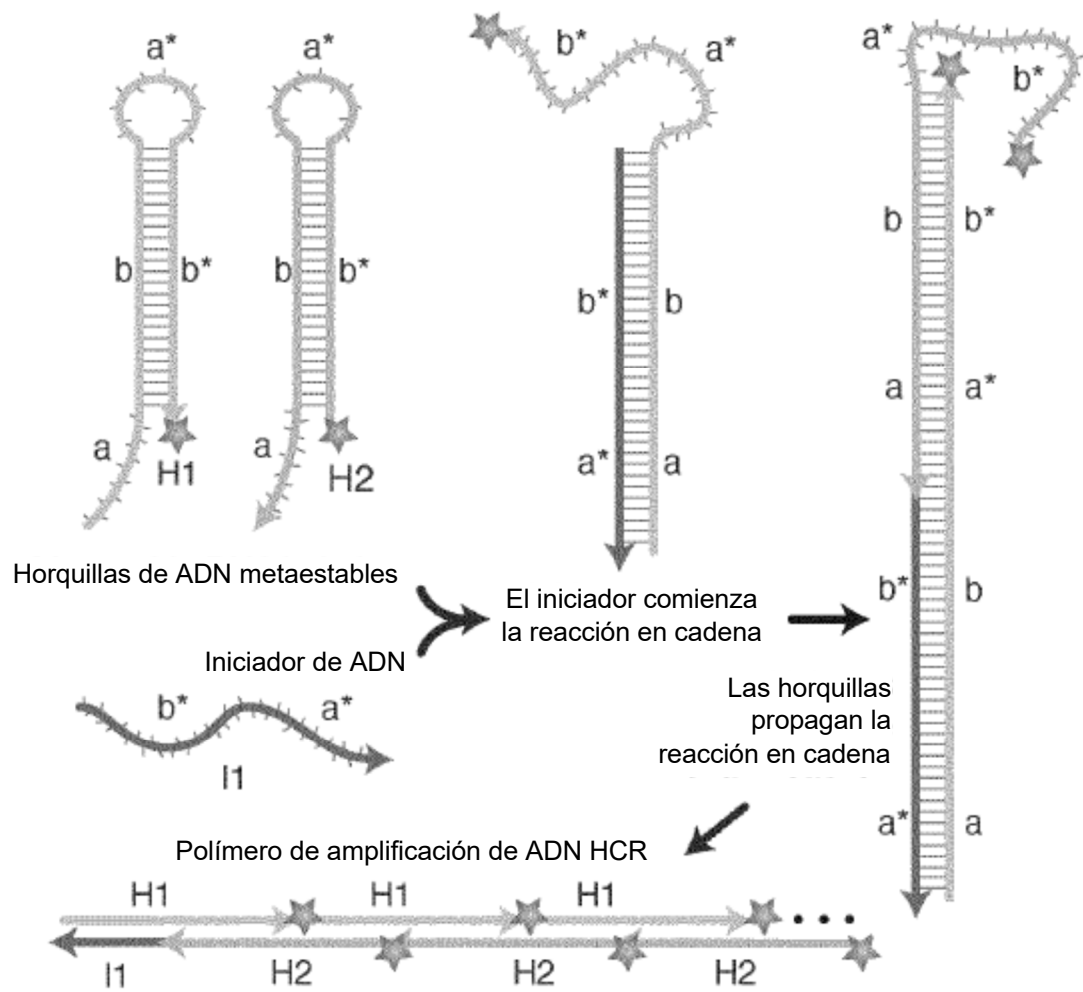


FIG. 16