

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 946 357**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6841 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2020 PCT/US2020/066720**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2021 WO21133849**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2020 E 20842882 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2023 EP 3891300**

54 Título: **Métodos para el análisis espacial usando ligación con molde de ARN**

30 Prioridad:

23.12.2019 US 201962952736 P
03.02.2020 US 202062969458 P
02.10.2020 US 202063087061 P
30.10.2020 US 202063108088 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2023

73 Titular/es:

10X GENOMICS, INC. (100.0%)
6230 Stoneridge Mall Road
Pleasanton, CA 94588-3260, US

72 Inventor/es:

CHELL, JAMES MICHAEL;
STOECKIUS, MARLON;
ALLES, JONATHAN;
GALLANT, CAROLINE JULIE;
GALONSKA, CHRISTINA;
BAVA, FELICE ALESSIO y
KATIRAE, LAYLA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 946 357 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

Métodos para el análisis espacial usando ligación con molde de ARN

5 **ANTECEDENTES**

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

La heterogeneidad espacial se ha estudiado previamente usando técnicas que normalmente proporcionan datos para un grupo de analitos en el contexto de tejido intacto o una porción de un tejido (por ejemplo, sección de tejido), o proporcionan datos de analito significativos procedentes de células individuales, pero no proporciona información sobre la posición de las células individuales de la muestra biológica de origen (por ejemplo, tejido).

En general, la selección de un analito particular en una muestra biológica utiliza una sonda de captura que selecciona como diana una secuencia de transcrito común, tal como una cola similar a un ARNm con poli(A). Sin embargo, este enfoque puede detectar un alto número de analitos fuera de la diana. Los métodos tales como la ligación con molde de ARN ofrecen una alternativa a la captura indiscriminada de una secuencia de transcrito común. Véase, por ejemplo, Yeakley, *PLoS One*, 25;12(5):e0178302 (2017). Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de desarrollar una alternativa a la captura de secuencia de transcrito común (por ejemplo, cola similar a ARNm con poli(A)) de analitos diana que pueda detectar un(os) analito(s) en un transcriptoma completo, a la vez que proporciona información sobre la ubicación espacial y la abundancia de un analito diana.

El documento WO2018/091676 da a conocer métodos para el marcaje espacial de moléculas de ácido nucleico de una especie biológica. El documento WO2017/019481 da a conocer composiciones y métodos de análisis de ARN.

30 **SUMARIO**

La presente invención proporciona un método para determinar la ubicación de un analito en una muestra biológica que comprende:

35 a) proporcionar la muestra biológica en una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende: (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura;

40 (b) poner en contacto una primera sonda y una segunda sonda con la muestra biológica, en donde la primera sonda y la segunda sonda comprenden cada una secuencias que son sustancialmente complementarias a las secuencias del analito, y en donde la segunda sonda comprende un dominio de captura de sonda de captura que es complementario a la totalidad o una porción del dominio de captura;

45 (c) hibridar la primera sonda y la segunda sonda con el analito;

(d) generar un producto de ligación ligando la primera sonda y la segunda sonda;

(e) liberar el producto de ligación del analito;

50 (f) hibridar el producto de ligación con el dominio de captura; y

(g) determinar (i) la totalidad o parte de la secuencia del producto de ligación unido al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) la totalidad o parte de la secuencia del código de barras espacial, o un complemento del mismo, y usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para determinar la ubicación del analito en la muestra biológica.

55 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende:

(a) una matriz espacial que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura;

60 (b) una muestra biológica en la matriz espacial en donde la muestra biológica comprende una pluralidad de analitos; y

(c) una primera sonda y una segunda sonda que están ligadas entre sí, en donde la primera sonda y la segunda sonda comprenden cada una, una o más secuencias que son sustancialmente complementarias a las secuencias del analito y en donde una de la primera o la segunda sonda comprende un dominio de captura de sonda de captura que se hibrida con el dominio de captura de la sonda de captura en la matriz espacial;

en donde la composición comprende además una enzima ARNasa H.

5 La captura de ARN dirigida es una alternativa atractiva a la captura de ARNm con poli(A) para analizar la expresión génica espacial en una muestra (por ejemplo, un tejido FFPE). En comparación con la captura de ARNm con poli(A), la captura de ARN dirigida tal como se describe en el presente documento se ve menos afectada por la degradación del ARN asociada con la fijación FFPE en comparación con los métodos que dependen de la captura de oligo-dT y la transcripción inversa de ARNm. La captura de ARN dirigida adicional tal como se describe en el presente documento permite la medición sensible de genes específicos de interés que de otro modo podrían pasarse por alto con un enfoque transcriptómico completo. La captura de ARN dirigida puede usarse para capturar un conjunto definido de moléculas de ARN de interés, o puede usarse a un nivel de transcriptoma completo, o cualquier cosa intermedia. Cuando se combina con los métodos espaciales dados a conocer en el presente documento, puede determinarse la ubicación y la abundancia de las dianas de ARN.

15 En un aspecto, esta divulgación presenta un método para determinar la ubicación de un analito en una muestra biológica que incluye: (a) proporcionar la muestra biológica en una matriz que incluye una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad incluye: (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura; (b) poner en contacto una primera sonda y una segunda sonda con la muestra biológica, donde la primera sonda y la segunda sonda incluyen cada una, una o más secuencias que son sustancialmente complementarias a las secuencias del analito, y donde la segunda sonda incluye un dominio de captura de sonda de captura; (c) hibridar la primera sonda y la segunda sonda con el analito; (d) generar un producto de ligación ligando la primera sonda y la segunda sonda; (e) liberar el producto ligado del analito; (f) hibridar el producto de ligación con el dominio de captura; y (g) determinar (i) la totalidad o una parte de la secuencia del producto de ligación unido al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) la totalidad o una parte de la secuencia del código de barras espacial, o un complemento del mismo, y usar la secuencia determinada de (i) y (ii) para identificar la ubicación del analito en la muestra biológica. En algunos casos, los métodos incluyen la determinación de la abundancia y ubicación del analito en la muestra biológica. En algunos casos, los métodos incluyen la determinación de la abundancia de un analito en una ubicación en la muestra biológica.

30 En algunas realizaciones, la primera sonda y la segunda sonda son sustancialmente complementarias a secuencias adyacentes del analito. En algunas realizaciones, la primera sonda y la segunda sonda se hibridan con secuencias que no son adyacentes entre sí en el analito.

35 En algunas realizaciones, el método incluye además hibridar una tercera sonda con la primera sonda y la segunda sonda, donde la tercera sonda incluye una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la primera sonda y una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la segunda sonda. En algunas realizaciones, la hibridación de la primera sonda y la segunda sonda con el analito se realiza a una primera temperatura. En algunas realizaciones, la hibridación de la tercera sonda con la primera sonda y la segunda sonda se realiza a una segunda temperatura. En algunas realizaciones, la primera temperatura es una temperatura mayor que la segunda temperatura. En algunas realizaciones, la primera temperatura es de desde aproximadamente 50°C hasta aproximadamente 75°C, desde aproximadamente 55°C hasta aproximadamente 70°C, o desde aproximadamente 60°C hasta aproximadamente 65°C. En algunas realizaciones, la segunda temperatura es de desde aproximadamente 15°C hasta aproximadamente 35°C, desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 30°C, o desde aproximadamente 25°C hasta aproximadamente 30°C. En algunas realizaciones, la primera sonda se extiende con una ADN polimerasa, llenando así un espacio entre la primera sonda y la segunda sonda y generando una primera sonda extendida.

45 En algunas realizaciones, la primera sonda incluye una secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito. En algunas realizaciones, la segunda sonda incluye además: (i) una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana del analito; (ii) una secuencia de ligador; (iii) una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a una tercera secuencia diana del analito; y (iv) un dominio de captura de sonda de captura que puede unirse a un dominio de captura de una sonda de captura. En algunas realizaciones, la primera secuencia diana del analito es directamente adyacente a la segunda secuencia diana del analito. En algunas realizaciones, la segunda secuencia diana no es directamente adyacente a la tercera secuencia diana en el analito. En algunas realizaciones, la segunda secuencia diana y la tercera secuencia diana están (i) en diferentes exones del analito o (ii) ubicadas dentro del mismo exón del analito pero no son adyacentes en el analito.

55 En algunas realizaciones, la segunda sonda incluye una secuencia que es sustancialmente complementaria a una tercera secuencia diana del analito. En algunas realizaciones, la primera sonda incluye: (i) una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito; (ii) una secuencia de ligador; y (iii) una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a la segunda secuencia diana del analito. En algunas realizaciones, la segunda secuencia diana es directamente adyacente a la tercera secuencia diana. En algunas realizaciones, la primera secuencia diana no es directamente adyacente a la segunda secuencia diana en el analito. En algunas realizaciones, la primera secuencia diana y la segunda secuencia diana están (i) en diferentes exones del analito o (ii) ubicadas dentro del mismo exón pero no son directamente adyacentes en el analito.

60

ES 2 946 357 T3

En algunas realizaciones, la secuencia de ligador incluye un total de aproximadamente 1 nucleótido a aproximadamente 100 nucleótidos. En algunas realizaciones, el ligador incluye además una secuencia de código de barras que sirve como sustituto para identificar el analito.

5 En algunas realizaciones, la primera sonda incluye al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3' y la segunda sonda incluye un nucleótido fosforilado en el extremo 5'.

10 En algunas realizaciones, generar un producto de ligación incluye ligar (i) la primera sonda a la segunda sonda o (ii) la primera sonda extendida a la segunda sonda usando ligación enzimática o ligación química, donde la ligación enzimática utiliza una ligasa. En algunas realizaciones, la ligasa es una o más de una ARN ligasa de T4 (Rnl2), una ligasa splintR, una ADN ligasa monocatenaria o una ADN ligasa de T4.

15 En algunas realizaciones, la segunda sonda incluye un grupo fosfato preadenilado en su extremo 5', y en donde la primera sonda incluye al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3'. En algunas realizaciones, la etapa de generar un producto de ligación incluye ligar un extremo 3' de la primera sonda al extremo 5' de la segunda sonda usando una ligasa que no requiere trifosfato de adenosina para la actividad ligasa. En algunas realizaciones, la ligasa se selecciona del grupo que consiste en: 5' AppADN/ARN ligasa termoestable, ARN ligasa 2 de T4 truncada, ARN ligasa 2 K227Q de T4 truncada, ARN ligasa 2 KQ de T4 truncada, ADN ligasa del virus Chlorella PBCV-1, o cualquier combinación de las mismas.

20 En algunas realizaciones, la primera sonda incluye además una secuencia funcional, donde la secuencia funcional es una secuencia de cebador.

25 En algunas realizaciones, el método incluye además proporcionar un resto de bloqueo del dominio de captura de sonda de captura que interacciona con el dominio de captura de sonda de captura. En algunas realizaciones, el método incluye además liberar el resto de bloqueo del dominio de captura de sonda de captura del dominio de captura de sonda de captura antes de la etapa (f). En algunas realizaciones, el dominio de captura de sonda de captura incluye una secuencia poliadenilada (poli(A)) o un complemento de la misma. En algunas realizaciones, el resto de bloqueo del dominio de captura de sonda de captura incluye una secuencia de poliuridina, una secuencia de politimidina o ambas. En algunas realizaciones, liberar la secuencia de poliuridina de la secuencia poli(A) incluye desnaturalizar el producto de ligación o poner en contacto el producto de ligación con una endonucleasa, exonucleasa o ribonucleasa. En algunas realizaciones, el dominio de captura de sonda de captura incluye una secuencia que es complementaria a la totalidad o a una porción del dominio de captura de la sonda de captura. En algunas realizaciones, el dominio de captura de sonda de captura incluye una secuencia degenerada.

35 En algunas realizaciones, la primera sonda y/o la segunda sonda es una sonda de ADN.

En algunas realizaciones, la tercera sonda es una sonda de ADN.

40 En algunas realizaciones, el resto de bloqueo del dominio de captura de sonda de captura es una sonda de ADN.

En algunas realizaciones, la etapa de liberación (f) incluye retirar la sonda ligada del analito.

45 En algunas realizaciones, la liberación de (i) el producto de ligación del analito o (ii) el resto de bloqueo del dominio de captura de sonda de captura del dominio de unión de dominio de captura incluye poner en contacto la sonda ligada con una endorribonucleasa. En algunas realizaciones, la endorribonucleasa es una o más de ARNasa H, ARNasa A, ARNasa C o ARNasa I. En algunas realizaciones, la ARNasa H incluye ARNasa H1, ARNasa H2 o ARNasa H1 y ARNasa H2.

50 En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de tejido. En algunas realizaciones, la muestra de tejido es una muestra de tejido fijada en formalina e incluida en parafina (FFPE), una muestra de tejido fresca o congelada. En algunas realizaciones, la muestra de tejido es la muestra de tejido FFPE y la muestra de tejido está desreticulada. En algunas realizaciones, la muestra biológica se tiñó previamente. En algunas realizaciones, la muestra biológica se tiñó previamente usando inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. En algunas realizaciones, la muestra biológica se tiñó previamente usando hematoxilina y eosina.

55 En algunas realizaciones, el método incluye además poner en contacto la muestra biológica con un agente de permeabilización, donde el agente de permeabilización se selecciona de un disolvente orgánico, un detergente y una enzima, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el agente de permeabilización se selecciona del grupo que consiste en: una endopeptidasa, una dodecilsulfato sódico (SDS) proteasa, terc-octilfenil éter de polietilenglicol, polisorbato 80 y polisorbato 20, disolución de sal sódica de N-lauroilsarcosina, saponina, Triton X-100™ y Tween-20™. En algunas realizaciones, la endopeptidasa es pepsina o proteinasa K.

60 En algunas realizaciones, el método incluye además, antes de la etapa (a), fijar la muestra biológica. En algunas realizaciones, la etapa de fijar la muestra biológica se realiza usando uno o ambos de metanol y acetona.

65 En algunas realizaciones, el analito incluye ARN. En algunas realizaciones, el ARN es un ARNm.

5 En algunas realizaciones, la etapa de determinación incluye amplificar la totalidad o parte del producto de ligación unido específicamente al dominio de captura. En algunas realizaciones, un producto de amplificación incluye (i) la totalidad o parte de la secuencia del producto de ligación unido específicamente al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) la totalidad o parte de la secuencia del código de barras espacial, o un complemento del mismo. En algunas realizaciones, la etapa de determinación incluye secuenciación. En algunas realizaciones, la etapa de secuenciación incluye secuenciación *in situ*, métodos de secuenciación de Sanger, métodos de secuenciación de próxima generación y secuenciación por nanoporos.

10 En otro aspecto, esta divulgación presenta un kit que incluye: (a) un sustrato que incluye una pluralidad de sondas de captura que incluyen un código de barras espacial y un dominio de captura; (b) un sistema que incluye: una pluralidad de primeras sondas y segundas sondas, donde una primera sonda y una segunda sonda incluyen cada una secuencias que son sustancialmente complementarias a un analito, y donde la segunda sonda incluye un dominio de unión de captura; y (c) instrucciones para realizar el método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

15 En otro aspecto, esta divulgación presenta un kit que incluye: (a) una matriz que incluye una pluralidad de sondas de captura; (b) una pluralidad de sondas que incluyen una primera sonda y una segunda, donde la primera sonda y la segunda sonda son sustancialmente complementarias a secuencias adyacentes de un analito, donde la segunda sonda incluye (i) un dominio de captura de sonda de captura que puede unirse a un dominio de captura de la sonda de captura y (ii) una secuencia de ligador; (c) una pluralidad de enzimas que incluyen una ribonucleasa y una ligasa; y (d) instrucciones para realizar el método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

20 En otro aspecto, esta divulgación presenta un kit que incluye: (a) una matriz que incluye una pluralidad de sondas de captura; (b) una pluralidad de sondas que incluyen una primera sonda y una segunda sonda, donde la primera sonda y la segunda sonda son sustancialmente complementarias a secuencias adyacentes de un analito, donde la segunda sonda incluye una secuencia de ligador, donde la segunda sonda incluye un dominio de captura de la sonda de captura que puede unirse a un dominio de captura de la sonda de captura; (c) una pluralidad de enzimas que incluyen una ribonucleasa y una ligasa; y (d) instrucciones para realizar el método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

25 En algunas realizaciones, el kit incluye una segunda sonda que incluye un grupo fosfato preadenilado en su extremo 5' y una ligasa que no requiere trifosfato de adenosina para la actividad ligasa.

30 En otro aspecto, esta divulgación presenta una composición que incluye una matriz espacial que incluye sondas de captura, donde las sondas de captura incluyen un código de barras espacial y un dominio de captura, una muestra biológica en la matriz espacial donde la muestra biológica incluye una pluralidad de analitos de interés, un primer oligonucleótido sonda y un segundo oligonucleótido sonda hibridados con un analito y ligados entre sí, donde el primer oligonucleótido sonda y el segundo oligonucleótido sonda incluyen cada uno una secuencia que es sustancialmente complementaria a secuencias adyacentes del analito y donde una de la primera sonda o la segunda sonda incluye un dominio de captura de sonda de captura.

35 En algunas realizaciones, la composición incluye además una enzima ARNasa H. En algunas realizaciones, la composición incluye además una ligasa. En algunas realizaciones, el oligonucleótido sonda que no incluye un dominio de captura de sonda de captura incluye un dominio funcional.

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

45 El término "cada uno", cuando se usa en referencia a un conjunto de elementos, pretende identificar un elemento individual en el conjunto, pero no se refiere necesariamente a todos los elementos del conjunto, a menos que se indique expresamente lo contrario, o a menos que el contexto del uso indique claramente lo contrario.

50 Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una o más células, comprendiendo mezclas de las mismas. "A y/o B" se usa en el presente documento para incluir todas las siguientes alternativas: "A", "B", "A o B" y "A y B".

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 Los siguientes dibujos ilustran determinadas realizaciones de las características y ventajas de esta divulgación. Estas realizaciones no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones adjuntas en modo alguno. Los símbolos de referencia similares en los dibujos indican elementos similares.

60 **La figura 1** muestra un flujo de trabajo de análisis espacial a modo de ejemplo.

65

- La figura 2** es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una sonda de captura con código de barras, tal como se describe en el presente documento.
- La figura 3** es un esquema que ilustra una sonda de captura escindible, en donde la sonda de captura escindida puede entrar en una célula no permeabilizada y unirse a analitos diana dentro de la muestra.
- La figura 4** es un diagrama esquemático de una característica con código de barras espacial multiplexada a modo de ejemplo.
- La figura 5** es un esquema que muestra la disposición a modo de ejemplo de las características de código de barras dentro de una matriz.
- La figura 6** es un diagrama esquemático que muestra un flujo de trabajo a modo de ejemplo para la ligación con molde de ARN.
- La figura 7** es un diagrama esquemático que muestra un flujo de trabajo a modo de ejemplo para capturar un producto de ligación en un sustrato que incluye sondas de captura.
- La figura 8** es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una primera sonda que incluye una secuencia de ligador y una segunda sonda.
- La figura 9** es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una segunda sonda que incluye una secuencia de ligador y una primera sonda.
- La figura 10** es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una primera sonda, una segunda sonda y una sonda de extensión.
- La figura 11** es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una ligación con molde de ARN usando un primer oligonucleótido sonda, un segundo oligonucleótido sonda y un tercer oligonucleótido sonda.
- Las figuras 12A-12E** muestran diversos enfoques para la ligación de ácidos nucleicos mediada químicamente. **La figura 12A** ilustra la formación de un enlace triazol. **La figura 12B** ilustra la formación de un enlace fosforotioato. **La figura 12C** ilustra la formación de un enlace amida. **La figura 12D** ilustra una formación de enlace fosforamido. **La figura 12E** ilustra una reacción de conjugación.
- La figura 13** muestra un flujo de trabajo de ligación con molde de ARN a modo de ejemplo.
- La figura 14** muestra los resultados de la PCR de enriquecimiento para la detección de diversas sondas. R1 = serie 1; R2 = serie 2. (1) representa la banda para el producto de ligación con sonda de captura. (2), (3) y (4) representan productos sin ligación.
- La figura 15** muestra la fracción de lecturas para diversas combinaciones de condiciones y sondas.
- Las figuras 16A-16B** muestran matrices de combinaciones de sondas específicas.
- Las figuras 17A-17C** muestran patrones de expresión génica en tejido cerebral de ratón usando recuentos de oligonucleótidos sonda totales (**figura 17A**), recuentos de oligonucleótidos sonda no específicos (**figura 17B**) y recuentos de oligonucleótidos sonda específicos de genes (**figura 17C**).
- Las figuras 18A-18E** muestran genes diana con expresión espacial en tejido cerebral de ratón.
- Las figuras 19A-19F** muestran patrones de expresión génica en tejido cerebral de ratón usando recuentos de oligonucleótidos sonda totales (**figura 19A**) y oligonucleótido sonda específico de genes (**figuras 19B-19F**).
- La figura 20A** muestra la mediana de los identificadores moleculares únicos (UMI) por célula frente a la media de lecturas por célula para diferentes condiciones de hibridación.
- La figura 20B** muestra la mediana de genes por célula frente a la media de lecturas por célula para diferentes condiciones de hibridación.
- La figura 21A** muestra la tinción con hematoxilina para una sección de una muestra de tejido de cáncer de mama triple positivo.
- La figura 21B** muestra la mediana de UMI por recuento de células frente a la media de lectura por célula para las diferentes condiciones.

La **figura 21C** muestra la proyección t-SNE de manchas en ocho agrupaciones diferentes.

La **figura 21D** muestra el mismo tejido de la **figura 21A** con diversas agrupaciones (n=8 agrupaciones) expresadas en distintas zonas del tejido.

La **figura 21E** muestran la expresión del receptor de estrógenos (ESR1).

La **figura 21F** muestran la expresión del receptor de estrógenos y el receptor de progesterona (PGR).

La **figura 21G** muestran la expresión de ERBB2, también conocido como HER2.

La **figura 22A** muestra la tinción con hematoxilina para una sección de una muestra de cáncer de ovario.

La **figura 22B** muestra la mediana de UMI por célula frente a la media de lectura por célula para las diferentes condiciones.

La **figura 22C** muestra el mismo tejido de la **figura 25A** con diversas agrupaciones (n=8 agrupaciones) expresadas en distintas zonas del tejido.

La **figura 22D** muestra la proyección t-SNE de puntos en ocho agrupaciones diferentes.

La **figura 23** muestra la mediana de UMI por célula frente a lecturas por célula para diferentes condiciones de desreticulación.

La **figura 24** muestra la mediana de UMI por célula frente a lecturas por célula (panel superior) y la mediana de genes por célula frente a lecturas por célula (panel inferior) para diferentes condiciones de tratamiento (ARNasa).

La **figura 25** muestra la mediana de UMI por célula frente a lecturas por célula (panel superior) y la mediana de genes por célula frente a lecturas por célula (panel inferior) para diferentes condiciones de tratamiento (tiempo y temperatura).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La captura de ARN dirigida es una alternativa atractiva a la captura de ARNm con poli(A) para analizar la expresión génica espacial en una muestra en tejido FFPE. En comparación con la captura de ARNm con poli(A), la captura de ARN dirigida se ve menos afectada por la degradación del ARN asociada con la fijación de FFPE que los métodos que dependen de la captura de oligo-dT y la transcripción inversa de ARNm; permite la medición sensible de genes específicos de interés que de otro modo podrían perderse con un enfoque transcriptómico completo; y es escalable, con sondas demostradas dirigidas a una gran fracción del transcriptoma.

Las metodologías de análisis espacial y las composiciones descritas en el presente documento pueden proporcionar una gran cantidad de analitos y/o datos de expresión para una variedad de analitos dentro de una muestra biológica a alta resolución espacial, al tiempo que conservan el contexto espacial nativo. Los métodos y las composiciones de análisis espacial pueden incluir, por ejemplo, el uso de una sonda de captura que incluye un código de barras espacial (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que proporciona información sobre la ubicación o posición de un analito dentro de una célula o una muestra de tejido (por ejemplo, célula de mamífero o una muestra de tejido de mamífero) y un dominio de captura que puede unirse a un analito (por ejemplo, una proteína y/o un ácido nucleico) producido por y/o presente en una célula. Los métodos y las composiciones de análisis espacial también pueden incluir el uso de una sonda de captura que tiene un dominio de captura que captura un agente intermedio para la detección indirecta de un analito. Por ejemplo, el agente intermedio puede incluir una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, un código de barras) asociada con el agente intermedio. Por tanto, la detección del agente intermedio es indicativa del analito en la muestra celular o tisular.

Se describen aspectos no limitativos de las metodologías y composiciones de análisis espacial en las patentes estadounidenses n.os 10.774.374, 10.724.078, 10.480.022, 10.059.990, 10.041.949, 10.002.316, 9.879.313, 9.783.841, 9.727.810, 9.593.365, 8.951.726, 8.604.182, 7.709.198, las publicaciones de solicitudes de patente estadounidenses n.os 2020/239946, 2020/080136, 2020/0277663, 2020/024641, 2019/330617, 2019/264268, 2020/256867, 2020/224244, 2019/194709, 2019/161796, 2019/085383, 2019/055594, 2018/216161, 2018/051322, 2018/0245142, 2017/241911, 2017/089811, 2017/067096, 2017/029875, 2017/0016053, 2016/108458, 2015/000854, 2013/171621, WO 2018/091676, WO 2020/176788, Rodrigues et al., Science 363(6434): 1463-1467, 2019; Lee et al., Nat. Protoc. 10(3):442-458, 2015; Trejo et al., PLoS ONE 14(2):e0212031, 2019; Chen et al., Science 348(6233):aaa6090, 2015; Gao et al., BMC Biol. 15:50, 2017; y Gupta et al., Nature Biotechnol. 36:1197-1202, 2018; the Visium Spatial Gene Expression Reagent Kits User Guide (por ejemplo, Rev C, con fecha de junio de 2020), y/o the Visium Spatial Tissue Optimization Reagent Kits User Guide (por ejemplo, Rev C, con fecha de julio de 2020), ambos disponibles en el sitio web 10x Genomics Support Documentation, y pueden usarse en el presente documento en cualquier combinación. En el presente documento se describen aspectos no limitativos adicionales de las metodologías y composiciones de análisis espacial.

Alguna terminología general que puede usarse en esta divulgación puede encontrarse en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663. Normalmente, un "código de barras" es

5 un marcador o identificador que transmite o puede transmitir información (por ejemplo, información sobre un analito en una muestra, una perla y/o una sonda de captura). Un código de barras puede ser parte de un analito o puede ser independiente de un analito. Un código de barras puede unirse a un analito. Un código de barras particular puede ser único en relación con otros códigos de barras. A los efectos de esta divulgación, un “analito” puede incluir cualquier sustancia biológica, estructura, resto o componente que va a analizarse. El término “diana” puede referirse de manera similar a un analito de interés.

10 Los analitos pueden clasificarse ampliamente en uno de dos grupos: analitos de ácido nucleico y analitos que no son de ácido nucleico. Los ejemplos de analitos que no son ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, lípidos, hidratos de carbono, péptidos, proteínas, glicoproteínas (unidas a N o unidas a O), lipoproteínas, fosfoproteínas, variantes de proteínas específicas fosforiladas o acetiladas, variantes de amidación de proteínas, variantes de hidroxilación de proteínas, variantes de metilación de proteínas, variantes de ubiquitinación de proteínas, variantes de sulfatación de proteínas, proteínas virales (por ejemplo, cápside viral, envoltura viral, cubierta viral, accesorio viral, glicoproteínas virales, espícula viral, etc.), proteínas extracelulares e intracelulares, anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos. En algunas realizaciones, el/los analito(s) puede(n) localizarse(s) en una(s) ubicación(es) subcelular(es), incluyendo, por ejemplo, orgánulos, por ejemplo, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, cloroplastos, vesículas endocíticas, vesículas exocíticas, vacuolas, lisosomas, etc. En algunas realizaciones, el/los analito(s) puede(n) ser péptidos o proteínas, incluyendo, sin limitación, anticuerpos y enzimas. Pueden encontrarse ejemplos adicionales de analitos en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663. En algunas realizaciones, un analito puede detectarse indirectamente, tal como mediante la detección de un agente intermedio, por ejemplo, un producto de ligación o un agente de captura de analito (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con oligonucleótido), tal como los descritos en el presente documento.

25 Una “muestra biológica” se obtiene normalmente del sujeto para su análisis usando cualquiera de una variedad de técnicas incluyendo, pero sin limitarse a, biopsia, cirugía y microscopía de captura láser (LCM), y generalmente incluye células y/u otro material biológico procedente del sujeto. En algunas realizaciones, una muestra biológica puede ser una sección de tejido. En algunas realizaciones, una muestra biológica puede ser una muestra biológica fijada y/o teñida (por ejemplo, una sección de tejido fijada y/o teñida). Los ejemplos no limitativos de tinciones incluyen tinciones histológicas (por ejemplo, hematoxilina y/o eosina) y tinciones inmunológicas (por ejemplo, tinciones fluorescentes). En algunas realizaciones, pueden obtenerse imágenes de una muestra biológica (por ejemplo, una muestra biológica fijada y/o teñida). También se describen muestras biológicas en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663.

30 En algunas realizaciones, una muestra biológica se permeabiliza con uno o más reactivos de permeabilización. Por ejemplo, la permeabilización de una muestra biológica puede facilitar la captura de analitos. Se describen agentes y condiciones de permeabilización a modo de ejemplo en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663.

35 Los métodos de análisis espacial basados en matrices implican la transferencia de uno o más analitos desde una muestra biológica a una matriz de características en un sustrato, donde cada característica se asocia con una ubicación espacial única en la matriz. El análisis posterior de los analitos transferidos incluye determinar la identidad de los analitos y la ubicación espacial de los analitos dentro de la muestra biológica. La ubicación espacial de un analito dentro de la muestra biológica se determina basándose en la característica a la que está unido el analito (por ejemplo, directa o indirectamente) en la matriz y la ubicación espacial relativa de la característica dentro de la matriz.

40 Una “sonda de captura” se refiere a cualquier molécula capaz de capturar (directa o indirectamente) y/o marcar un analito (por ejemplo, un analito de interés) en una muestra biológica. En algunas realizaciones, la sonda de captura es un ácido nucleico o un polipéptido. En algunas realizaciones, la sonda de captura incluye un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un identificador molecular único (UMI)) y un dominio de captura. En algunas realizaciones, una sonda de captura puede incluir un dominio de escisión y/o un dominio funcional (por ejemplo, un sitio de unión a cebador, tal como para la secuenciación de próxima generación (NGS)). Véase, por ejemplo, el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663. La generación de sondas de captura puede lograrse mediante cualquier método apropiado, incluyendo los descritos en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663.

45 En algunas realizaciones, puede detectarse más de un tipo de analito (por ejemplo, ácidos nucleicos y proteínas) de una muestra biológica (por ejemplo, de manera simultánea o secuencial) usando cualquier técnica de multiplexación adecuada, tal como las descritas en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663.

50 En algunas realizaciones, la detección de uno o más analitos (por ejemplo, analitos de proteínas) puede realizarse usando uno o más agentes de captura de analito. Tal como se usa en el presente documento, un “agente de captura de analito” se refiere a un agente que interacciona con un analito (por ejemplo, un analito en una muestra biológica) y con una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura unida a un sustrato o una característica) para identificar el analito. En algunas realizaciones, el agente de captura de analito incluye: (i) un resto de unión a analito (por ejemplo, que se une a un analito), por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo; (ii) un código de barras del resto de

unión a analito; y (iii) una secuencia de captura de analito. Tal como se usa en el presente documento, el término “código de barras del resto de unión a analito” se refiere a un código de barras que está asociado con o identifica de otro modo el resto de unión a analito. Tal como se usa en el presente documento, el término “secuencia de captura de analito” se refiere a una región o resto configurado para hibridarse con, unirse a, acoplarse a o interactuar de otro modo con un dominio de captura de una sonda de captura. En algunos casos, un código de barras del resto de unión a analito (o porción del mismo) puede retirarse (por ejemplo, escindir) del agente de captura de analito. Puede encontrarse una descripción adicional de agentes de captura de analito en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663.

Hay al menos dos métodos para asociar un código de barras espacial con una o más células vecinas, de manera que el código de barras espacial identifica la una o más células y/o el contenido de la una o más células, como asociado con una ubicación espacial particular. Un método es promover analitos o sustitutos de analito (por ejemplo, agentes intermedios) fuera de una célula y hacia una matriz con código de barras espacial (por ejemplo, que incluye sondas de captura con código de barras espacial). En algunos casos, la matriz con código de barras espacial poblada con sondas de captura (tal como se describe más adelante en el presente documento) se pone en contacto con una muestra biológica y la muestra biológica se permeabiliza, lo que permite que el analito migre lejos de la muestra y hacia la matriz. El analito interactúa con una sonda de captura en la matriz con código de barras espacial. Otro método consiste en escindir sondas de captura con código de barras espacial de una matriz y promover las sondas de captura con código de barras espacial hacia y/o dentro o sobre la muestra biológica. En algunos casos, la matriz con código de barras espacial poblada con sondas de captura (tal como se describe adicionalmente en el presente documento) puede ponerse en contacto con una muestra. Las sondas de captura con código de barras espacial se escinden y luego interactúan con las células dentro de la muestra biológica proporcionada. La interacción puede ser una interacción de superficie celular covalente o no covalente. La interacción puede ser una interacción intracelular facilitada por un sistema de administración o un péptido de penetración celular. Una vez que la sonda de captura con código de barras espacial se asocia con una célula particular, la muestra puede retirarse opcionalmente para su análisis. La muestra puede disociarse opcionalmente antes del análisis. Una vez que la célula marcada se asocia con la sonda de captura con código de barras espacial, pueden analizarse las sondas de captura para obtener información resuelta espacialmente sobre la célula marcada.

En algunos casos, la preparación de la muestra puede incluir colocar la muestra en un portaobjetos, fijar la muestra y/o teñir la muestra biológica para obtener imágenes. A continuación, pueden obtenerse imágenes de la muestra teñida en la matriz usando modalidades de campo claro (para obtener imágenes de la tinción de hematoxilina y eosina de la muestra) y/o de fluorescencia (para obtener imágenes de las características). Opcionalmente, puede retirarse la tinción de la muestra antes de la permeabilización. En algunas realizaciones, los analitos se liberan entonces de la muestra y las sondas de captura que forman la matriz con código de barras espacial se hibridan con o se unen a los analitos liberados. Entonces se retira la muestra de la matriz y las sondas de captura se escinden de la matriz. A continuación, se obtienen imágenes opcionalmente de la muestra biológica y la matriz por segunda vez en una o ambas modalidades, mientras que los analitos se someten a transcripción inversa para dar ADNc y se prepara y se secuencian una biblioteca de amplicones. Entonces se superponen espacialmente las imágenes para correlacionar la información de la muestra biológica identificada espacialmente. Cuando no se obtienen imágenes por segunda vez de la muestra y la matriz, se proporciona en cambio un archivo de coordenadas de punto. El archivo de coordenadas de punto reemplaza la segunda etapa de obtención de imágenes. Además, la preparación de la biblioteca de amplicones puede realizarse con un adaptador de PCR único y secuenciarse.

En algunos casos, se da a conocer otro flujo de trabajo a modo de ejemplo que utiliza una matriz con código de barras espacial en un sustrato, donde las sondas de captura con código de barras espacial se agrupan en zonas denominadas características. Las sondas de captura con código de barras espacial pueden incluir un dominio de escisión, uno o más dominios funcionales, un código de barras espacial, un identificador molecular único y un dominio de captura. Las sondas de captura con código de barras espacial también pueden incluir una modificación del extremo 5' para la unión reversible al sustrato. La matriz con código de barras espacial se pone en contacto con una muestra biológica y la muestra se permeabiliza mediante la aplicación de reactivos de permeabilización. Los reactivos de permeabilización pueden administrarse colocando el conjunto de matriz/muestra dentro de una disolución a granel. Alternativamente, los reactivos de permeabilización pueden administrarse a la muestra a través de un medio resistente a la difusión y/o una barrera física tal como una tapa, en donde la muestra se intercala entre el medio resistente a la difusión y/o la barrera y el sustrato que contiene la matriz. Los analitos migran hacia la matriz de captura con código de barras espacial usando cualquier número de técnicas dadas a conocer en el presente documento. Por ejemplo, puede producirse migración de analitos usando una tapa de medio resistente a la difusión y migración pasiva. Como otro ejemplo, la migración de analitos puede ser una migración activa, usando un sistema de transferencia electroforética, por ejemplo. Una vez que los analitos están muy cerca de las sondas de captura con código de barras espacial, las sondas de captura pueden hibridarse con o unirse de otro modo a un analito diana. La muestra biológica puede retirarse opcionalmente de la matriz.

Las sondas de captura pueden escindir opcionalmente de la matriz, y a los analitos capturados se les puede añadir un código de barras espacial realizando una reacción de ADNc de primera cadena con transcriptasa inversa. Opcionalmente, puede realizarse una reacción de ADNc de primera cadena usando oligonucleótidos de cambio de molde. Por ejemplo, un oligonucleótido de cambio de molde puede hibridarse con una cola de poli(C) añadida a un extremo 3' del ADNc mediante una enzima transcriptasa inversa de manera independiente de molde. El molde de ARNm original y el oligonucleótido de cambio de molde pueden desnaturalizarse entonces del ADNc y la sonda de captura con código de

barras espacial puede hibridarse entonces con el ADNc y puede generarse un complemento del ADNc. A continuación, el ADNc de primera cadena puede purificarse y recogerse para las etapas de amplificación posteriores. El ADNc de primera cadena puede amplificarse mediante PCR, donde los cebadores directo e inverso flanquean el código de barras espacial y las regiones de interés del analito, generando una biblioteca asociada con un código de barras espacial particular. En algunas realizaciones, la preparación de biblioteca puede cuantificarse y/o puede controlarse la calidad para verificar el éxito de las etapas de preparación de biblioteca. En algunas realizaciones, el ADNc comprende una secuencia de cebador de secuenciación por síntesis (SBS). Los amplicones de la biblioteca se secuencian y analizan para descodificar la información espacial.

En algunos casos, las sondas de captura pueden configurarse para cebar, replicar y, en consecuencia, producir productos de extensión con código de barras opcionales a partir de un molde (por ejemplo, un molde de ADN o ARN, tal como un analito o un agente intermedio (por ejemplo, un producto de ligación o un agente de captura de analito), o una porción del mismo), o derivados de los mismos (véase, por ejemplo, el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663 sobre sondas de captura extendidas). En algunos casos, las sondas de captura pueden configurarse para formar productos de ligación con un molde (por ejemplo, un molde de ADN o ARN, tal como un analito o un agente intermedio, o una porción del mismo), creando así productos de ligación que sirven como sustitutos de un molde.

Una “sonda de captura” se refiere a cualquier molécula capaz de capturar (directa o indirectamente) y/o marcar un analito (por ejemplo, un analito de interés) en una muestra biológica. En algunas realizaciones, la sonda de captura es un ácido nucleico o un polipéptido. En algunas realizaciones, la sonda de captura incluye un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un identificador molecular único (UMI)) y un dominio de captura. En algunos casos, la sonda de captura puede incluir secuencias funcionales que son útiles para el procesamiento posterior. En algunos casos, una sonda de captura puede unirse de manera reversible a un sustrato a través de un ligador. La sonda de captura puede incluir una o más secuencias funcionales, que pueden incluir una secuencia de unión a célula de flujo específica de secuenciador, por ejemplo, una secuencia P5 o P7, así como una secuencia funcional, que puede incluir secuencias de cebador de secuenciación, por ejemplo, un sitio de unión a cebador R1, un sitio de unión a cebador R2. En algunas realizaciones, la secuencia es una secuencia P7 y la secuencia es un sitio de unión a cebador R2. Una sonda de captura puede incluir adicionalmente un código de barras espacial y/o un identificador molecular único y un dominio de captura. No es necesario que las diferentes secuencias de la sonda de captura estén en la forma secuencial tal como se representa en este ejemplo; sin embargo, el dominio de captura debe colocarse en una ubicación en el código de barras en donde pueda producirse la captura de analito y la extensión del dominio de captura para crear una copia del analito.

La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una sonda de captura, tal como se describe en el presente documento. Tal como se muestra, la sonda de captura **202** se acopla opcionalmente a una característica **201** mediante un dominio de escisión **203**, tal como un ligador de disulfuro. La sonda de captura puede incluir secuencias funcionales que son útiles para el procesamiento posterior, tal como la secuencia funcional **204**, que puede incluir una secuencia de unión a célula de flujo específica de secuenciador, por ejemplo, una secuencia P5 o P7, así como una secuencia funcional **205**, que puede incluir secuencias de cebador de secuenciación, por ejemplo, un sitio de unión a cebador R1. En algunas realizaciones, la secuencia **204** es una secuencia P7 y la secuencia **205** es un sitio de unión a cebador R1. Dentro de la sonda de captura puede incluirse un código de barras espacial **206** para su uso en la unión del código de barras al analito diana. Las secuencias funcionales pueden seleccionarse generalmente por compatibilidad con cualquiera de una variedad de diferentes sistemas de secuenciación, por ejemplo, Ion Torrent Proton o PGM, instrumentos de secuenciación de Illumina, PacBio, Oxford Nanopore, etc., y los requisitos de los mismos. En algunas realizaciones, las secuencias funcionales pueden seleccionarse por compatibilidad con sistemas de secuenciación no comercializados. Los ejemplos de tales sistemas y técnicas de secuenciación, para los que pueden usarse secuencias funcionales adecuadas, incluyen (pero no se limitan a) secuenciación por Ion Torrent Proton o PGM, secuenciación por Illumina, secuenciación por SMRT PacBio y secuenciación por Oxford Nanopore. Además, en algunas realizaciones, las secuencias funcionales pueden seleccionarse por compatibilidad con otros sistemas de secuenciación.

En algunas realizaciones, el código de barras espacial **206**, las secuencias funcionales **204** (por ejemplo, secuencia de unión a célula de flujo) y **205** (por ejemplo, secuencias de cebador de secuenciación) pueden ser comunes a todas las sondas unidas a una característica dada. El código de barras espacial también puede incluir un dominio de captura **207** para facilitar la captura de un analito diana.

En algunos casos, las sondas de captura se introducen en la célula usando un péptido de penetración celular. **La figura 3** es un esquema que ilustra una sonda de captura escindible que incluye un péptido de penetración celular, en donde la sonda de captura escindida puede entrar en una célula no permeabilizada y unirse a analitos dentro de la muestra. La sonda de captura **301** contiene un dominio de escisión **302**, un péptido de penetración celular **303**, una molécula indicadora **304** y un enlace disulfuro (-S-S-). **305** representa todas las demás partes de una sonda de captura, por ejemplo, un código de barras espacial y un dominio de captura.

En algunos casos, la divulgación proporciona características con código de barras espacial multiplexadas. **La figura 4** es un diagrama esquemático de una característica con código de barras espacial multiplexada a modo de ejemplo. En **la figura 4**, la característica **401** (por ejemplo, una perla, una ubicación en un portaobjetos u otro sustrato, un pocillo en un portaobjetos u otro sustrato, una partición en un portaobjetos u otro sustrato, etc.) pueden acoplarse a sondas de captura

con código de barras espacial, en donde las sondas con código de barras espacial de una característica particular pueden poseer el mismo código de barras espacial, pero tener diferentes dominios de captura diseñados para asociar el código de barras espacial de la característica con más de un analito diana. Por ejemplo, una característica puede acoplarse a cuatro tipos diferentes de sondas de captura con código de barras espacial, poseyendo cada tipo de sonda de captura con código de barras espacial el código de barras espacial **402**. Un tipo de sonda de captura asociada con la característica incluye el código de barras espacial **402** en combinación con un dominio de captura de poli(T) **403**, diseñado para capturar analitos diana de ARNm. Un segundo tipo de sonda de captura asociada con la característica incluye el código de barras espacial **402** en combinación con un dominio de captura de N meros aleatorio **404** para el análisis de ADNg. Un tercer tipo de sonda de captura asociada con la característica incluye el código de barras espacial **402** en combinación con un dominio de captura complementario al agente de captura de analito de interés **405**. Un cuarto tipo de sonda de captura asociada con la característica incluye el código de barras espacial **402** en combinación con una sonda de captura que puede unirse específicamente a una molécula de ácido nucleico **406** que puede funcionar en un ensayo CRISPR (por ejemplo, CRISPR/Cas9). Aunque en **la figura 4**, solo se muestran cuatro constructos con código de barras de sonda de captura diferentes, los constructos con código de barras de sonda de captura pueden adaptarse para análisis de cualquier analito dado asociado con un ácido nucleico y capaz de unirse con un constructo de este tipo. Por ejemplo, los esquemas mostrados en **la figura 4** también pueden usarse para el análisis simultáneo de otros analitos dados a conocer en el presente documento, incluyendo, pero sin limitarse a: (a) ARNm, un constructo de rastreo de linaje, proteínas y metabolitos de la superficie celular o intracelulares, y ADNg; (b) ARNm, cromatina accesible (por ejemplo, ATAC-seq, DNasa-seq y/o MNasa-seq), proteínas y metabolitos de la superficie celular o intracelulares, y un agente de perturbación (por ejemplo, un ARNcr/ARNsu CRISPR, TALEN, nucleasa con dedos de cinc y/u oligonucleótido antisentido tal como se describe en el presente documento); (c) ARNm, proteínas y/o metabolitos de la superficie celular o intracelulares, un agente de marcaje con código de barras (por ejemplo, los multimeros del CMH descritos en el presente documento) y una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias (por ejemplo, receptor de células T). En algunas realizaciones, un agente de perturbación puede ser una molécula pequeña, un anticuerpo, un fármaco, un aptámero, un ARNm, un entorno físico (por ejemplo, un cambio de temperatura) o cualquier otro agente de perturbación conocido.

Se describen características adicionales de las sondas de captura en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663. La generación de sondas de captura puede lograrse mediante cualquier método apropiado, incluyendo los descritos en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663.

Tal como se usa en el presente documento, una "sonda de captura extendida" se refiere a una sonda de captura que tiene nucleótidos adicionales añadidos al extremo terminal (por ejemplo, extremo 3' o 5') de la sonda de captura, extendiendo así la longitud total de la sonda de captura. Por ejemplo, un "extremo 3' extendido" indica que se añadieron nucleótidos adicionales al nucleótido más en posición 3' de la sonda de captura para extender la longitud de la sonda de captura, por ejemplo, mediante reacciones de polimerización usadas para extender moléculas de ácido nucleico, incluyendo la polimerización con molde catalizada por una polimerasa (por ejemplo, una ADN polimerasa o una transcriptasa inversa). En algunas realizaciones, extender la sonda de captura incluye añadir a un extremo 3' de una sonda de captura una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico de un analito o agente intermedio unido específicamente al dominio de captura de la sonda de captura. En algunas realizaciones, la sonda de captura se extiende usando transcripción inversa. En algunas realizaciones, la sonda de captura se extiende usando una o más ADN polimerasas. Las sondas de captura extendidas incluyen la secuencia de la sonda de captura y la secuencia del código de barras espacial de la sonda de captura.

En algunas realizaciones, las sondas de captura extendida se amplifican (por ejemplo, en disolución a granel o en la matriz) para producir cantidades que son suficientes para el análisis posterior, por ejemplo, mediante secuenciación de ADN. En algunas realizaciones, las sondas de captura extendidas (por ejemplo, moléculas de ADN) actúan como moldes para una reacción de amplificación (por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa).

Variantes adicionales de los métodos de análisis espacial, incluyendo en algunas realizaciones, una etapa de formación de imágenes, se describen en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663. El análisis de analitos capturados (y/o agentes intermedios o porciones de los mismos), por ejemplo, incluyendo la extracción de muestras, la extensión de sondas de captura, la secuenciación (por ejemplo, de una sonda de captura extendida escindida y/o una molécula de ADNc complementaria a una sonda de captura extendida), la secuenciación en la matriz (por ejemplo, usando, por ejemplo, enfoques de hibridación in situ o ligación in situ), el análisis temporal y/o la captura de proximidad, se describe en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663. Se describen algunas medidas de control de calidad en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663.

La información espacial puede proporcionar información de importancia biológica y/o médica. Por ejemplo, los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden permitir: la identificación de uno o más biomarcadores (por ejemplo, de diagnóstico, de pronóstico y/o para la determinación de la eficacia de un tratamiento) de una enfermedad o trastorno; la identificación de una diana farmacológica candidata para el tratamiento de una enfermedad o trastorno; la identificación (por ejemplo, el diagnóstico) de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno; la identificación del estadio y/o el pronóstico de una enfermedad o trastorno en un sujeto; la identificación de un sujeto que tiene una mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad o trastorno; la monitorización de la progresión de una enfermedad o trastorno

en un sujeto; la determinación de la eficacia de un tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto; la identificación de una subpoblación de pacientes para la cual un tratamiento es efectivo para una enfermedad o trastorno; la modificación de un tratamiento de un sujeto con una enfermedad o trastorno; la selección de un sujeto para participar en un ensayo clínico; y/o la selección de un tratamiento para un sujeto con una enfermedad o trastorno.

La información espacial puede proporcionar información de importancia biológica. Por ejemplo, los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden permitir: la identificación de perfiles de expresión de transcriptoma y/o proteoma (por ejemplo, en tejido sano y/o enfermo); la identificación de múltiples tipos de analitos en estrecha proximidad (por ejemplo, análisis del vecino más cercano); la determinación de proteínas y/o genes regulados por incremento y/o por disminución en tejido enfermo; la caracterización de microambientes tumorales; la caracterización de respuestas inmunitarias tumorales; la caracterización de tipos de células y su colocalización en tejido; y la identificación de variantes genéticas dentro de los tejidos (por ejemplo, basándose en perfiles de expresión de genes y/o proteínas asociados con biomarcadores de enfermedades o trastornos específicos).

Normalmente, para los métodos basados en matrices espaciales, un sustrato funciona como soporte para la unión directa o indirecta de las sondas de captura a las características de la matriz. Una "característica" es una entidad que actúa como soporte o depósito para diversas entidades moleculares usadas en el análisis espacial. En algunas realizaciones, algunas o todas las características en una matriz se funcionalizan para la captura de analitos. Sustratos a modo de ejemplo se describen en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663. Pueden encontrarse características y atributos geométricos a modo de ejemplo de una matriz en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663.

La figura 5 representa una disposición a modo de ejemplo de características con código de barras dentro de una matriz. De izquierda a derecha, **la figura 5** muestra (izquierda) un portaobjetos que incluye seis matrices con códigos de barras espaciales, (centro) un esquema ampliado de una de las seis matrices con códigos de barras espaciales, que muestra una cuadrícula de características con códigos de barras en relación con una muestra biológica, y (derecha) un esquema ampliado de una sección de una matriz, que muestra la identificación específica de múltiples características dentro de la matriz (etiquetadas como ID578, ID579, ID560, etc.).

En general, los analitos y/o agentes intermedios (o porciones de los mismos) pueden capturarse cuando se pone en contacto una muestra biológica con un sustrato que incluye sondas de captura (por ejemplo, un sustrato con sondas de captura incluidas, depositadas por mancha, impresas, fabricadas en el sustrato, o un sustrato con características (por ejemplo, perlas, pocillos, zonas en un sustrato) que comprenden sondas de captura). Tal como se usa en el presente documento, "estar en contacto", "poner en contacto" y/o "mantener en contacto", una muestra biológica con un sustrato se refiere a cualquier contacto (por ejemplo, directo o indirecto) de manera que las sondas de captura puedan interactuar (por ejemplo, unirse de manera covalente o no covalente (por ejemplo, hibridarse)) con analitos de la muestra biológica. La captura puede lograrse de manera activa (por ejemplo, usando electroforesis) o pasiva (por ejemplo, usando difusión). La captura de analitos se describe con más detalle en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663.

En algunos casos, el análisis espacial puede realizarse uniendo y/o introduciendo una molécula (por ejemplo, un péptido, un lípido o una molécula de ácido nucleico) que tenga un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial) en una muestra biológica (por ejemplo, en una célula en una muestra biológica). En algunas realizaciones, una pluralidad de moléculas (por ejemplo, una pluralidad de moléculas de ácido nucleico) que tienen una pluralidad de códigos de barras (por ejemplo, una pluralidad de códigos de barras espaciales) se introducen en una muestra biológica (por ejemplo, en una pluralidad de células en una muestra biológica) para su uso en el análisis espacial. En algunas realizaciones, después de unir y/o introducir una molécula que tiene un código de barras en una muestra biológica, la muestra biológica puede separarse físicamente (por ejemplo, disociarse) en células individuales o grupos de células para su análisis. Algunos de tales métodos de análisis espacial se describen en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663.

En algunos casos, el análisis espacial puede realizarse mediante la detección de múltiples oligonucleótidos que se hibridan con un analito. En algunos casos, por ejemplo, el análisis espacial puede realizarse usando la ligación con molde de ARN (RTL). Se han descrito previamente métodos de RTL. Véase, por ejemplo, Credle et al., *Nucleic Acids Res.* 21 de agosto de 2017;45(14):e128. Normalmente, RTL incluye la hibridación de dos oligonucleótidos con secuencias adyacentes en un analito (por ejemplo, una molécula de ARN, tal como una molécula de ARNm). En algunos casos, los oligonucleótidos son moléculas de ADN. En algunos casos, uno de los oligonucleótidos incluye al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3' y/o el otro oligonucleótido incluye un nucleótido fosforilado en el extremo 5'. En algunos casos, uno de los dos oligonucleótidos incluye un dominio de captura (por ejemplo, una secuencia de poli(A), una secuencia no homopolimérica). Después de la hibridación con el analito, una ligasa (por ejemplo, la ligasa SplintR) liga los dos oligonucleótidos entre sí, creando un producto de ligación. En algunos casos, los dos oligonucleótidos se hibridan con secuencias que no son adyacentes entre sí. Por ejemplo, la hibridación de los dos oligonucleótidos crea un espacio entre los oligonucleótidos hibridados. En algunos casos, una polimerasa (por ejemplo, una ADN polimerasa) puede extender uno de los oligonucleótidos antes de la ligación. Después de la ligación, el producto de ligación se libera del analito. En algunos casos, el producto de ligación se libera usando una endonucleasa (por ejemplo, ARNasa H). El producto de ligación liberado puede capturarse entonces por sondas de captura (por ejemplo, en lugar de la captura directa de un

analito) en una matriz, amplificarse opcionalmente, y secuenciarse, determinando así la ubicación y opcionalmente la abundancia del analito en la muestra biológica.

5 Durante el análisis de información espacial, se obtiene información de secuencia para un código de barras espacial asociado con un analito, y la información de secuencia puede usarse para proporcionar información sobre la distribución espacial del analito en la muestra biológica. Pueden usarse diversos métodos para obtener la información espacial. En algunas realizaciones, las sondas de captura específicas y los analitos que capturan están asociados con ubicaciones específicas en una matriz de características en un sustrato. Por ejemplo, los códigos de barras espaciales específicos pueden asociarse con ubicaciones de matriz específicas antes de la fabricación de la matriz, y las secuencias de los
10 códigos de barras espaciales pueden almacenarse (por ejemplo, en una base de datos) junto con información de la ubicación de matriz específica, de modo que cada código de barras espacial mapee de manera única una ubicación de matriz particular.

15 Alternativamente, los códigos de barras espaciales específicos pueden depositarse en ubicaciones predeterminadas en una matriz de características durante la fabricación, de manera que en cada ubicación, solo esté presente un tipo de código de barras espacial, de modo que los códigos de barras espaciales se asocien únicamente con una sola característica de la matriz. Cuando sea necesario, las matrices pueden descodificarse usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento de modo que los códigos de barras espaciales se asocien de manera única con las ubicaciones de características de matriz, y este mapeo puede almacenarse tal como se describió anteriormente.

20 Cuando se obtiene información de secuencia para sondas de captura y/o analitos durante el análisis de información espacial, las ubicaciones de las sondas de captura y/o los analitos pueden determinarse haciendo referencia a la información almacenada que asocia de manera única cada código de barras espacial con una ubicación de características de matriz. De este modo, las sondas de captura específicas y los analitos capturados se asocian con ubicaciones específicas en la matriz de características. Cada ubicación de característica de matriz representa una posición en relación con un punto de referencia de coordenadas (por ejemplo, una ubicación de matriz, un marcador de referencia) para la matriz. En consecuencia, cada ubicación característica tiene una "dirección" o ubicación en el espacio de coordenadas de la matriz.

30 Se describen algunos flujos de trabajo de análisis espacial a modo de ejemplo en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663. Véase, por ejemplo, la realización a modo de ejemplo que comienza con "En algunos ejemplos no limitativos de los flujos de trabajo descritos en el presente documento, la muestra puede sumergirse del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663. Véase también, por ejemplo, the Visium Spatial Gene Expression Reagent Kits User Guide (por ejemplo, Rev C, con fecha de junio de 2020), y/o the Visium Spatial Tissue Optimization Reagent Kits User Guide (por ejemplo, Rev C, con fecha de julio de 2020).

40 En algunas realizaciones, el análisis espacial puede realizarse usando hardware y/o software dedicado, tal como cualquiera de los sistemas descritos en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0277663, o cualquiera de uno o más de los dispositivos o métodos descritos en el documento WO 2020/123320.

45 Los sistemas adecuados para realizar el análisis espacial pueden incluir componentes tales como una cámara (por ejemplo, una célula de flujo o una cámara sellable hermética a los fluidos) para contener una muestra biológica. La muestra biológica puede montarse, por ejemplo, en un portamuestras biológico. Pueden conectarse una o más cámaras de fluido a la cámara y/o al portamuestras a través de conductos de fluido, y los fluidos pueden suministrarse a la cámara y/o al portamuestras a través de bombas fluidicas, fuentes de vacío u otros dispositivos acoplados a los conductos de fluido que crean un gradiente de presión para impulsar el flujo de fluido. También pueden conectarse una o más válvulas a los conductos de fluido para regular el flujo de reactivos desde los depósitos a la cámara y/o al portamuestras.

50 Los sistemas pueden incluir opcionalmente una unidad de control que incluye uno o más procesadores electrónicos, una interfaz de entrada, una interfaz de salida (tal como una pantalla) y una unidad de almacenamiento (por ejemplo, un medio de almacenamiento de estado sólido tal como, pero sin limitarse a, un medio de almacenamiento magnético, óptico u otro estado sólido, persistente, grabable y/o regrabable). La unidad de control puede conectarse opcionalmente a uno o más dispositivos remotos a través de una red. La unidad de control (y componentes de la misma) generalmente puede realizar cualquiera de las etapas y funciones descritas en el presente documento. Cuando el sistema está conectado a un dispositivo remoto, el dispositivo (o dispositivos) remoto(s) puede(n) realizar cualquiera de las etapas o características descritas en el presente documento. Los sistemas pueden incluir opcionalmente uno o más detectores (por ejemplo, CCD, CMOS) usados para capturar imágenes. Los sistemas también pueden incluir opcionalmente una o más fuentes de luz
60 (por ejemplo, láseres basados en LED, basados en diodo) para iluminar una muestra, un sustrato con características, analitos procedentes de una muestra biológica capturada en un sustrato y diversos medios de control y calibración.

65 Los sistemas pueden incluir opcionalmente instrucciones de software codificadas y/o implementadas en uno o más medios de almacenamiento tangibles y componentes de hardware tales como circuitos integrados específicos de aplicación. Las instrucciones del software, cuando se ejecutan por una unidad de control (y en particular, un procesador electrónico) o un

circuito integrado, pueden hacer que la unidad de control, el circuito integrado u otro componente que ejecuta las instrucciones del software realice cualquiera de las etapas del método o funciones descritas en el presente documento.

5 En algunos casos, los sistemas descritos en el presente documento pueden detectar (por ejemplo, registrar una imagen) la muestra biológica en la matriz. Se describen métodos a modo de ejemplo para detectar la muestra biológica en una matriz en la solicitud PCT n.º 2020/061064 y/o en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 16/951.854.

10 Antes de transferir los analitos desde la muestra biológica a la matriz de características en el sustrato, la muestra biológica puede alinearse con la matriz. La alineación de una muestra biológica y una matriz de características que incluye sondas de captura, puede facilitar el análisis espacial, que puede usarse para detectar diferencias en la presencia y/o el nivel de analito en diferentes posiciones en la muestra biológica, por ejemplo, para generar un mapa tridimensional de la presencia y/o el nivel de analito. Se describen métodos a modo de ejemplo para generar un mapa bidimensional y/o tridimensional de la presencia y/o el nivel de analito en la solicitud PCT n.º 2020/053655 y se describen en general métodos de análisis espacial en el documento WO 2020/061108 y/o en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 16/951.864.

15 En algunos casos, puede alinearse un mapa de la presencia y/o el nivel de analito con una imagen de una muestra biológica usando uno o más marcadores de referencia, por ejemplo, objetos colocados en el campo de visión de un sistema de obtención de imágenes que aparecen en la imagen producida, tal como se describe en el documento WO 2020/123320, en la solicitud PCT n.º 2020/061066 y/o en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 16/951.843. Los marcadores de referencia pueden usarse como punto de referencia o escala de medición para la alineación (por ejemplo, para alinear una muestra y una matriz, para alinear dos sustratos, para determinar la ubicación de una muestra o matriz en un sustrato en relación con un marcador de referencia) y /o para mediciones cuantitativas de tamaños y/o distancias.

25 **Captura de ARN usando ligación con molde de ARN**

(a) Antecedentes generales

30 Aunque están disponibles técnicas tales como la secuenciación del genoma completo y la secuenciación del exoma completo, estas técnicas tienen inconvenientes porque proporcionan mucha información y aumentan los costes de un experimento. En situaciones donde se prefiere examinar un número más limitado de analitos en el presente documento se proporcionan métodos para la captura de ARN dirigida. La captura de un derivado de un analito (por ejemplo, un producto de ligación) proporciona una mayor especificidad con respecto a la detección de un analito. Esto se debe a que se requieren al menos dos sondas específicas para una diana para que se hibride con la diana para facilitar la ligación y la captura final del ácido nucleico.

35 En referencia a **la figura 1**, en una realización a modo de ejemplo de la divulgación, se proporcionan métodos para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica. En algunos casos, los métodos incluyen **101** poner en contacto una muestra biológica con una matriz de sondas de captura con códigos de barras espaciales. En algunos casos, la matriz está sobre un sustrato y la matriz incluye una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad incluye: (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura. Después de colocar la muestra biológica en la matriz, la muestra biológica **102** se pone en contacto con una primera sonda y una segunda sonda, en donde la primera sonda y la segunda sonda incluyen cada una, una o más secuencias que son sustancialmente complementarias a secuencias del analito, y en donde la segunda sonda incluye un dominio de captura de sonda de captura; la primera sonda y la segunda sonda **103** hibridan con secuencias complementarias en el analito. Después de la hibridación se genera un producto de ligación que comprende la primera sonda y la segunda sonda **104** y el producto de ligación se libera del analito. A continuación, el producto de ligación liberado se libera **105** para hibridarse con el dominio de captura de una sonda en la matriz. Después de la captura puede determinarse (i) la totalidad o una parte de la secuencia del producto de ligación unido al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) la totalidad o una parte de la secuencia del código de barras espacial, o un complemento del mismo **106**, y entonces puede usarse la secuencias determinada de (i) y (ii) **107** para identificar la ubicación del analito en la muestra biológica.

40 En referencia a **la figura 13**, en otro ejemplo no limitativo, una muestra biológica se desparafina, se tiñe y se toman imágenes **1301**. Tras la retirada de la tinción y la desreticulación **1302**, se añaden sondas a la muestra y se hibridan con un analito **1303**. En algunos casos, las sondas son sondas de ADN. En algunos casos, las sondas son sondas que contienen dirribonucleótidos. Las sondas se ligan **1304** y luego se liberan usando una endonucleasa tal como ARNasa H **1305**. Las sondas ligadas se capturan en una matriz mediante una sonda de captura **1306**, se extienden usando una polimerasa **1307** y se desnaturalizan **1308**. Después de la limpieza de control de calidad **1309**, se determina la abundancia y la ubicación de un analito.

45 En **la figura 6** se representa un ejemplo no limitativo de los métodos dados a conocer en el presente documento se representa. Una vez que una muestra biológica se pone en contacto con un sustrato que incluye una pluralidad de sondas de captura y se pone en contacto con (a) una primera sonda **601** que tiene una secuencia de hibridación diana **603** y una secuencia de cebador **602** y (b) una segunda sonda **604** que tiene una secuencia de hibridación diana **605** y un dominio de captura (por ejemplo, una secuencia de poli-A) **606**, la primera sonda **601** y una segunda sonda **604** se hibridan **610** a un analito **607**. una ligasa **621** liga **620** la primera sonda a la segunda sonda generando así un producto de ligación **622**.

El producto de la ligación se libera **630** del analito **631** digiriendo el analito usando una endorribonucleasa **632**. La muestra se permeabiliza **640** y el producto de la ligación **641** puede hibridarse con una sonda de captura en el sustrato.

5 También se proporcionan en el presente documento métodos para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica que incluye una segunda sonda que incluye un grupo fosfato preadenilado en su extremo 5', lo que permite que la ligación use una ligasa que no requiere trifosfato de adenosina para la actividad ligasa.

10 También se proporcionan en el presente documento métodos para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica que incluye una o más sondas de extensión, además de las sondas primera y segunda. El uso de una sonda de extensión permite una mayor flexibilidad en el diseño de sondas de RTL, principalmente al aumentar las secuencias dentro del analito que pueden usarse como secuencias diana opcionales.

15 También se proporcionan en el presente documento métodos para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica que incluye etapas optimizadas de hibridación, lavado y liberación.

20 En algunas realizaciones, tal como se muestra en **la figura 7**, el producto de la ligación **701** incluye un dominio de captura de sonda de captura **702**, que puede unirse a una sonda de captura **703** (por ejemplo, una sonda de captura inmovilizada, directa o indirectamente, en un sustrato **704**). En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen poner en contacto **705** una muestra biológica con un sustrato **704**, en donde la sonda de captura **703** se fija al sustrato (por ejemplo, se inmoviliza al sustrato, directa o indirectamente). En algunas realizaciones, el dominio de captura de la sonda de captura **702** del producto ligado se une específicamente al dominio de captura **706**. La sonda de captura también puede incluir un identificador molecular único (UMI) **707**, un código de barras espacial **708**, una secuencia funcional **709**, y un dominio de escisión **710**.

25 En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen la permeabilización de la muestra biológica de manera que la sonda de captura pueda unirse más fácilmente a la sonda ligada capturada (es decir, en comparación con ausencia de permeabilización). En algunas realizaciones, pueden añadirse reactivos de transcripción inversa (RT) a muestras biológicas permeabilizadas. La incubación con los reactivos RT puede extender las sondas de captura **711** para producir ADNc de longitud completa con código de barras espacial **712** y **713** a partir de los analitos capturados (por ejemplo, ARNm poliadenilado). Pueden añadirse reactivos de segunda cadena (por ejemplo, enzimas, cebadores de segunda cadena) a la muestra biológica en el portaobjetos para iniciar la síntesis de la segunda cadena.

35 En algunas realizaciones, el ADNc puede desnaturalizarse **714** del molde de la sonda de captura y transferirse (por ejemplo, a un tubo limpio) para la amplificación y/o la construcción de bibliotecas. El ADNc de longitud completa con código de barras espacial puede amplificarse **715** a través de PCR antes de la construcción de bibliotecas. A continuación, el ADNc puede fragmentarse enzimáticamente y seleccionarse por tamaño para optimizar el tamaño del amplicón de ADNc. P5 **716**, i5 **717**, i7 **718** y P7 **719** pueden usarse como índices de muestra, y puede añadirse TruSeq Read 2 a través de reparación de extremos, formación de cola A, ligación de adaptador y PCR. A continuación, los fragmentos de ADNc pueden secuenciarse mediante la secuenciación de extremos emparejados usando TruSeq Read 1 y TruSeq Read 2 como sitios de cebadores de secuenciación.

(b) Sondas para la ligación con molde de ARN

45 Los métodos proporcionados en el presente documento utilizan pares de sondas (o conjuntos; los términos son intercambiables). En algunos casos, los pares de sondas están diseñados de modo que cada sonda se hibrida con una secuencia en un analito que es específico del analito (por ejemplo, en comparación con el genoma completo). Es decir, en algunos casos, un solo par de sondas puede ser específico para un solo analito.

50 En otras realizaciones, las sondas pueden diseñarse de modo que una de las sondas de un par sea una sonda que se hibrida con una secuencia específica. Luego, la otra sonda puede diseñarse para detectar una mutación de interés. En consecuencia, en algunos casos, pueden diseñarse múltiples segundas sondas y pueden variar de modo que cada una se una a una secuencia específica. Por ejemplo, puede diseñarse una segunda sonda para hibridarse con una secuencia de tipo natural y puede diseñarse otra segunda sonda para detectar una secuencia mutada. Así, en algunos casos, un conjunto de sondas puede incluir una primera sonda y dos segundas sondas (o viceversa).

55 Por otro lado, en algunos casos, las sondas pueden diseñarse de modo que cubran regiones conservadas de un analito. Por lo tanto, en algunos casos, una sonda (o un par de sondas) puede hibridarse con analitos similares en una muestra biológica (por ejemplo, para detectar analitos conservados o similares) o en diferentes muestras biológicas (por ejemplo, a través de diferentes especies).

60 En algunas realizaciones, los conjuntos de sondas cubren todo o casi todo un genoma (por ejemplo, genoma humano). En los casos en que los conjuntos de sondas están diseñados para cubrir un genoma completo (por ejemplo, el genoma humano), los métodos dados a conocer en el presente documento pueden detectar analitos de manera no sesgada. En algunos casos, se diseña un par de oligonucleótidos sonda para cubrir un analito (por ejemplo, transcrito). En algunos casos, se diseña más de un par de oligonucleótidos sonda (por ejemplo, un par de sondas que comprende una primera sonda y una segunda sonda) para cubrir un analito (por ejemplo, transcrito). Por ejemplo, pueden usarse al menos dos,

tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más conjuntos de sondas para hibridarse con un solo analito. Los factores que deben considerarse cuando se diseñan sondas son la presencia de variantes (por ejemplo, SNP, mutaciones) o múltiples isoformas expresadas por un solo gen. En algunos casos, el par de oligonucleótidos sonda no se hibrida con el analito completo (por ejemplo, un transcrito), sino que el par de oligonucleótidos sonda se hibrida con una porción del analito completo (por ejemplo, un transcrito).

En algunos casos, se utilizan aproximadamente 5000, 10.000, 15.000, 20.000 o más pares de oligonucleótidos sonda (por ejemplo, un par de sondas que comprende una primera sonda y una segunda sonda) en los métodos descritos en el presente documento. En algunos casos, se utilizan aproximadamente 20.000 pares de oligonucleótidos sonda en los métodos descritos en el presente documento.

En algunos casos, la captura de ARN es una captura de ARN dirigida. La captura de ARN dirigida usando los métodos dados a conocer en el presente documento permite el examen de un subconjunto de analitos de ARN del transcriptoma completo. En algunas realizaciones, el subconjunto de analitos incluye un ARN diana individual. En algunas realizaciones, el subconjunto de analitos incluye dos o más ARN dirigidos. En algunas realizaciones, el subconjunto de analitos incluye uno o más ARNm transcritos por uno o más genes diana. En algunas realizaciones, el subconjunto de analitos incluye una o más variantes de empalme de ARNm de uno o más genes diana. En algunas realizaciones, el subconjunto de analitos incluye ARN no poliadenilados en una muestra biológica. En algunas realizaciones, el subconjunto de analitos incluye la detección de ARNm que tienen uno o más polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en una muestra biológica.

En algunas realizaciones, el subconjunto de analitos incluye ARNm que median la expresión de un conjunto de genes de interés. En algunas realizaciones, el subconjunto de analitos incluye ARNm que comparten secuencias idénticas o sustancialmente similares, ARNm que se traducen en polipéptidos que tienen grupos funcionales o dominios proteicos similares. En algunas realizaciones, el subconjunto de analitos incluye ARNm que no comparten secuencias idénticas o sustancialmente similares, ARNm que se traducen en proteínas que no comparten grupos funcionales o dominios proteicos similares. En algunas realizaciones, el subconjunto de analitos incluye ARNm que se traducen en proteínas que funcionan en rutas biológicas iguales o similares. En algunas realizaciones, las rutas biológicas están asociadas con una enfermedad patológica. Por ejemplo, la captura de ARN dirigida puede detectar genes que están sobreexpresados o subexpresados en cáncer.

En algunas realizaciones, el subconjunto de analitos incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 110, aproximadamente 120, aproximadamente 130, aproximadamente 140, aproximadamente 150, aproximadamente 160, aproximadamente 170, aproximadamente 180, aproximadamente 190, aproximadamente 200, aproximadamente 225, aproximadamente 250, aproximadamente 275, aproximadamente 300, aproximadamente 325, aproximadamente 350, aproximadamente 375, aproximadamente 400, aproximadamente 425, aproximadamente 450, aproximadamente 475, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900 o aproximadamente 1000 analitos.

En algunos casos, los métodos dados a conocer en el presente documento pueden detectar la abundancia y ubicación de al menos 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 o más analitos diferentes.

En algunas realizaciones, el subconjunto de analitos detectados mediante métodos de captura de ARN dirigido proporcionados en el presente documento incluye una gran proporción del transcriptoma de una o más células. Por ejemplo, el subconjunto de analitos detectados mediante métodos de captura de ARN dirigido proporcionados en el presente documento puede incluir al menos aproximadamente el 5%, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 15%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95% o más de los ARNm presentes en el transcriptoma de una o más células.

En algunos casos, las sondas son sondas de ADN. En algunos casos, las sondas son sondas que contienen dirribonucleótidos,

En el presente documento se describen realizaciones adicionales de sonda(s) y conjunto(s) de sonda.

(i) Primera sonda

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento incluyen una primera sonda. Tal como se usa en el presente documento, una "primera sonda" puede referirse a una sonda que se hibrida con la totalidad o una porción

de un analito y puede ligarse a una o más sondas adicionales (por ejemplo, una segunda sonda o una sonda de extensión). En algunas realizaciones, "primera sonda" puede usarse de manera intercambiable con "oligonucleótido de primera sonda".

5 En algunas realizaciones, la primera sonda incluye ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos que pueden participar en interacciones de pares de bases de tipo Watson-Crick o análogas. En algunas realizaciones, la primera sonda incluye desoxirribonucleótidos. En algunas realizaciones, la primera sonda incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. En algunas realizaciones, la primera sonda incluye un ácido desoxirribonucleico que se hibrida con un analito e incluye una porción del oligonucleótido que no es un ácido desoxirribonucleico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la porción del primer oligonucleótido que no es un ácido desoxirribonucleico es un ácido ribonucleico o cualquier otro ácido nucleico que no sea un ácido desoxirribonucleico tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones donde la primera sonda incluye desoxirribonucleótidos, la hibridación de la primera sonda con la molécula de ARNm da como resultado un híbrido ADN:ARN. En algunas realizaciones, la primera sonda incluye solo desoxirribonucleótidos y tras la hibridación de la primera sonda con la molécula de ARNm se da como resultado un híbrido ADN:ARN.

15 En algunas realizaciones, el método incluye una primera sonda que incluye una o más secuencias que son sustancialmente complementarias a una o más secuencias de un analito. En algunas realizaciones, una primera sonda incluye una secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana en el analito. En algunas realizaciones, la secuencia de la primera sonda que es sustancialmente complementaria a la primera secuencia diana en el analito es complementaria en al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% a la primera secuencia diana en el analito.

25 En algunas realizaciones, una primera sonda incluye una secuencia que tiene de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos (por ejemplo, una secuencia de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 90 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 90 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 90 nucleótidos, de aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos, de aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 90 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 10 nucleótidos, de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 90 nucleótidos, de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos, de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 90 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 10 nucleótidos, de aproximadamente 70 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 70 nucleótidos a aproximadamente 90 nucleótidos, de aproximadamente 70 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 70 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos, de aproximadamente 70 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 70 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 70 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 70 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 70 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 70 nucleótidos a aproximadamente 10 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 90 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 10 nucleótidos, de aproximadamente 90 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 90 nucleótidos a aproximadamente 90 nucleótidos, o de aproximadamente 90 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos).

55 En algunas realizaciones, una secuencia de la primera sonda que es sustancialmente complementaria a una secuencia en el analito incluye una secuencia que tiene de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos (por ejemplo, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 45 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 15 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 10 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 45 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 15 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 10 nucleótidos).

aproximadamente 25 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 15 nucleótidos, de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 45 nucleótidos, de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos, de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 45 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 25 nucleótidos, de aproximadamente 25 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 25 nucleótidos a aproximadamente 45 nucleótidos, de aproximadamente 25 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 25 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 45 nucleótidos, de aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 45 nucleótidos, de aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 35 nucleótidos, de aproximadamente 35 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 35 nucleótidos a aproximadamente 45 nucleótidos, de aproximadamente 35 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 45 nucleótidos, o de aproximadamente 45 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos).

En algunas realizaciones, una primera sonda incluye una secuencia funcional. En algunas realizaciones, una secuencia funcional incluye una secuencia de cebador.

En algunas realizaciones, una primera sonda incluye al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3'. En tales casos, una segunda sonda de oligonucleótido comprende un nucleótido fosforilado en el extremo 5'. En algunas realizaciones, una primera sonda incluye al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos diez bases de ácido ribonucleico en el extremo 3'.

Como se muestra en la **figura 6**, un ejemplo no limitativo de una primera sonda **601**, que puede denominarse sonda LHS, incluye una secuencia funcional **602**, una secuencia **603** que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana en el analito **607**, y dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3'.

En algunas realizaciones, una primera sonda incluye una secuencia auxiliar que no se hibrida con un analito. En algunas realizaciones, la secuencia auxiliar puede usarse para hibridarse con sondas adicionales.

(ii) Segunda sonda

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento incluyen una segunda sonda. Tal como se usa en el presente documento, una "segunda sonda" puede referirse a una sonda que se hibrida con la totalidad o una porción de un analito y puede ligarse a una o más sondas adicionales (por ejemplo, una primera sonda o una sonda de extensión). En algunas realizaciones, "segunda sonda" puede usarse de manera intercambiable con "oligonucleótido de segunda sonda". Un experto en la técnica apreciará que el orden de las sondas es arbitrario y, por tanto, los contenidos de la primera y/o la segunda sonda, tal como se da a conocer en el presente documento, son intercambiables.

En algunas realizaciones, la segunda sonda incluye ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos que pueden participar en interacciones de pares de bases de tipo Watson-Crick o análogas. En algunas realizaciones, la segunda sonda incluye desoxirribonucleótidos. En algunas realizaciones, la segunda sonda incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. En algunas realizaciones, la segunda sonda incluye un ácido desoxirribonucleico que se hibrida con un analito e incluye una porción del oligonucleótido que no es un ácido desoxirribonucleico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la porción de la segunda sonda que no es un ácido desoxirribonucleico es un ácido ribonucleico o cualquier otro ácido nucleico que no sea un ácido desoxirribonucleico tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones donde la segunda sonda incluye desoxirribonucleótidos, la hibridación de la segunda sonda con la molécula de ARNm da como resultado un híbrido ADN:ARN. En algunas realizaciones, la segunda sonda incluye solo desoxirribonucleótidos y tras la hibridación de la primera sonda con la molécula de ARNm se da como resultado un híbrido ADN:ARN.

En algunas realizaciones, el método incluye una segunda sonda que incluye una o más secuencias que son sustancialmente complementarias a una o más secuencias de un analito. En algunas realizaciones, una segunda sonda incluye una secuencia que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana en el analito. En algunas realizaciones, la secuencia de la segunda sonda que es sustancialmente complementaria a la segunda secuencia diana en el analito es complementaria en al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% a la segunda secuencia diana en el analito.

En algunas realizaciones, una segunda sonda incluye una secuencia de dominio de captura de sonda de captura. Tal como se usa en el presente documento, un “dominio de captura de sonda de captura” es una secuencia, dominio o resto que puede unirse específicamente a un dominio de captura de una sonda de captura. En algunas realizaciones, el “dominio de captura de dominio de captura” puede usarse de manera intercambiable con “dominio de unión de sonda de captura”.
 5 En algunas realizaciones, una segunda sonda incluye una secuencia de 5' a 3': una secuencia que es sustancialmente complementaria a una secuencia en el analito y un dominio de captura de sonda de captura.

En algunas realizaciones, un dominio de captura de sonda de captura incluye una secuencia de poli(A). En algunas realizaciones, el dominio de captura de sonda de captura incluye una secuencia de poliuridina, una secuencia de politimidina o ambas. En algunas realizaciones, el dominio de captura de sonda de captura incluye una secuencia aleatoria (por ejemplo, un hexámero u octámero aleatorio). En algunas realizaciones, el dominio de captura de sonda de captura es complementario a un dominio de captura en una sonda de captura que detecta una diana o dianas particular(es) de interés. En algunas realizaciones, se proporciona un resto de bloqueo del dominio de captura de sonda de captura que interacciona con el dominio de captura de sonda de captura. En algunas realizaciones, un resto de bloqueo del dominio de captura de sonda de captura incluye una secuencia que es complementaria o sustancialmente complementaria a un dominio de captura de sonda de captura. En algunas realizaciones, un resto de bloqueo del dominio de captura de sonda de captura impide que el dominio de captura de sonda de captura se una a la sonda de captura cuando está presente. En algunas realizaciones, un resto de bloqueo del dominio de captura de sonda de captura se retira antes de unir el dominio de captura de sonda de captura (por ejemplo, presente en una sonda ligada) a una sonda de captura. En algunas realizaciones, un resto de bloqueo del dominio de captura de sonda de captura incluye una secuencia de poliuridina, una secuencia de politimidina o ambas. En algunas realizaciones, la secuencia del dominio de captura de sonda de captura incluye ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos que pueden participar en interacciones de pares de bases de tipo Watson-Crick o análogas. En algunas realizaciones, la secuencia del dominio de unión de sonda de captura incluye al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, la secuencia del dominio de unión de sonda de captura incluye al menos, 25, 30 o 35 nucleótidos.
 10
 15
 20
 25

En algunas realizaciones, una segunda sonda incluye un nucleótido fosforilado en el extremo 5'. El nucleótido fosforilado en el extremo 5' puede usarse en una reacción de ligación para ligar la segunda sonda con la primera sonda.

30 Como se muestra en **la figura 6**, un ejemplo no limitativo de una segunda sonda **604**, que puede denominarse una sonda RHS, incluye una secuencia **605** que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana en el analito **607**, y un dominio de captura de sonda de captura **606**.

En algunas realizaciones, una segunda sonda incluye una secuencia auxiliar que no se hibrida con un analito. En algunas realizaciones, la secuencia auxiliar puede usarse para hibridarse con sondas adicionales.
 35

(iii) Sondas múltiples

En algunas realizaciones, los métodos de captura de ARN diana tal como se da a conocer en el presente documento incluyen múltiples oligonucleótidos sonda. En algunas realizaciones, los métodos incluyen 2, 3, 4 o más oligonucleótidos sonda. En algunas realizaciones, cada uno de los oligonucleótidos sonda incluye ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos que pueden participar en interacciones de pares de bases de tipo Watson-Crick o análogas. En algunas realizaciones, cada uno de los oligonucleótidos sonda incluye desoxirribonucleótidos. En algunas realizaciones, cada uno de los oligonucleótidos sonda incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos.
 40
 45

En algunos casos, las múltiples sondas abarcan diferentes secuencias diana y se llevan a cabo múltiples etapas de ligación en serie para determinar la ubicación y la abundancia de un analito.

En algunos casos, los métodos incluyen una primera sonda y se utilizan múltiples segundas sondas (o viceversa), hibridando las múltiples segundas sondas con diferentes secuencias (por ejemplo, secuencia de tipo natural frente a mutante, diferentes isoformas, variantes de empalme) con el fin de identificar la secuencia de un analito. Se aprecia que este método puede utilizarse para detectar mutaciones individuales (por ejemplo, mutaciones puntuales, SNP, variantes de empalme, etc.) o mutaciones de múltiples nucleótidos (por ejemplo, inserciones, deleciones, etc.).
 50

Los métodos proporcionados en el presente documento pueden aplicarse a una sola molécula de ácido nucleico o a una pluralidad de moléculas de ácido nucleico. Un método para analizar una muestra que comprende una molécula de ácido nucleico puede comprender proporcionar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ARN), donde cada molécula de ácido nucleico comprende una primera región diana (por ejemplo, una primera secuencia diana) y una segunda región diana (por ejemplo, una segunda secuencia diana), una pluralidad de oligonucleótidos de primera sonda y una pluralidad de oligonucleótidos de segunda sonda. En algunos casos, una o más regiones diana de las moléculas de ácido nucleico de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico pueden comprender la misma secuencia. Las regiones diana primera y segunda (por ejemplo, las secuencias diana primera y segunda) de una molécula de ácido nucleico de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico pueden ser adyacentes entre sí.
 55
 60

65 **(iv) Primera sonda que tiene una secuencia de ligador**

También se proporcionan en el presente documento métodos para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica, donde el método incluye una primera sonda que incluye un ligador y una segunda sonda. El uso de un par de sondas donde la primera sonda incluye una secuencia de ligador permite una mayor flexibilidad en el diseño de sondas de RTL, principalmente al aumentar las secuencias dentro del analito que pueden usarse como secuencias diana opcionales.

Tal como se usa en el presente documento, una "secuencia de ligador" puede referirse a una o más secuencias de ácidos nucleicos en una sonda (por ejemplo, una primera sonda, una segunda sonda o una sonda de extensión que están dispuestas entre secuencias que se hibridan con un analito, secuencias que unen entre sí las secuencias específicas de analito de una sonda). En algunas realizaciones, un ligador incluye una secuencia que no es sustancialmente complementaria ni a la secuencia del analito diana ni a las secuencias específicas del analito de una primera sonda, una segunda sonda o una sonda de extensión. En algunas realizaciones, la secuencia de ligador incluye ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos, donde la secuencia dentro del conector no es sustancialmente complementaria al analito diana o las secuencias específicas de analito de una primera sonda, una segunda sonda o una sonda de extensión.

En algunas realizaciones donde una primera y/o una segunda sonda incluyen una secuencia de ligador, la secuencia de ligador puede incluir un total de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, una secuencia de ligador incluye una secuencia de código de barras que sirve como sustituto para identificar el analito. En algunas realizaciones, la secuencia de código de barras es una secuencia que es idéntica en al menos el 70% (por ejemplo, idéntica en al menos el 75%, idéntica en al menos el 80%, idéntica en al menos el 85%, idéntica en al menos el 90%, idéntica en al menos el 95% o idéntica en al menos el 99%) a una secuencia en el analito. En algunas realizaciones donde una secuencia de ligador incluye una secuencia de código de barras, la secuencia de código de barras está ubicada en posición 5' con respecto a la secuencia de ligador. En algunas realizaciones donde una secuencia de ligador incluye una secuencia de código de barras, la secuencia de código de barras está ubicada en posición 3' con respecto a la secuencia de ligador. En algunas realizaciones, la secuencia de código de barras se dispone entre dos secuencias de ligador. En tales casos, las dos secuencias de ligador que flanquean la secuencia de código de barras pueden considerarse parte de la misma secuencia de ligador.

En algunas realizaciones donde una primera y/o una segunda sonda incluyen una secuencia de ligador, la secuencia de ligador puede incluir ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos.

Un ejemplo no limitativo de un método para identificar la ubicación de un analito en una muestra biológica incluye una primera sonda que incluye una secuencia de ligador y una segunda sonda que comprende: (a) poner en contacto la muestra biológica con un sustrato que incluye una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura incluye un dominio de captura y un código de barras espacial; (b) poner en contacto la muestra biológica con una primera sonda y una segunda sonda, en donde una porción de la primera sonda y una porción de la segunda sonda son sustancialmente complementarias a las secuencias adyacentes del analito, en donde la primera sonda incluye: (i) una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito; (ii) una secuencia de ligador; (iii) una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana del analito; y en donde la segunda sonda incluye una secuencia que es sustancialmente complementaria a una tercera secuencia diana del analito y un dominio de captura de sonda de captura que puede unirse a un dominio de captura de una sonda de captura; (c) hibridar la primera sonda y la segunda sonda con el analito; (d) ligar la primera sonda y la segunda sonda, creando así un producto de ligación; (e) liberar el producto de ligación del analito; (f) hibridar el dominio de unión de sonda de captura con un dominio de captura; y (g) determinar (i) la totalidad o una parte de la secuencia del producto de ligación unido específicamente al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) la totalidad o una parte de la secuencia del código de barras espacial, o un complemento del mismo, y usar la secuencia determinada de (i) y (ii) para identificar la ubicación del analito en la muestra biológica.

Un ejemplo no limitativo de un método para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica donde el método incluye una primera sonda que incluye un ligador y una segunda sonda puede incluir los componentes tal como se muestra en la **figura 8**. Una primera sonda **801** incluye una secuencia funcional **802**, una primera secuencia **803** que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana **804** del analito, una secuencia de ligador **805**; y una segunda secuencia **806** que es sustancialmente complementario a una segunda secuencia diana **807** del analito. Una segunda sonda **808** incluye una secuencia **809** que es sustancialmente complementaria a una tercera secuencia diana **810** del analito y un dominio de captura de sonda de captura **811** que puede unirse a un dominio de captura de una sonda de captura.

1) Primera sonda

En algunas realizaciones donde la primera sonda incluye una secuencia de ligador, la primera sonda incluye una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito, una secuencia de ligador, y una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a la segunda secuencia diana del analito. En algunas realizaciones, una primera sonda incluye de 5' a 3': una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una

primera secuencia diana del analito, una secuencia de ligador y una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a la segunda secuencia diana del analito.

5 En algunas realizaciones donde una primera sonda incluye una secuencia de ligador, la primera sonda incluye una secuencia funcional. En algunas realizaciones, una primera sonda incluye de una secuencia funcional, una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito, una secuencia de ligador y una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a la segunda secuencia diana del analito. En algunas realizaciones, la secuencia funcional incluye una secuencia de cebador.

10 En algunas realizaciones donde una primera sonda incluye una secuencia de ligador, una primera sonda incluye al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3'. En algunas realizaciones, una primera sonda incluye al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos diez bases de ácido ribonucleico en el extremo 3'.

15 En algunas realizaciones donde una primera sonda incluye un ligador, la primera sonda incluye una secuencia que tiene de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos (por ejemplo, una secuencia de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 250 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 250 nucleótidos, de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, de aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 250 nucleótidos, de aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, de aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, de aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, de aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 250 nucleótidos, de aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, de aproximadamente 200 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, de aproximadamente 200 nucleótidos a aproximadamente 250 nucleótidos, o aproximadamente 250 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos).

20 En algunas realizaciones donde una primera sonda incluye una secuencia de ligador, la primera sonda incluye una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito. En algunas realizaciones, la primera secuencia de la primera sonda es complementaria en al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% a la primera secuencia diana en el analito. En algunas realizaciones, la primera secuencia de la primera sonda que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana puede incluir una secuencia que tiene de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en el presente documento.

25 En algunas realizaciones donde una primera sonda incluye un ligador, la primera sonda incluye una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana del analito. En algunas realizaciones, la segunda secuencia de la primera sonda es complementaria en al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% a la segunda secuencia diana en el analito. En algunas realizaciones, la segunda secuencia de la primera sonda que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana puede incluir una secuencia que tiene de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en el presente documento.

30 En algunas realizaciones, una primera sonda que incluye una secuencia de ligador incluye ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos que pueden participar en interacciones de pares de bases de tipo Watson-Crick o análogas. En algunas realizaciones, la primera sonda que incluye una secuencia de ligador incluye desoxirribonucleótidos. En algunas realizaciones, la primera sonda que incluye una secuencia de ligador incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. En algunas realizaciones donde la primera sonda que incluye una secuencia de ligador incluye desoxirribonucleótidos, la hibridación de la primera sonda con la molécula de ARNm da como resultado un híbrido ADN:ARN. En algunas realizaciones, la primera sonda que incluye una secuencia de ligador incluye solo desoxirribonucleótidos y tras la hibridación de la primera sonda con la molécula de ARNm se da como resultado un híbrido ADN:ARN.

60 2) Segunda sonda

65 En algunas realizaciones donde una primera sonda incluye una secuencia de ligador, una segunda sonda incluye una secuencia que es sustancialmente complementaria a una tercera secuencia diana del analito y un dominio de captura de sonda de captura que puede unirse a un dominio de captura de una sonda de captura. En algunas realizaciones donde una primera sonda incluye un ligador, una segunda sonda incluye una secuencia que tiene de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en el presente documento.

5 En algunas realizaciones donde una primera sonda incluye un ligador, la secuencia de la segunda sonda es complementaria en al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% a la tercera secuencia diana en el analito. En algunas realizaciones, la secuencia de la segunda sonda que es sustancialmente complementaria a una tercera secuencia diana puede incluir una secuencia que tiene de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en el presente documento.

10 En algunas realizaciones donde una primera sonda incluye una secuencia de ligador, una primera secuencia diana no es adyacente a una segunda secuencia diana. Por ejemplo, la primera secuencia diana y la segunda secuencia diana están ubicadas en diferentes exones de la misma molécula de ARNm. En otro ejemplo, la primera secuencia diana y la segunda secuencia diana están ubicadas en el mismo exón de la misma molécula de ARNm no son adyacentes. En algunos casos, la primera sonda y la segunda sonda se hibridan con secuencias que tienen al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos de diferencia.

En algunas realizaciones donde una primera sonda incluye una secuencia de ligador, una segunda secuencia diana es directamente adyacente a una tercera secuencia diana.

20 En algunas realizaciones, donde una primera sonda incluye una secuencia de ligador, la segunda sonda incluye ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos que pueden participar en interacciones de pares de bases de tipo Watson-Crick o análogas. En algunas realizaciones, la segunda sonda incluye desoxirribonucleótidos. En algunas realizaciones, la segunda sonda incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. En algunas realizaciones donde la segunda sonda incluye desoxirribonucleótidos, la hibridación de la segunda sonda con la molécula de ARNm da como resultado un híbrido ADN:ARN. En algunas realizaciones, la segunda sonda incluye solo desoxirribonucleótidos y tras la hibridación de la segunda sonda con la molécula de ARNm se da como resultado un híbrido ADN:ARN.

(V) Segunda sonda que tiene un ligador

30 También se proporcionan en el presente documento métodos para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica, donde el método incluye una primera sonda y una segunda sonda que incluye una secuencia de ligador. El uso de un par de sondas donde la segunda sonda incluye una secuencia de ligador permite una mayor flexibilidad en el diseño de sondas de RTL, principalmente al aumentar las secuencias dentro del analito que pueden usarse como secuencias diana opcionales.

35 Un ejemplo no limitativo de un método para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica donde el método incluye una primera sonda y una segunda sonda que incluye un ligador, incluye: (a) poner en contacto la muestra biológica con un sustrato que incluye una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura incluye un dominio de captura y un código de barras espacial; (b) poner en contacto la muestra biológica con una primera sonda y una segunda sonda, en donde una porción de la primera sonda y una porción de la segunda son sustancialmente complementarias a secuencias adyacentes del analito, en donde la primera sonda incluye una secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito, en donde la segunda sonda incluye: (i) una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana del analito; (ii) una secuencia de ligador; (iii) una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a una tercera secuencia diana del analito; y (iv) un dominio de unión de sonda de captura que puede unirse a un dominio de captura de una sonda de captura; (c) hibridar la primera sonda y la segunda sonda con el analito; (d) ligar la primera sonda y la segunda sonda, creando así un producto de ligación; (e) liberar el producto de ligación del analito; (f) hibridar el dominio de unión de sonda de captura con un dominio de captura; y (g) determinar (i) la totalidad o una parte de la secuencia del producto de ligación unido específicamente al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) la totalidad o una parte de la secuencia del código de barras espacial, o un complemento del mismo, y usar la secuencia determinada de (i) y (ii) para identificar la ubicación del analito en la muestra biológica.

50 Un ejemplo no limitativo de un método para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica donde el método incluye una primera sonda y una segunda sonda que incluye un ligador puede incluir los componentes tal como se muestra en la figura 9. Una primera sonda **901** incluye una secuencia funcional **902** y una secuencia **903** que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana **904** del analito. Una segunda sonda **905** incluye una primera secuencia **906** que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana **907** del analito, una secuencia de ligador **908**; y una segunda secuencia **909** que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana **910** del analito, y un dominio de captura de sonda de captura **911** que puede unirse a un dominio de captura de una sonda de captura.

1) Primera sonda

60 En algunas realizaciones donde una segunda sonda incluye una secuencia de ligador, una primera sonda incluye una secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito.

5 En algunas realizaciones donde una segunda sonda incluye una secuencia de ligador, una primera sonda incluye una secuencia funcional. En algunas realizaciones, una primera sonda incluye una secuencia funcional y una secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito. En algunas realizaciones, la secuencia funcional incluye una secuencia de cebador. En algunas realizaciones, el primer oligonucleótido sonda incluye de 5' a 3': una secuencia funcional y una secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana.

10 En algunas realizaciones donde un ligador está en un segunda sonda, una primera sonda incluye una secuencia que tiene de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en el presente documento.

15 En algunas realizaciones donde la segunda sonda incluye una secuencia de ligador, una secuencia de una primera sonda que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana en el analito es complementaria en al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% a la primera secuencia diana en el analito. En algunas realizaciones, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana puede incluir una secuencia que tiene de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en el presente documento.

20 En algunas realizaciones donde una segunda sonda incluye una secuencia de ligador, una primera sonda incluye al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3'. En algunas realizaciones, una primera sonda incluye al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos diez bases de ácido ribonucleico en el extremo 3'.

25 En algunas realizaciones donde una segunda sonda incluye una secuencia de ligador, la primera sonda incluye ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos que pueden participar en interacciones de pares de bases de tipo Watson-Crick o análogas. En algunas realizaciones, la primera sonda incluye desoxirribonucleótidos. En algunas realizaciones, la primera sonda incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. En algunas realizaciones donde la primera sonda incluye desoxirribonucleótidos, la hibridación de la primera sonda con la molécula de ARNm da como resultado un híbrido ADN:ARN. En algunas realizaciones, la primera sonda incluye solo desoxirribonucleótidos y tras la hibridación de la primera sonda con la molécula de ARNm se da como resultado un híbrido ADN:ARN.

2) Segunda sonda

35 En algunas realizaciones donde un ligador está en una segunda sonda, la segunda sonda incluye (i) una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana del analito; (ii) una secuencia de ligador (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de ligador a modo de ejemplo descritas en el presente documento); (iii) una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a la tercera secuencia diana del analito; y (iv) un dominio de captura de sonda de captura (por ejemplo, cualquiera de los dominios de captura de sonda de captura a modo de ejemplo descritos en el presente documento) que puede unirse a un dominio de captura de una sonda de captura.

40 En algunas realizaciones donde una segunda sonda incluye una secuencia de ligador, la segunda sonda incluye una secuencia que tiene de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en el presente documento.

45 En algunas realizaciones donde una primera sonda incluye una secuencia de ligador, la segunda sonda incluye una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana del analito. En algunas realizaciones, la primera secuencia de la segunda sonda es complementaria en al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% a la segunda secuencia diana en el analito. En algunas realizaciones, la primera secuencia de la segunda sonda que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana puede incluir una secuencia que tiene de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en el presente documento.

55 En algunas realizaciones donde una segunda sonda incluye una secuencia de ligador, la segunda sonda incluye una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a una tercera secuencia diana del analito. En algunas realizaciones, la segunda secuencia de la segunda sonda es complementaria en al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% a la tercera secuencia diana en el analito. En algunas realizaciones, la segunda secuencia de la segunda sonda que es sustancialmente complementaria a una tercera secuencia diana puede incluir una secuencia que tiene de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en el presente documento.

60 En algunas realizaciones donde una segunda sonda incluye una secuencia de ligador, una segunda secuencia diana no es adyacente a una tercera secuencia diana la molécula de ARNm. Por ejemplo, la segunda secuencia diana y la tercera secuencia diana están ubicadas en diferentes exones de la misma molécula de ARNm. En otro ejemplo, la segunda

secuencia diana y la tercera secuencia diana están ubicadas en el mismo exón de la misma molécula de ARNm pero no son adyacentes.

5 En algunas realizaciones donde una segunda sonda incluye una secuencia de ligador, una primera secuencia diana es directamente adyacentes a una segunda secuencia diana.

10 En algunas realizaciones, una segunda sonda que incluye una secuencia de ligador incluye ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos que pueden participar en interacciones de pares de bases de tipo Watson-Crick o análogas. En algunas realizaciones, la segunda sonda que incluye una secuencia de ligador incluye desoxirribonucleótidos. En algunas realizaciones, la segunda sonda que incluye una secuencia de ligador incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. En algunas realizaciones donde la segunda sonda que incluye una secuencia de ligador incluye desoxirribonucleótidos, la hibridación de la segunda sonda con la molécula de ARNm da como resultado un híbrido ADN:ARN. En algunas realizaciones, la segunda sonda que incluye una secuencia de ligador incluye solo desoxirribonucleótidos y tras la hibridación de la segunda sonda con la molécula de ARNm se da como resultado un híbrido ADN:ARN.

(vii) Combinación de sondas con ligadores en la primera y la segunda sonda

20 También se proporcionan en el presente documento métodos para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica, donde el método incluye una primera sonda y una segunda sonda que incluye una secuencia de ligador. El uso de un par de sondas donde la primera sonda y la segunda incluyen cada una, una secuencia de ligador permite una mayor flexibilidad en el diseño de sondas de RTL, principalmente al aumentar las secuencias dentro del analito que pueden usarse como secuencias diana opcionales.

25 (c) Combinaciones de sondas que incluyen una primera sonda, una segunda sonda y una sonda de extensión

30 También se proporcionan en el presente documento métodos para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica, donde el método incluye una primera sonda, una sonda de extensión y una segunda sonda. El uso de una sonda de extensión permite una mayor flexibilidad en el diseño de sondas de RTL, principalmente al aumentar las secuencias dentro del analito que pueden usarse como secuencias diana opcionales. En algunos casos, también puede usarse una sonda de extensión para analizar las variantes (por ejemplo, variantes de empalme) que se extienden en distancias mayores que pueden analizarse usando una primera o segunda sondas con una secuencia de ligador.

35 Un ejemplo no limitativo de un método para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica donde el método incluye una primera sonda, una sonda de extensión y una segunda sonda, incluye: (a) poner en contacto la muestra biológica con un sustrato que incluye una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura incluye un dominio de captura y un código de barras espacial; (b) poner en contacto la muestra biológica con una primera sonda, una segunda sonda y una o más sondas de extensión, en donde la primera sonda es sustancialmente complementaria a una primera porción del analito, en donde la segunda sonda es sustancialmente complementaria a una segunda porción del analito e incluye además un dominio de unión de sonda de captura, y en donde la sonda de extensión incluye: (i) una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito, y (ii) una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana del analito; (c) hibridar la primera sonda, la segunda sonda y la sonda de extensión con el analito; (d) ligar la primera sonda, la una o más sondas de extensión y la segunda sonda, creando así un producto de ligación que es sustancialmente complementario al analito; (e) liberar el producto de ligación del analito; (f) hibridar el dominio de unión de sonda de captura con un dominio de captura; y (g) determinar (i) la totalidad o una parte de la secuencia del producto de ligación unido específicamente al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) la totalidad o una parte de la secuencia del código de barras espacial, o un complemento del mismo, y usar la secuencia determinada de (i) y (ii) para identificar la ubicación del analito en la muestra biológica.

50 Un ejemplo no limitativo de un método para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica donde el método incluye una primera sonda, una segunda sonda y una sonda de extensión puede incluir los componentes tal como se muestra en la figura 10. Una primera sonda **1001** incluye una secuencia funcional **1002**, una secuencia **1003** que es sustancialmente complementaria a una primera porción **1004** del analito. Una sonda de extensión **1005** incluye una primera secuencia **1006** que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana **1007** del analito, una secuencia de ligador **1008**; y una segunda secuencia **1009** que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana **1010** del analito. Una segunda sonda **1011** incluye una secuencia **1012** que es sustancialmente complementaria a una segunda porción **1013** del analito y un dominio de captura de sonda de captura **1014**.

60 (i) Primera sonda

65 En algunas realizaciones donde el método incluye una sonda de extensión, una primera sonda incluye una secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera porción del analito. En algunas realizaciones, una secuencia de la primera sonda es complementaria en al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% a la primera porción del analito. En algunas realizaciones, la

secuencia de la primera sonda que es sustancialmente complementaria a una primera porción del analito puede incluir una secuencia que tiene de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la primera sonda incluye una secuencia funcional. En algunas realizaciones, la secuencia funcional es una secuencia de cebador.

5 En algunas realizaciones donde el método incluye una sonda de extensión, una primera sonda incluye al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3'. En algunas realizaciones, una primera sonda incluye al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos diez bases de ácido ribonucleico en el extremo 3'.

10 En algunas realizaciones donde el método incluye una sonda de extensión, una primera sonda incluye de 5' a 3': una secuencia funcional, una secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera porción del analito y dos o más bases de ácido ribonucleico.

15 En algunas realizaciones donde el método incluye una sonda de extensión, una primera sonda incluye ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos que pueden participar en interacciones de pares de bases de tipo Watson-Crick o análogas. En algunas realizaciones, la primera sonda incluye desoxirribonucleótidos. En algunas realizaciones, la primera sonda incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. En algunas realizaciones donde la primera sonda incluye desoxirribonucleótidos, la hibridación de la primera sonda con la molécula de ARNm da como resultado un híbrido ADN:ARN. En algunas realizaciones, la primera sonda incluye solo desoxirribonucleótidos y tras la hibridación de la primera sonda con la molécula de ARNm se da como resultado un híbrido ADN:ARN.

(ii) Sonda de extensión

25 En algunas realizaciones donde el método incluye una sonda de extensión, la sonda de extensión incluye una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito, y una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana del analito. En algunas realizaciones, la sonda de extensión incluye una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito, una secuencia de funcional y una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a la segunda secuencia diana del analito. En algunas realizaciones, una sonda de extensión incluye de 5' a 3': una primera secuencia, una secuencia funcional y una segunda secuencia. En algunas realizaciones, la secuencia funcional es una secuencia de ligador. La secuencia de ligador puede incluir un total de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en el presente documento.

35 En algunas realizaciones, la secuencia funcional incluye una secuencia de código de barras. En algunas realizaciones, la sonda de extensión puede incluir un ligador y una secuencia de código de barras. En tales casos, las secuencias de ligador pueden flanquear el código de barras, el código de barras puede estar en posición 5' con respecto a una secuencia de ligador, o el código de barras puede estar en posición 3' con respecto a una secuencia de ligador. En algunas realizaciones, una secuencia de código de barras está flanqueada por una secuencia de ligador en posición 5' (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de ligador a modo de ejemplo descritas en el presente documento) y una secuencia de ligador en posición 3' (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de ligador a modo de ejemplo descritas en el presente documento).

40 En algunas realizaciones, la sonda de extensión incluye de 5' a 3': una primera secuencia, una secuencia de ligador en posición 5', un código de barras, una secuencia de ligador en posición 3' y una segunda secuencia.

En algunas realizaciones, las sondas de extensión incluyen una secuencia que tiene de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en el presente documento.

50 En algunas realizaciones, una primera secuencia de la sonda de extensión es complementaria en al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% a la primera secuencia diana en el analito. En algunas realizaciones, una segunda secuencia de la sonda de extensión es complementaria en al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% a la segunda secuencia diana en el analito.

En algunas realizaciones, la primera secuencia de la sonda de extensión y la segunda secuencia de la sonda de extensión son sustancialmente complementarias a las secuencias dentro del mismo exón.

60 En algunas realizaciones, la primera secuencia diana del analito y la segunda diana del analito están ubicadas dentro del mismo exón. En tales casos, la primera secuencia diana y la segunda secuencia diana no son directamente adyacentes.

65 En algunas realizaciones, la primera secuencia de la sonda de extensión y la segunda secuencia de la sonda de extensión son sustancialmente complementarias a las secuencias dentro de los diferentes exones del mismo gen. En algunas

realizaciones, la primera secuencia diana del analito y la segunda diana del analito están ubicadas en diferentes exones del mismo gen.

5 En algunas realizaciones, la sonda de extensión incluye ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos que pueden participar en interacciones de pares de bases de tipo Watson-Crick o análogas. En algunas realizaciones, la sonda de extensión incluye desoxirribonucleótidos. En algunas realizaciones, la sonda de extensión incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. En algunas realizaciones donde la sonda de extensión incluye desoxirribonucleótidos, la hibridación de la sonda de extensión con la molécula de ARNm da como resultado un híbrido ADN:ARN. En algunas realizaciones, la sonda de extensión incluye solo desoxirribonucleótidos y tras la hibridación de la
10 sonda de extensión con la molécula de ARNm se da como resultado un híbrido ADN:ARN.

(iii) Segunda sonda

15 En algunas realizaciones donde el método incluye una sonda de extensión, una segunda sonda incluye una secuencia que es sustancialmente complementaria a una segunda porción del analito y un dominio de captura de sonda de captura (por ejemplo, cualquiera de los dominios de captura de sonda de captura a modo de ejemplo descritos en el presente documento).

20 En algunas realizaciones donde el método incluye una sonda de extensión, una secuencia de la segunda sonda es complementaria en al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% a una segunda porción del analito. En algunas realizaciones, la secuencia de la segunda sonda que es sustancialmente complementaria a una segunda porción del analito puede incluir una secuencia que tiene de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos
25 descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones donde el método incluye una sonda de extensión, la primera porción del analito es directamente adyacente a la primera secuencia diana y/o la segunda porción del analito es directamente adyacente a la segunda secuencia diana. En tales casos, la secuencia de la primera sonda se liga a la primera secuencia de la sonda de extensión, y la secuencia de la segunda sonda se liga a la segunda secuencia de la sonda de extensión. En algunas realizaciones, la sonda de extensión incluye al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3', la primera sonda incluye al menos dos ácidos ribonucleicos en el extremo 3', o ambos. En algunas realizaciones, la sonda de extensión incluye un nucleótido fosforilado en el extremo 5', la segunda sonda incluye un nucleótido fosforilado en el extremo 5', o ambos.
30

35 En algunas realizaciones donde el método incluye una sonda de extensión, una segunda sonda incluye ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos que pueden participar en interacciones de pares de bases de tipo Watson-Crick o análogas. En algunas realizaciones, la segunda sonda incluye desoxirribonucleótidos. En algunas realizaciones, la segunda sonda incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. En algunas realizaciones donde la segunda sonda incluye desoxirribonucleótidos, la hibridación de la segunda sonda con la molécula de ARNm da como resultado un híbrido ADN:ARN. En algunas realizaciones, la segunda sonda incluye solo desoxirribonucleótidos y tras la hibridación de la segunda sonda con la molécula de ARNm se da como resultado un híbrido ADN:ARN.
40

(iv) Combinaciones de sondas que incluyen una primera sonda, una segunda sonda y múltiples sondas de extensión

45 También se proporcionan en el presente documento métodos para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica, donde el método incluye una primera sonda, al menos dos sondas de extensión y una segunda sonda. El uso de dos o más sondas de extensión permite una mayor flexibilidad en el diseño de sondas de RTL, principalmente al aumentar las secuencias dentro del analito que pueden usarse como secuencias diana opcionales. En algunos casos, el uso de dos o más sondas de extensión también puede usarse para analizar las variantes (por ejemplo, variantes de empalme) que se extienden en distancias mayores que pueden analizarse usando una sonda de extensión.
50

Un ejemplo no limitativo de un método para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica donde el método incluye una primera sonda, dos o más sondas de extensión y una segunda sonda, incluye: (a) poner en contacto la muestra biológica con un sustrato que incluye una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura incluye un dominio de captura y un código de barras espacial; (b) poner en contacto la muestra biológica con una primera sonda, una segunda sonda y dos sondas de extensión, en donde la primera sonda es sustancialmente complementaria a una primera porción del analito, en donde la segunda sonda es sustancialmente complementaria a una segunda porción del analito e incluye además un dominio de unión de sonda de captura, y en donde la sonda de extensión incluye: (i) una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito, y (ii) una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana del analito; y la segunda sonda de extensión incluye (i) una tercera secuencia que es sustancialmente complementaria a una tercera secuencia diana del analito, y (ii) una cuarta secuencia que es sustancialmente complementaria a una cuarta secuencia diana del analito; (c) hibridar la primera sonda, la segunda sonda y la sonda de extensión con el analito; (d) ligar la primera sonda, la una o más sondas de extensión y la segunda sonda, creando así un producto de ligación que es sustancialmente complementario al analito; (e) liberar el producto de ligación del analito; (f)
55
60
65

hibridar el dominio de unión de sonda de captura con un dominio de captura; y (g) determinar (i) la totalidad o una parte de la secuencia del producto de ligación unido específicamente al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) la totalidad o una parte de la secuencia del código de barras espacial, o un complemento del mismo, y usar la secuencia determinada de (i) y (ii) para identificar la ubicación del analito en la muestra biológica.

En algunas realizaciones, los métodos que incluyen una o más sondas de extensión incluyen al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más sondas de extensión. En tales casos, la una o más sondas de extensión incluyen (i) una tercera secuencia que es sustancialmente complementaria a una tercera secuencia diana del analito, y (ii) una cuarta secuencia que es sustancialmente complementaria a una cuarta secuencia diana del analito.

En algunas realizaciones donde el método incluye dos (o más) sondas de extensión, la primera secuencia diana está ubicada en un primer exón, la segunda secuencia diana está ubicada en un segundo exón y la tercera secuencia diana y la cuarta secuencia diana están ubicadas en un tercer exón. En algunas realizaciones donde el método incluye dos (o más) sondas de extensión, la primera secuencia diana está ubicada en un primer exón, la segunda secuencia diana está ubicada en un segundo exón, la tercera secuencia diana está ubicada en un tercer exón y la cuarta secuencia diana está ubicada en un cuarto exón. En algunas realizaciones donde el método incluye dos (o más) sondas de extensión, la primera secuencia diana y la segunda secuencia diana están ubicadas en un primer exón, y la tercera secuencia diana y la cuarta secuencia diana están ubicadas en un segundo exón. En algunas realizaciones donde el método incluye dos (o más) sondas de extensión, la primera secuencia diana y la segunda secuencia diana están ubicadas en un primer exón, la tercera secuencia diana está ubicada en un segundo exón y la cuarta secuencia diana está ubicada en un tercer exón.

En algunas realizaciones, donde los métodos incluyen dos (o más) sondas de extensión, el método incluye ligar: la primera sonda a la sonda de extensión, la sonda de extensión a una o más sondas de extensión adicionales y el uno o más oligonucleótidos de extensión de sondas de extensión adicionales a la segunda sonda, creando así un producto de ligación que incluye una o más secuencias que son sustancialmente complementarias al analito. En algunas realizaciones, donde los métodos incluyen dos (o más) sondas de extensión, el método incluye ligar: la primera sonda a una o más sondas de extensión adicionales, la una o más sondas de extensión adicionales a la sonda de extensión y la sonda de extensión a la segunda sonda, creando así un producto de ligación que incluye una o más secuencias que son sustancialmente complementarias al analito.

En algunas realizaciones, cada sonda de extensión adicional puede incluir una secuencia funcional (por ejemplo, cualquiera de las secuencias funcionales descritas en el presente documento). Por ejemplo, cada sonda de extensión adicional puede incluir una secuencia de ligador (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de ligador a modo de ejemplo descritas en el presente documento). En otro ejemplo, cada sonda de extensión adicional puede incluir una secuencia de código de barras (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de código de barras a modo de ejemplo descritas en el presente documento) y una secuencia de ligador (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de ligador descritas en el presente documento). En algunas realizaciones donde una sonda de extensión adicional incluye un código de barras y un ligador, las secuencias de ligador pueden flanquear el código de barras, el código de barras puede estar en posición 5' con respecto a una secuencia de ligador, o el código de barras puede estar en posición 3' con respecto a una secuencia de ligador. En algunas realizaciones, una secuencia de código de barras está flanqueada por una secuencia de ligador en posición 5' (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de ligador a modo de ejemplo descritas en el presente documento) y una secuencia de ligador en posición 3' (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de ligador a modo de ejemplo descritas en el presente documento). En algunas realizaciones, una sonda de extensión adicional puede incluir de 5' a 3': una primera secuencia, una secuencia de ligador en posición 5', un código de barras, una secuencia de ligador en posición 3' y una segunda secuencia.

(d) Métodos de prehibridación

(i) Obtención de imágenes y tinción

Antes de la adición de las sondas, en algunos casos, las muestras biológicas pueden teñirse usando una amplia variedad de colorantes y técnicas de tinción. En algunos casos, la muestra biológica es una sección de un portaobjetos (por ejemplo, una sección de 10 µm). En algunos casos, la muestra biológica se seca después de colocarla sobre un portaobjetos de vidrio. En algunos casos, la muestra biológica se seca a 42°C. En algunos casos, el secado se produce durante aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas o hasta que las secciones se vuelven transparentes. En algunos casos, la muestra biológica puede secarse durante la noche (por ejemplo, en un desecador a temperatura ambiente).

En algunas realizaciones, una muestra puede teñirse usando cualquier número de colorantes biológicos incluyendo, pero sin limitarse a, naranja de acridina, marrón de Bismarck, carmín, azul de coomassie, violeta de cresilo, DAPI, eosina, bromuro de etidio, fucsina ácida, hematoxilina, tinciones de Hoechst, yodo, verde de metilo, azul de metileno, rojo neutro, azul del Nilo, rojo del Nilo, tetróxido de osmio, yoduro de propidio, rodamina o safranina. En algunos casos, los métodos dados a conocer en el presente documento incluyen la obtención de imágenes de la muestra biológica. En algunos casos, la obtención de imágenes de la muestra se produce antes de la desaminación de la muestra biológica. En algunos casos, la muestra puede teñirse usando técnicas de tinción conocidas, que incluyen las técnicas de tinción de Can-Grunwald, Giemsa, hematoxilina y eosina (H&E), Jenner, Leishman, tricrómico de Masson, Papanicolaou, Romanowsky, plata,

Sudán, Wright y/o ácido periódico de Schiff (PAS). La tinción de PAS se realiza normalmente después de la fijación en formalina o acetona. En algunos casos, el colorante es un colorante de H&E.

5 En algunas realizaciones, la muestra biológica puede teñirse usando un marcador detectable (por ejemplo, radioisótopos, fluoróforos, compuestos quimioluminiscentes, compuestos bioluminiscentes y tintes) tal como se describe en otra parte del presente documento. En algunas realizaciones, una muestra biológica se tiñe usando solo un tipo de tinción o una técnica. En algunas realizaciones, la tinción incluye técnicas de tinción biológica tales como la tinción con H&E. En algunas realizaciones, la tinción incluye la identificación de analitos usando anticuerpos conjugados con fluorescencia. En algunas realizaciones, una muestra biológica se tiñe usando dos o más tipos diferentes de colorantes, o dos o más técnicas de tinción diferentes. Por ejemplo, puede prepararse una muestra biológica mediante tinción y obtención de imágenes usando una técnica (por ejemplo, tinción con H&E y obtención de imágenes de campo claro), seguida de tinción y obtención de imágenes usando otra técnica (por ejemplo, tinción IHC/IF y microscopía de fluorescencia) para la misma muestra biológica.

15 En algunas realizaciones, puede retirarse la tinción de la muestra biológica. Se conocen en la técnica métodos para retirar la tinción o el color de una muestra biológica y generalmente dependen de la naturaleza de el/los colorante(s) aplicado(s) a la muestra. Por ejemplo, puede retirarse la tinción con H&E lavando la muestra en HCl o cualquier otro ácido (por ejemplo, ácido selénico, ácido sulfúrico, ácido yodhídrico, ácido benzoico, ácido carbónico, ácido málico, ácido fosfórico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido sulfuroso, ácido tricloroacético, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido ortofosfórico, ácido arsénico, ácido selenioso, ácido crómico, ácido cítrico, ácido fluorhídrico, ácido nitroso, ácido isocianico, ácido fórmico, seleniuro de hidrógeno, ácido molibdico, ácido láctico, ácido acético, ácido carbónico, sulfuro de hidrógeno o combinaciones de los mismos). En algunas realizaciones, la retirada de la tinción puede incluir 1, 2, 3, 4, 5 o más lavados en un ácido (por ejemplo, HCl). En algunas realizaciones, la retirada de la tinción puede incluir la adición de HCl a una disolución posterior (por ejemplo, disolución de permeabilización). En algunas realizaciones, la retirada de la tinción puede incluir disolver una enzima usada en los métodos dados a conocer (por ejemplo, pepsina) en una disolución ácida (por ejemplo, HCl). En algunas realizaciones, después de retirar la hematoxilina con un ácido, pueden añadirse otros reactivos a la disolución de retirada de tinción para elevar el pH para su uso en otras aplicaciones. Por ejemplo, puede añadirse SDS a una disolución ácida de retirada de tinción con el fin de elevar el pH en comparación con la disolución ácida de retirada de tinción. Como otro ejemplo, en algunas realizaciones, se aplican uno o más colorantes de inmunofluorescencia a la muestra a través del acoplamiento de anticuerpos. Tales colorantes pueden retirarse usando técnicas tales como escisión de enlaces disulfuro mediante tratamiento con un agente reductor y lavado con detergente, tratamiento con sal caotrópica, tratamiento con disolución de recuperación de antígenos y tratamiento con un tampón de glicina ácida. Los métodos para la tinción y retirada de tinción multiplexadas se describen, por ejemplo, en Bolognesi et al., *J. Histochem. Cytochem.* 2017; 65(8): 431-444, Lin et al., *Nat Commun.* 2015; 6:8390, Pirici et al., *J. Histochem. Cytochem.* 2009; 57:567-75, y Glass et al., *J. Histochem. Cytochem.* 2009; 57:899-905.

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

50 En algunos casos, puede añadirse a la muestra una disolución de glicerol y un cubreobjetos. En algunos casos, la disolución de glicerol puede incluir una contratinción (por ejemplo, DAPI).

55 Tal como se usa en el presente documento, un tampón de recuperación de antígenos puede mejorar la captura de anticuerpos en los protocolos de IF/IHC. Un protocolo a modo de ejemplo para la recuperación de antígenos puede ser precalentar el tampón de recuperación de antígenos (por ejemplo, hasta 95°C), sumergir la muestra biológica en el tampón de recuperación de antígenos calentado durante un tiempo predeterminado y luego retirar la muestra biológica del tampón de recuperación de antígenos y lavar la muestra biológica.

60 En algunas realizaciones, puede ser útil optimizar la permeabilización para identificar analitos intracelulares. La optimización de la permeabilización puede incluir la selección de agentes de permeabilización, la concentración de agentes de permeabilización y la duración de la permeabilización. La permeabilización de tejidos se analiza en otra parte del presente documento.

65 En algunas realizaciones, el bloqueo de una matriz y/o una muestra biológica en la preparación del marcaje de la muestra biológica disminuye la unión no específica de los anticuerpos a la matriz y/o muestra biológica (disminuye el fondo). Algunas realizaciones proporcionan tampones de bloqueo/disoluciones de bloqueo que pueden aplicarse antes y/o durante la aplicación del marcador, donde el tampón de bloqueo puede incluir un agente de bloqueo y, opcionalmente, un

tensioactivo y/o una solución salina. En algunas realizaciones, un agente de bloqueo puede ser albúmina de suero bovino (BSA), suero, gelatina (por ejemplo, gelatina de pescado), leche (por ejemplo, leche en polvo desnatada), caseína, polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), o polivinilpirrolidona (PVP), reactivo de bloqueo de biotina, un reactivo de bloqueo de peroxidasa, levamisol, disolución de Carnoy, glicina, lisina, borohidruro de sodio, pontamina azul cielo, negro de Sudán, azul de tripano, agente de bloqueo de FITC y/o ácido acético. El tampón de bloqueo/disolución de bloqueo puede aplicarse a la matriz y/o muestra biológica antes y/o durante el marcaje (por ejemplo, aplicación de anticuerpos conjugados con fluoróforo) a la muestra biológica.

(ii) Preparación de la muestra para la aplicación de sondas

En algunos casos, la muestra biológica se desparafina. La desparafinación puede lograrse usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, en algunos casos, las muestras biológicas se tratan con una serie de lavados que incluyen xileno y diversas concentraciones de etanol. En algunos casos, los métodos de desparafinación incluyen el tratamiento del xileno (por ejemplo, tres lavados de 5 minutos cada uno). En algunos casos, los métodos incluyen además tratamiento con etanol (por ejemplo, etanol al 100%, dos lavados de 10 minutos cada uno; etanol al 95%, dos lavados de 10 minutos cada uno; etanol al 70%, dos lavados de 10 minutos cada uno; etanol al 50%, dos lavados 10 minutos cada uno). En algunos casos, después de los lavados con etanol, la muestra biológica puede lavarse con agua desionizada (por ejemplo, dos lavados de 5 minutos cada uno). Se aprecia que un experto en la materia puede ajustar estos métodos para optimizar la desparafinación.

En algunos casos, la muestra biológica se desreticula. En algunos casos, la muestra biológica se desreticula en una disolución que contiene tampón TE (que comprende Tris y EDTA). En algunos casos, el tampón TE es básico (por ejemplo, a un pH de aproximadamente 9). En algunos casos, la desreticulación se produce a de aproximadamente 50°C a aproximadamente 80°C. En algunos casos, la desreticulación se produce a aproximadamente 70°C. En algunos casos, la desreticulación se produce durante aproximadamente 1 hora a 70°C. Justo antes de la desreticulación, la muestra biológica puede tratarse con un ácido (por ejemplo, HCl 0,1 M durante aproximadamente 1 minuto). Después de la etapa de desreticulación, la muestra biológica puede lavarse (por ejemplo, con PBST 1x).

En algunos casos, los métodos de preparación de una muestra biológica para la aplicación de la sonda incluyen la permeabilización de la muestra. En algunos casos, la muestra biológica se permeabiliza usando un tampón fosfato. En algunos casos, el tampón de fosfato es PBS (por ejemplo, PBS 1x). En algunos casos, el tampón de fosfato es PBST (por ejemplo, PBST 1x). En algunos casos, la etapa de permeabilización se realiza múltiples veces (por ejemplo, 3 veces de 5 minutos cada una).

En algunos casos, los métodos de preparación de una muestra biológica para la aplicación de la sonda incluyen etapas de equilibrado y bloqueo de la muestra biológica. En algunos casos, el equilibrado se realiza usando un tampón de prehibridación (pre-Hyb). En algunos casos, el tampón pre-Hyb está libre de ARNasa. En algunos casos, el tampón pre-Hyb no contiene seroalbúmina bovina (BSA), disoluciones como la de Denhardt u otros materiales biológicos potencialmente contaminados con nucleasas.

En algunos casos, la etapa de equilibrado se realiza múltiples veces (por ejemplo, 2 veces de 5 minutos cada una; 3 veces de 5 minutos cada una). En algunos casos, la muestra biológica se bloquea con un tampón de bloqueo. En algunos casos, el tampón de bloqueo incluye un portador tal como ARNt, por ejemplo, ARNt de levadura tal como la levadura de cerveza (por ejemplo, a una concentración final de 10-20 µg/ml). En algunos casos, el bloqueo puede realizarse durante 5, 10, 15, 20, 25 o 30 minutos.

Cualquiera de las etapas anteriores puede optimizarse para mejorar el rendimiento. Por ejemplo, puede variarse la temperatura. En algunos casos, los métodos de prehibridación se realizan a temperatura ambiente. En algunos casos, los métodos de prehibridación se realizan a 4°C (en algunos casos, variando los plazos proporcionados en el presente documento).

(e) Hibridación de las sondas

En algunas realizaciones, los métodos de captura de ARN dirigido proporcionados en el presente documento incluyen la hibridación de un primer oligonucleótido sonda y un segundo oligonucleótido sonda (por ejemplo, un par de sondas). En algunos casos, cada uno de los oligonucleótidos sonda primero y segundo incluye secuencias que son sustancialmente complementarias a una o más secuencias (por ejemplo, una o más secuencias diana) de un analito de interés. En algunas realizaciones, la primera sonda y la segunda sonda se unen a secuencias complementarias que son completamente adyacentes entre sí (es decir, sin espacios de nucleótidos) o están en el mismo transcrito.

En algunos casos, los métodos incluyen la hibridación de conjuntos de sondas, en donde los pares de sondas están en un medio a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nM. En algunos casos, la concentración de los pares de sondas es de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 o 500 nM. En algunos casos, la concentración de los pares de sondas es de 5 nM. En algunos casos, los conjuntos de sondas se diluyen en un tampón de hibridación (Hyb). En algunos casos, los conjuntos de sondas tienen una concentración de 5 nM en tampón Hyb.

En algunos casos, la hibridación de la sonda se produce a aproximadamente 50°C. En algunos casos, la temperatura de hibridación de la sonda oscila entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 75°C, entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 70°C, o entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 65°C. En algunas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente 30°C, aproximadamente 31°C, aproximadamente 32°C, aproximadamente 33°C, aproximadamente 34°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 36°C, aproximadamente 37°C, aproximadamente 38°C, aproximadamente 39°C, aproximadamente 40°C, aproximadamente 41°C, aproximadamente 42°C, aproximadamente 43°C, aproximadamente 44°C, aproximadamente 45°C, aproximadamente 46°C, aproximadamente 47°C, aproximadamente 48°C, aproximadamente 49°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 51°C, aproximadamente 52°C, aproximadamente 53°C, aproximadamente 54°C, aproximadamente 55°C, aproximadamente 56°C, aproximadamente 57°C, aproximadamente 58°C, aproximadamente 59°C, aproximadamente 60°C, aproximadamente 61°C, aproximadamente 62°C, aproximadamente 63°C, aproximadamente 64°C, aproximadamente 65°C, aproximadamente 66°C, aproximadamente 67°C, aproximadamente 68°C, aproximadamente 69°C o aproximadamente 70°C. En algunos casos, la hibridación de la sonda se produce durante aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 2,5 horas, aproximadamente 3 horas o más. En algunos casos, la hibridación de la sonda se produce durante aproximadamente 2,5 horas a 50°C.

En algunos casos, el tampón de hibridación incluye SSC (por ejemplo, SSC 1x) o SSPE. En algunos casos, el tampón de hibridación incluye formamida o carbonato de etileno. En algunos casos, el tampón de hibridación incluye una o más sales, como sal de Mg, por ejemplo, MgCl₂, sal de Na por ejemplo NaCl, sal de Mn por ejemplo MnCh. En algunos casos, el tampón de hibridación incluye disolución de Denhardt, sulfato de dextrano, Ficoll, PEG u otros aceleradores de la velocidad de hibridación. En algunos casos, el tampón de hibridación incluye un portador tal como ARNt de levadura, ADN de esperma de salmón y/o ADN de fago lambda. En algunos casos, el tampón de hibridación incluye uno o más bloqueadores. En algunos casos, el tampón de hibridación incluye inhibidor(es) de ARNasa. En algunos casos, el tampón de hibridación puede incluir BSA, bloqueadores específicos de secuencia, bloqueadores no específicos, EDTA, inhibidor(es) de ARNasa, betaína, TMAC o DMSO. En algunos casos, un tampón de hibridación puede incluir además detergentes tales como Tween, Triton-X 100, sarkosyl y SDS. En algunos casos, el tampón de hibridación incluye agua libre de nucleasas, agua DPEC.

En algunas realizaciones, las secuencias complementarias a las que se unen el primer oligonucleótido sonda y el segundo oligonucleótido sonda tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 125, aproximadamente 150, aproximadamente 175, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900 o aproximadamente 1000 nucleótidos de distancia entre sí. Los espacios entre los oligonucleótidos sonda pueden llenarse primero antes de la ligación usando, por ejemplo, polimerasa Mu, ADN polimerasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa, polimerasa VENT, polimerasa Taq y/o cualquier combinación, derivado y variante (por ejemplo, mutantes obtenidos por ingeniería genética) de los mismos. En algunas realizaciones, cuando los oligonucleótidos sonda primero y segundo están separados entre sí por uno o más nucleótidos, los nucleótidos se ligan entre los oligonucleótidos sonda primero y segundo. En algunas realizaciones, cuando los oligonucleótidos sonda primero y segundo están separados entre sí por uno o más nucleótidos, los desoxirribonucleótidos se ligan entre los oligonucleótidos sonda primero y segundo.

En algunos casos, después de la hibridación, la muestra biológica se lava con un tampón de lavado posterior a la hibridación. En algunos casos, el tampón de lavado posterior a la hibridación incluye uno o más de SSC, ARNt de levadura, formamida, carbonato de etileno y agua libre de nucleasas.

Además, se proporcionan realizaciones adicionales con respecto a la hibridación de sondas.

(i) Temperaturas de hibridación

En algunas realizaciones, el método descrito utiliza oligonucleótidos que incluyen ácidos desoxirribonucleicos (en lugar de utilizar estrictamente ribonucleótidos) en el sitio de ligación. La utilización de ácidos desoxirribonucleicos en los métodos descritos en el presente documento crea una eficiencia más uniforme que puede controlarse fácilmente y ser flexible para diversas aplicaciones.

En un ejemplo no limitativo, los métodos dados a conocer en el presente documento incluyen poner en contacto una muestra biológica con una pluralidad de oligonucleótidos (por ejemplo, sondas) que incluyen un primer oligonucleótido (por ejemplo, una primera sonda) y un segundo oligonucleótido (por ejemplo, una segunda sonda), en donde el primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) y el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda) son complementarios a una primera secuencia presente en un analito y una segunda secuencia presente en el analito, respectivamente; hibridar el primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) y el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda) con el analito a una primera temperatura; hibridar el primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) y el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda) con un tercer oligonucleótido (por ejemplo,

un oligonucleótido férula) a una segunda temperatura de manera que el primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) y el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda) hagan tope entre sí; ligar el primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) con el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda) para crear un producto de ligación; poner en contacto la muestra biológica con un sustrato, en donde se inmoviliza una sonda de captura sobre el sustrato, en donde la sonda de captura incluye un código de barras espacial y un dominio de captura; permitir que el producto de ligación se una específicamente al dominio de captura; y determinar (i) la totalidad o una parte de la secuencia del producto de ligación unido específicamente al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) la totalidad o una parte de la secuencia del código de barras espacial, o un complemento del mismo, y usar la secuencia determinada de (i) y (ii) para identificar la ubicación del analito en la muestra biológica; en donde el primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda), el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda) y el tercer oligonucleótido son oligonucleótidos de ADN, y en donde la primera temperatura es una temperatura más alta que la segunda temperatura.

En la **figura 11** se muestra un ejemplo no limitativo de este método. Una muestra biológica que incluye un analito **1101** se pone en contacto con una primera sonda **1102** y una segunda sonda **1103**. La primera sonda **1102** y la segunda sonda **1103** se hibridan con el analito en una primera secuencia diana **1104** y una segunda secuencia diana **1105**, respectivamente. La primera sonda y la segunda sonda incluyen extremos libres **1107-1110**. Tal como se muestra en la **figura 11**, las secuencias diana primera y segunda no están directamente adyacentes en el analito. Después de la hibridación, las sondas primera y segunda no unidas se eliminan por lavado. Luego, un tercer oligonucleótido **1106** se hibrida con la primera y la segunda sondas en **1108** y **1109**, respectivamente. Después de la hibridación, la primera sonda se extiende **1112** y se crea un producto de ligación que incluye la primera secuencia de sonda y la segunda secuencia de sonda. Alternativamente, en lugar de extender la primera sonda, el tercer oligonucleótido se usa para "unir" la primera sonda y la segunda sonda entre sí. En tales casos, la primera sonda y la segunda sonda unidas entre sí por el tercer oligonucleótido pueden denominarse producto de ligación. El producto de ligación se pone entonces en contacto con un sustrato **1111**, y el producto de ligación se une a una sonda de captura **1113** del sustrato **1111** en la matriz en distintas posiciones espaciales. En algunas realizaciones, la muestra biológica se pone en contacto con el sustrato **1111** antes de ponerse en contacto con la primera sonda y la segunda sonda.

En algunas realizaciones, el primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) y el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda) se hibridan con un analito a una primera temperatura. En algunas realizaciones, la primera temperatura oscila entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 75°C, entre aproximadamente 55°C y aproximadamente 70°C, o entre aproximadamente 60°C y aproximadamente 65°C. En algunas realizaciones, la primera temperatura es de aproximadamente 55°C, aproximadamente 56°C, aproximadamente 57°C, aproximadamente 58°C, aproximadamente 59°C, aproximadamente 60°C, aproximadamente 61°C, aproximadamente 62°C, aproximadamente 63°C, aproximadamente 64°C, aproximadamente 65°C, aproximadamente 66°C, aproximadamente 67°C, aproximadamente 68°C, aproximadamente 69°C o aproximadamente 70°C.

En algunas realizaciones, después de la etapa de hibridar el primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) y el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda) con el analito, se realiza una etapa de lavado para retirar los oligonucleótidos no unidos (por ejemplo, las sondas). La etapa de lavado puede realizarse usando cualquiera de los métodos y disoluciones de lavado descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, después de la etapa de hibridar el primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) y el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda) con el analito, se añade un tercer oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido férula) al analito. En algunas realizaciones, el tercer oligonucleótido es un oligonucleótido. En algunas realizaciones, el tercer oligonucleótido es una oligonucleótido de ADN.

En algunas realizaciones, el tercer oligonucleótido incluye una secuencia que es complementaria en al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% a una porción del primer oligonucleótido sonda (por ejemplo, una porción de la primera sonda que no se hibrida con el analito (por ejemplo, una secuencia auxiliar)). En algunas realizaciones, el tercer oligonucleótido incluye una secuencia que es complementaria en el 100% a una porción del primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda). En algunas realizaciones, el tercer oligonucleótido incluye una secuencia que es complementaria en al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% a una porción del segundo oligonucleótido sonda (por ejemplo, una porción de la segunda sonda que no se hibrida con el analito (por ejemplo, una secuencia auxiliar)). En algunas realizaciones, el tercer oligonucleótido incluye una secuencia que es complementaria en el 100% a una porción del segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda). En algunas realizaciones, el tercer oligonucleótido se hibrida con el primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) en la porción complementaria. En algunas realizaciones, el tercer oligonucleótido se hibrida con el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda) en la porción complementaria.

En algunas realizaciones, el tercer oligonucleótido se hibrida con el primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) y con el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda) a una segunda temperatura. En algunas realizaciones, la segunda temperatura es más baja que la primera temperatura a la que los oligonucleótidos primero y segundo (por ejemplo, las sondas primera y segunda) se unen al analito. En algunas realizaciones, la segunda temperatura oscila entre

aproximadamente 15°C y aproximadamente 35°C, entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 30°C, o entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 30°C. En algunas realizaciones, la primera temperatura es de aproximadamente 15°C, aproximadamente 16°C, aproximadamente 17°C, aproximadamente 18°C, aproximadamente 19°C, aproximadamente 20°C, aproximadamente 21°C, aproximadamente 22°C, aproximadamente 23°C, aproximadamente 24°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 26°C, aproximadamente 27°C, aproximadamente 28°C, aproximadamente 29°C, aproximadamente 30°C, aproximadamente 31°C, aproximadamente 32°C, aproximadamente 33°C, aproximadamente 34°C o aproximadamente 35°C. Se han descrito métodos que incluyen un tercer oligonucleótido, o de férula, en la publicación de patente estadounidense n.º 2019/0055594A1.

En algunas realizaciones, después de la etapa de hibridar el tercer oligonucleótido con el analito, se realiza una etapa de lavado para retirar los terceros oligonucleótidos no unidos. La etapa de lavado puede realizarse usando cualquiera de los métodos y disoluciones de lavado descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, después de la etapa de lavado, los oligonucleótidos primero y segundo (por ejemplo, las sondas primera y segunda) se unen (por ejemplo, se hibridan con) el analito, y el tercer oligonucleótido se une (por ejemplo, se hibrida con) los oligonucleótidos primero y segundo (por ejemplo, en porciones de las sondas primera y segunda que no están unidas al analito).

En algunas realizaciones, el primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda), el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda) y el tercer oligonucleótido se añaden a la muestra biológica al mismo tiempo. Luego, en algunas realizaciones, la temperatura se ajusta a la primera temperatura para permitir que el primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) y el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda) se hibriden con el analito en la muestra biológica. A continuación, la temperatura se ajusta a la segunda temperatura para permitir que el tercer oligonucleótido se hibride con el primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido.

En algunas realizaciones donde un tercer oligonucleótido se hibrida con una primera sonda y una segunda sonda se hibrida con secuencias diana que no son directamente adyacentes en el analito, el tercer oligonucleótido se extiende para llenar el espacio entre la primera y la segunda sonda. En algunos casos, una polimerasa (por ejemplo, una ADN polimerasa) puede extender una de las sondas (por ejemplo, la primera sonda) antes de la ligación. Por ejemplo, tal como se muestra en la **figura 11**, la primera sonda **1102** se extiende **1112** para llenar el espacio **1114** entre la primera sonda **1102** y la segunda sonda **1103**.

En algunas realizaciones, se realiza una etapa de ligación. La ligación puede realizarse usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la etapa incluye la ligación del primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) y el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda), formando un producto de ligación. En algunas realizaciones, el tercer oligonucleótido sirve como un oligonucleótido férula para facilitar la ligación del primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) y el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda). En algunas realizaciones, la ligación es una ligación química. En algunas realizaciones, la ligación es una ligación enzimática. En algunas realizaciones, la ligasa es una ARN ligasa de T4 (Rnl2), una ligasa splintR, una ADN ligasa monocatenaria o una ADN ligasa de T4.

40 (ii) Tampón de hibridación

En algunas realizaciones, una primera sonda y una segunda sonda se hibridan con el analito en un tampón de hibridación. En algunos casos, el tampón de hibridación contiene formamida. En otros casos, el tampón de hibridación está libre de formamida. La formamida no es inocua para el ser humano y es un peligro conocido para la salud. Químicamente, puede oxidarse con el tiempo, lo que afecta la vida útil de almacenamiento del reactivo y, lo que es más importante, a la eficacia del reactivo. Como tal, los métodos descritos en el presente documento pueden incluir tampones libres de formamida, incluyendo el tampón de hibridación libre de formamida.

En algunas realizaciones, el tampón de hibridación libre de formamida es un tampón de hibridación de solución salina-citrato de sodio (SSC). En alguna realización, el SSC está presente en el tampón de hibridación de SSC desde aproximadamente SSC 1x hasta aproximadamente SSC 6x (por ejemplo, de aproximadamente SSC 1x a aproximadamente SSC 5x, de aproximadamente SSC 1x a aproximadamente SSC 4x, de aproximadamente SSC 1x a aproximadamente SSC 3x, de aproximadamente SSC 1x a aproximadamente SSC 2x, de aproximadamente SSC 2x a aproximadamente SSC 6x, de aproximadamente SSC 2x a aproximadamente SSC 5x, de aproximadamente SSC 2x a aproximadamente SSC 4x, de aproximadamente SSC 2x a aproximadamente SSC 3x, de aproximadamente SSC 3x a aproximadamente SSC 5x, de aproximadamente SSC 3x a aproximadamente SSC 4x, de aproximadamente SSC 4x a aproximadamente SSC 6x, de aproximadamente SSC 4x a aproximadamente SSC 6x, de aproximadamente SSC 5x, o de aproximadamente SSC 5x a aproximadamente SSC 6x). En algunas realizaciones, la SSC está presente en el tampón de hibridación de SSC desde aproximadamente SSC 2x hasta aproximadamente SSC 4x. En algunas realizaciones, puede usarse el tampón de hibridación de SSPE.

En algunas realizaciones, el tampón de hibridación de SSC comprende un disolvente. En algunas realizaciones, el solvente comprende carbonato de etileno en lugar de formamida (2020, Kalinka et al., *Scientia Agricola* 78(4):e20190315). En algunas realizaciones, el carbonato de etileno está presente en el tampón de hibridación de SSC desde aproximadamente el 10% (p/v) hasta aproximadamente el 25% (p/v) (por ejemplo, de aproximadamente el 10% (p/v) a aproximadamente el 20% (p/v), de aproximadamente el 10% (p/v) a aproximadamente el 15% (p/v), de aproximadamente

el 15% (p/v) a aproximadamente el 25% (p/v), de aproximadamente el 15% (p/v) a aproximadamente el 20% (p/v), o de aproximadamente el 20% (p/v) a aproximadamente el 25% (p/v)). En algunas realizaciones, el carbonato de etileno está presente en el tampón de hibridación de SSC desde aproximadamente el 15% (p/v) hasta aproximadamente el 20% (p/v). En algunas realizaciones, el carbonato de etileno está presente en el tampón de hibridación de SSC en aproximadamente el 10% (p/v), aproximadamente el 11% (p/v), aproximadamente el 12% (p/v), aproximadamente el 13% (p/v), aproximadamente el 14% (p/v), aproximadamente el 15% (p/v), aproximadamente el 16% (p/v), aproximadamente el 17% (p/v), aproximadamente el 18% (p/v), aproximadamente el 19% (p/v), aproximadamente el 20% (p/v), aproximadamente el 21% (p/v), aproximadamente el 22% (p/v), aproximadamente el 23% (p/v), aproximadamente el 24% (p/v) o aproximadamente el 25% (p/v). En algunas realizaciones, el carbonato de etileno está presente en el tampón de hibridación de SSC en aproximadamente el 13% (p/v).

En algunas realizaciones, el tampón de hibridación de SSC está a una temperatura de desde aproximadamente 40°C hasta aproximadamente 60°C (por ejemplo, de aproximadamente 40°C a aproximadamente 55°C, de aproximadamente 40°C a aproximadamente 50°C, de aproximadamente 40°C a aproximadamente 45°C, de aproximadamente 45°C a aproximadamente 60°C, de aproximadamente 45°C a aproximadamente 55°C, de aproximadamente 45°C a aproximadamente 50°C, de aproximadamente 50°C a aproximadamente 60°C, de aproximadamente 50°C a aproximadamente 55°C, o de aproximadamente 55°C a aproximadamente 60°C). En algunas realizaciones, el tampón de hibridación de SSC está a una temperatura de desde aproximadamente 45°C hasta aproximadamente 55°C, o cualquiera de los subintervalos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el tampón de hibridación de SSC está a una temperatura de desde aproximadamente 40°C, aproximadamente 41°C, aproximadamente 42°C, aproximadamente 43°C, aproximadamente 44°C, aproximadamente 45°C, aproximadamente 46°C, aproximadamente 47°C, aproximadamente 48°C, aproximadamente 49°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 51°C, aproximadamente 52°C, aproximadamente 53°C, aproximadamente 54°C, aproximadamente 55°C, aproximadamente 56°C, aproximadamente 57°C, aproximadamente 58°C, aproximadamente 59°C o aproximadamente 60°C. En algunas realizaciones, el tampón de hibridación de SSC está a una temperatura de aproximadamente 50°C.

En algunas realizaciones, el tampón de hibridación de SSC comprende además uno o más de un portador, un elemento de aglutinación o un aditivo. Los ejemplos no limitativos de un portador que puede incluirse en el tampón de hibridación incluyen: ARNt de levadura, ADN de esperma de salmón, ADN de fago lambda, glucógeno y colesterol. Los ejemplos no limitativos de un elemento de aglutinación molecular que puede incluirse en el tampón de hibridación incluyen: Ficoll, dextrano, disolución de Denhardt y PEG. Los ejemplos no limitativos de aditivos que pueden incluirse en el tampón de hibridación incluyen: bloqueadores de unión, inhibidores de ARNasa, elementos de ajuste de Tm y adyuvantes para relajar estructuras secundarias de ácidos nucleicos (por ejemplo, betaína, TMAC y DMSO). Además, un tampón de hibridación puede incluir detergentes tales como SDS, Tween, Triton-X 100 y sarkosyl (por ejemplo, sal sódica de N-lauroilsarcosina). Un experto en la materia comprenderá que un tampón para la hibridación de ácidos nucleicos puede incluir muchos compuestos diferentes que pueden potenciar la reacción de hibridación.

(f) Lavado

En algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en el presente documento también incluyen una etapa de lavado. La etapa de lavado retira las sondas no unidas. Las etapas de lavado podrían realizarse entre cualquiera de las etapas de los métodos dados a conocer en el presente documento. Por ejemplo, puede realizarse una etapa de lavado después de añadir sondas a la muestra biológica. Como tal, las sondas libres/no unidas se eliminan por lavado, dejando solo las sondas que se han hibridado con un analito. En algunos casos, se producen múltiples etapas de lavado (es decir, al menos 2, 3, 4, 5 o más) entre los métodos dados a conocer en el presente documento. Las etapas de lavado pueden realizarse en tiempos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 minutos) y temperaturas (por ejemplo, temperatura ambiente; 4°C) conocidos en la técnica y determinados por un experto en la técnica.

En algunos casos, las etapas de lavado se realizan usando un tampón de lavado. En algunos casos, el tampón de lavado incluye SSC (por ejemplo, SSC 1x). En algunos casos, el tampón de lavado incluye PBS (por ejemplo, PBS 1x). En algunos casos, el tampón de lavado incluye PBST (por ejemplo, PBST 1x). En algunos casos, el tampón de lavado también puede incluir formamida o estar libre de formamida.

En el presente documento se proporcionan realizaciones adicionales con respecto a las etapas de lavado.

(i) Tampón de lavado libre de formamida

En algunas realizaciones, después de ligar una primera sonda y una segunda sonda, se retiran de la matriz la una o más primeras sondas sin hibridar, la una o más segundas sondas sin hibridar, o ambas. En algunas realizaciones, después de ligar una primera sonda, una o más sondas de extensión y una segunda sonda, se retiran de la matriz la una o más sondas primera, segunda y/o de extensión sin hibridar. En algunas realizaciones, después de ligar una primera sonda, una segunda sonda y un tercer oligonucleótido, se retiran de la matriz la una o más primeras sondas sin hibridar, una o más segundas sondas sin hibridar, o uno o más terceros oligonucleótidos, o todos los anteriores.

En algunas realizaciones, se usa un tampón de prehibridación para lavar la muestra. En algunas realizaciones, se usa un tampón fosfato. En algunas realizaciones, se realizan múltiples etapas de lavado para retirar los oligonucleótidos no unidos.

En algunas realizaciones, la retirada incluye lavar una o más sondas sin hibridar (por ejemplo, una primera sonda, una segunda sonda, una sonda de extensión, sondas de extensión adicionales y un tercer oligonucleótido) de la matriz en un tampón de lavado libre de formamida.

5 En algunas realizaciones, el tampón de lavado libre de formamida es un tampón de lavado de SSC. En algunas realizaciones, el SSC está presente en el tampón de lavado de SSC desde aproximadamente SSC 0,01x hasta aproximadamente SSC 1x (por ejemplo, de aproximadamente SSC 0,01x a aproximadamente SSC 0,5x, de SSC 0,01x a aproximadamente SSC 0,1x, de aproximadamente SSC 0,01x a aproximadamente SSC 0,05x, de aproximadamente SSC 0,05x a aproximadamente SSC 1x, de aproximadamente SSC 0,05x a aproximadamente SSC 0,5x, de aproximadamente SSC 0,05x a aproximadamente SSC 0,1x, de aproximadamente SSC 0,1x a aproximadamente SSC 1x, de aproximadamente SSC 0,1x a aproximadamente SSC 0,5x o de aproximadamente SSC 0,5x a aproximadamente SSC 1x). En algunas realizaciones, el SSC está presente en el tampón de lavado de SSC en aproximadamente SSC 0,01x, aproximadamente SSC 0,02x, aproximadamente SSC 0,03x, aproximadamente SSC 0,04x, aproximadamente SSC 0,05x, aproximadamente SSC 0,06x, aproximadamente SSC 0,07x, aproximadamente SSC 0,08x, aproximadamente SSC 0,09x, aproximadamente SSC 0,1x, aproximadamente SSC 0,2x, aproximadamente SSC 0,3x, aproximadamente SSC 0,4x, aproximadamente SSC 0,5x, aproximadamente SSC 0,6x, aproximadamente SSC 0,7x, aproximadamente SSC 0,8x, aproximadamente SSC 0,9x o aproximadamente SSC 0,1x. En algunas realizaciones, el SSC está presente en el tampón de lavado de SSC a aproximadamente el SSC 0,1x.

20 En algunas realizaciones, el tampón de lavado de SSC comprende un detergente. En algunas realizaciones, el detergente comprende dodecilsulfato de sodio (SDS). En algunas realizaciones, el SDS está presente en el tampón de lavado de SSC desde aproximadamente el 0,01% (v/v) hasta aproximadamente el 0,5% (v/v) (por ejemplo, de aproximadamente el 0,01% (v/v) a aproximadamente el 0,4% (v/v), de aproximadamente el 0,01% (v/v) a aproximadamente el 0,3% (v/v), de aproximadamente el 0,01% (v/v) a aproximadamente el 0,2% (v/v), de aproximadamente el 0,01% (v/v) a aproximadamente el 0,1% (v/v), de aproximadamente el 0,05% (v/v) a aproximadamente el 0,5% (v/v), de aproximadamente el 0,05% (v/v) a aproximadamente el 0,4% (v/v), de aproximadamente el 0,05% (v/v) a aproximadamente el 0,3% (v/v), de aproximadamente el 0,05% (v/v) a aproximadamente el 0,2% (v/v), de aproximadamente el 0,05% (v/v) a aproximadamente el 0,1% (v/v), de aproximadamente el 0,1% (v/v) a aproximadamente el 0,5% (v/v), de aproximadamente el 0,1% (v/v) a aproximadamente el 0,4% (v/v), de aproximadamente el 0,1% (v/v) a aproximadamente el 0,3% (v/v), de aproximadamente el 0,1% (v/v) a aproximadamente el 0,2% (v/v), de aproximadamente el 0,2% (v/v) a aproximadamente el 0,5% (v/v), de aproximadamente el 0,2% (v/v) a aproximadamente el 0,4% (v/v), de aproximadamente el 0,2% (v/v) a aproximadamente el 0,3% (v/v), de aproximadamente el 0,3% (v/v) a aproximadamente el 0,5% (v/v), de aproximadamente el 0,3% (v/v) a aproximadamente el 0,4% (v/v) o de aproximadamente el 0,4% (v/v) a aproximadamente el 0,5% (v/v)). En algunas realizaciones, el SDS está presente en el tampón de lavado de SSC en aproximadamente el 0,01% (v/v), aproximadamente el 0,02% (v/v), aproximadamente el 0,03% (v/v), aproximadamente el 0,04% (v/v), aproximadamente el 0,05% (v/v), aproximadamente el 0,06% (v/v), aproximadamente el 0,07% (v/v), aproximadamente el 0,08% (v/v), aproximadamente el 0,09% (v/v), aproximadamente el 0,10% (v/v), aproximadamente el 0,2% (v/v), aproximadamente el 0,3% (v/v), aproximadamente el 0,4% (v/v) o aproximadamente el 0,1% (v/v). En algunas realizaciones, puede estar presente sarkosyl en el tampón de lavado de SSC.

45 En algunas realizaciones, el tampón de lavado de SSC comprende un disolvente. En algunas realizaciones, el disolvente comprende carbonato de etileno. En algunas realizaciones, el carbonato de etileno está presente en el tampón de lavado de SSC desde aproximadamente el 10% (p/v) hasta aproximadamente el 25% (p/v), o cualquiera de los subintervalos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el carbonato de etileno está presente en el tampón de lavado de SSC desde aproximadamente el 15% (p/v) hasta aproximadamente el 20% (p/v). En algunas realizaciones, el carbonato de etileno está presente en el tampón de lavado de SSC en aproximadamente el 16% (p/v).

50 En algunas realizaciones, el tampón de lavado de SSC está a una temperatura de desde aproximadamente 50°C hasta aproximadamente 70°C (por ejemplo, de aproximadamente 50°C a aproximadamente 65°C, de aproximadamente 50°C a aproximadamente 60°C, de aproximadamente 50°C a aproximadamente 55°C, de aproximadamente 55°C a aproximadamente 70°C, de aproximadamente 55°C a aproximadamente 65°C, de aproximadamente 55°C a aproximadamente 60°C, de aproximadamente 60°C a aproximadamente 70°C, de aproximadamente 60°C a aproximadamente 65°C o de aproximadamente 65°C a aproximadamente 70°C). En algunas realizaciones, el tampón de lavado de SSC está a una temperatura de desde aproximadamente 55°C hasta aproximadamente 65°C. En algunas realizaciones, el tampón de lavado de SSC está a una temperatura de aproximadamente 50°C, aproximadamente 51°C, aproximadamente 52°C, aproximadamente 53°C, aproximadamente 54°C, aproximadamente 55°C, aproximadamente 56°C, aproximadamente 57°C, aproximadamente 58°C, aproximadamente 59°C, aproximadamente 60°C, aproximadamente 61°C, aproximadamente 62°C, aproximadamente 63°C, aproximadamente 64°C, aproximadamente 65°C, aproximadamente 66°C, aproximadamente 67°C, aproximadamente 68°C, aproximadamente 69°C o aproximadamente 70°C. En algunas realizaciones, el tampón de lavado de SSC está a una temperatura desde aproximadamente 60°C.

65 En algunas realizaciones, el método incluye la liberación del producto de ligación, donde la liberación se realiza después de lavar la matriz para retirar una o más sondas primera y segunda sin hibridar.

(G) Ligación

5 En algunas realizaciones, después de la hibridación de los oligonucleótidos sonda (por ejemplo, una primera sonda, una segunda sonda, una sonda de extensión, sondas de extensión adicionales y/o un tercer oligonucleótido) con el analito, la sonda (por ejemplo, una primera sonda, una segunda sonda, una sonda de extensión, sondas de extensión adicionales y/o un tercer oligonucleótido) pueden ligarse entre sí, creando un solo producto de ligación que incluye una o más secuencias que son complementarias al analito. La ligación puede realizarse enzimática o químicamente, tal como se describe en el presente documento.

10 En algunos casos, la ligación es una reacción de ligación enzimática, usando una ligasa (por ejemplo, ARN ligasa de T4 (Rnl2), una ligasa SplintR, una ADN ligasa monocatenaria o una ADN ligasa de T4). Véase, por ejemplo, Zhang et al.; RNA Biol. 2017; 14(1): 36-44 para una descripción de KOD ligasa. Después de la reacción de ligación enzimática, las sondas (por ejemplo, una primera sonda, una segunda sonda, una sonda de extensión, sondas de extensión adicionales y/o un tercer oligonucleótido) pueden considerarse ligadas.

15 En algunas realizaciones, una polimerasa cataliza la síntesis de una cadena complementaria del producto de ligación, creando un producto de ligación bicatenario. En algunos casos, las polimerasa es ADN polimerasa. En algunas realizaciones, la polimerasa tiene actividad polimerasa de 5' a 3'. En algunas realizaciones, la polimerasa tiene actividad exonucleasa de 3' a 5'. En algunas realizaciones, la polimerasa tiene actividad de polimerasa de 5' a 3' y actividad de exonucleasa de 3' a 5' para corrección de pruebas.

20 En algunas realizaciones, la sonda (por ejemplo, una primera sonda, una segunda sonda, una sonda de extensión, sondas de extensión adicionales y/o un tercer oligonucleótido) puede comprender cada una un resto reactivo tal que, tras la hibridación con la diana y la exposición a condiciones de ligación apropiadas, los oligonucleótidos sonda pueden ligarse entre sí. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos sonda que incluyen un resto reactivo se ligan químicamente. Por ejemplo, una primera sonda capaz de hibridar con una primera región diana (por ejemplo, una primera secuencia diana o una primera porción) de una molécula de ácido nucleico puede comprender un primer resto reactivo y un segundo oligonucleótido sonda capaz de hibridar con una segunda diana (por ejemplo, una segunda secuencia diana o una segunda porción) de la molécula de ácido nucleico puede comprender un segundo resto reactivo. Cuando las sondas primera y segunda se hibridan con las regiones diana primera y segunda (por ejemplo, secuencias diana primera y segunda) de la molécula de ácido nucleico, los restos reactivos primero y segundo pueden ser adyacentes entre sí. Un resto reactivo de una sonda puede seleccionarse del grupo no limitativo que consiste en azidas, alquinos, nitronas (por ejemplo, 1,3-nitronas), alquenos sometidos a deformación (por ejemplo, trans-cicloalquenos tales como ciclooctenos u oxanorbornadieno), tetrazinas, tetrazoles, yoduros, tioatos (por ejemplo, fosforotioato), ácidos, aminas y fosfatos. Por ejemplo, el primer resto reactivo de una primera sonda puede comprender un resto azida y un segundo resto reactivo de una segunda sonda puede comprender un resto alquino. Los restos reactivos primero y segundo pueden reaccionar para formar un resto de unión. Una reacción entre los restos reactivos primero y segundo puede ser, por ejemplo, una reacción de cicloadición tal como una cicloadición de azida-alquino promovida por deformación, una cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre, una cicloadición de alquino-nitrona promovida por deformación, una reacción de Diels-Alder, una cicloadición [3+2], una cicloadición [4+2] o una cicloadición [4+1]; una reacción de tior-eno; una reacción de sustitución nucleófila; u otra reacción. En algunos casos, la reacción entre los restos reactivos primero y segundo puede producir un resto triazol o un resto isoxazolina. Una reacción entre los restos reactivos primero y segundo puede implicar someter los restos reactivos a condiciones adecuadas tales como una temperatura, un pH o una presión adecuados y proporcionar uno o más reactivos o catalizadores para la reacción. Por ejemplo, una reacción entre los restos reactivos primero y segundo puede catalizarse por un catalizador de cobre, un catalizador de rutenio o una especie sometida a deformación tal como difluorooctino, dibencilciclooctino o biarilazaciclooctinona. La reacción entre un primer resto reactivo de una primera sonda hibridada con una primera región diana (por ejemplo, una primera secuencia diana o primera porción) de la molécula de ácido nucleico y un segundo resto reactivo de un tercer oligonucleótido sonda hibridado con una segunda región diana (por ejemplo, una primera secuencia diana o una primera porción) de la molécula de ácido nucleico puede unir la primera sonda y la segunda sonda para proporcionar una sonda ligada. Tras la unión, las sondas primera y segunda pueden considerarse ligadas. Por consiguiente, la reacción de los restos reactivos primero y segundo puede comprender una reacción de ligación química tal como una reacción química de "clic" de azida en 5' con alquino en 3' alquino catalizada por cobre para formar un enlace triazol entre dos oligonucleótidos sonda. En otros ejemplos no limitativos, un resto de yoduro puede ligarse químicamente a un resto de fosforotioato para formar un enlace fosforotioato, un ácido puede ligarse a una amina para formar un enlace amida y/o un fosfato y una amina pueden ligarse para formar un enlace fosforamido.

55 **Las figuras 12A-12E** ilustran ejemplos de reacciones representativas. **La figura 12A** muestra una reacción de ligación química de un resto alquino **1202** y un resto azida **1204** que reaccionan bajo cicloadición mediada por cobre para formar un enlace triazol **1206**. **La figura 12B** muestra una reacción de ligación química de un grupo fosforotioato **1208** con un grupo yoduro **1210** para formar un enlace fosforotioato **1212**. **La figura 12C** muestra una reacción de ligación química de un ácido **1214** y una amina **1216** para formar un enlace amida **1218**. **La figura 12D** muestra una reacción de ligación química de un resto de fosfato **1220** y un resto de amina **1222** para formar un enlace fosforamido **1224**. **La figura 12E** muestra una reacción de conjugación de dos especies **1226** y **1228**.

65 En algunos casos, la ligación se realiza en un tampón de ligación. En los casos en los que la ligación de la sonda se realiza en sondas que contienen dirribonucleótidos, el tampón de ligación puede incluir tampón 2 de ARN ligasa de T4,

enzima (por ejemplo, ligasa RNL2) y agua libre de nucleasas. En los casos en que la ligación de la sonda se realiza en sondas de ADN, el tampón de ligación puede incluir Tris-HCl pH 7,5, MnCl₂, ATP, DTT, fluido sustituto (por ejemplo, glicerol), enzima (por ejemplo, ligasa SplintR) y agua libre de nucleasas.

5 En algunas realizaciones, el tampón de ligación incluye reactivos adicionales. En algunos casos, el tampón de ligación incluye trifosfato de adenosina (ATP) que se añade durante la reacción de ligación. El sellado catalizado por ADN ligasa de sustratos de ADN con mella se activa primero a través de la hidrólisis de ATP, lo que da como resultado la adición covalente de un grupo de AMP a la enzima. Después de unirse a un sitio con mella en un dúplex de ADN, la ligasa transfiere el AMP al extremo 5' fosforilado en la mella, formando un enlace pirofosfato 5'-5'. Finalmente, la ligasa cataliza un ataque a este enlace pirofosfato por parte del grupo OH en el extremo 3' de la mella, sellándolo de ese modo, después de lo cual se liberan la ligasa y el AMP. Si la ligasa se separa del sustrato antes del ataque en 3', por ejemplo debido a la recarga prematura de AMP de la enzima, entonces el AMP en 5' se deja en el extremo 5', bloqueando intentos de ligación adicionales. En algunos casos, se añade ATP a una concentración de aproximadamente 1 μM, aproximadamente 10 μM, aproximadamente 100 μM, aproximadamente 1000 μM o aproximadamente 10000 μM durante la reacción de ligación.

15 En algunas realizaciones, los cofactores que ayudan en la unión de los oligonucleótidos sonda se añaden durante el proceso de ligación. En algunos casos, los cofactores incluyen iones de magnesio (Mg²⁺). En algunos casos, los cofactores incluyen iones de manganeso (Mn²⁺). En algunos casos, Mg²⁺ se añade en forma de MgCl₂. En algunos casos, Mn²⁺ se añade en forma de MnCl₂. En algunos casos, la concentración de MgCl₂ es de aproximadamente 1 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 100 mM o aproximadamente 1000 mM. En algunos casos, la concentración de MnCl₂ es de aproximadamente 1 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 100 mM o aproximadamente 1000 mM.

25 En algunas realizaciones, el producto de la ligación incluye un dominio de captura de sonda de captura, que puede unirse a una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura inmovilizada, directa o indirectamente, sobre un sustrato). En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen poner en contacto una muestra biológica con un sustrato, en donde la sonda de captura se fija al sustrato (por ejemplo, se inmoviliza al sustrato, directa o indirectamente). En algunas realizaciones, el dominio de captura de la sonda de captura de la sonda ligada se une específicamente al dominio de captura.

30 Después de la ligación, en algunos casos, la muestra biológica se lava con un tampón de lavado posterior a la ligación. En algunos casos, el tampón de lavado posterior a la ligación incluye uno o más de SSC (por ejemplo, SSC 1x), carbonato de etileno o formamida y agua libre de nucleasas. En algunos casos, la muestra biológica se lava en esta fase a de aproximadamente 50°C a aproximadamente 70°C. En algunos casos, la muestra biológica se lava a aproximadamente 60°C.

35 **(i) Ligación que incluye fosfato en 5' preadenilado en la segunda sonda**

En el presente documento se proporcionan métodos para determinar la ubicación de un ácido nucleico diana en una muestra biológica que incluyen: (a) poner en contacto la muestra biológica con un sustrato que comprende una pluralidad de sondas de captura, donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un dominio de 40 captura y un código de barras espacial; (b) hibridar un ácido nucleico diana en la muestra biológica con una primera sonda y una segunda sonda, donde la primera sonda comprende, de 3' a 5', una secuencia sustancialmente complementaria al dominio de captura y una secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia en el ácido nucleico diana y tiene un grupo fosfato preadenilado en su extremo 5'; la segunda sonda comprende una secuencia sustancialmente complementaria a una segunda secuencia en el ácido nucleico diana; (c) generar un producto de ligación ligando un extremo 3' de la segunda sonda al extremo 5' de la primera sonda usando una ligasa que no requiere trifosfato de adenosina para la actividad ligasa; (d) liberar el producto de ligación del ácido nucleico diana y unir el dominio de 45 captura del producto de ligación específicamente al dominio de captura de sonda de captura; y (e) determinar (i) la totalidad o una parte de una secuencia correspondiente al producto de ligación, o un complemento del mismo, y (ii) la totalidad o una parte de una secuencia correspondiente al código de barras espacial, o un complemento del mismo, y usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para identificar la ubicación del ácido nucleico diana en la muestra biológica.

En algunos casos, la ligasa que no requiere trifosfato de adenosina para la actividad ligasa (por ejemplo, 5' AppADN/ARN ligasa termoestable, ARN ligasa 2 de T4 truncada (trRnl2), ARN ligasa 2 K227Q de T4 truncada, ARN ligasa 2 KQ de T4 truncada, ADN ligasa del virus Chlorella PBCV-1, y combinaciones de las mismas). Véase, por ejemplo, Nichols et al., "RNA Ligases", Curr. Protocol. Molec. Biol. 84(1):3.15.1-4 (2008); Viollet et al., "T4 RNA Ligase 2 Truncated Active Site Mutants: Improved Tools for RNA Analysis", BMC Biotechnol. 11: 72 (2011); y Ho et al., "Bacteriophage T4 RNA Ligase 2 (gp24.1) Exemplifies a Family of RNA Ligases Found in All Phylogenetic Domains", PNAS 99(20):12709-14 (2002) para una descripción de ARN ligasas de T4 y ARN ligasas de T4 truncadas. La 5' AppADN/RNA ligasa termoestable es una 60 enzima perteneciente a la familia de las ligasas que cataliza la ligación del extremo 3' del ARNmc o ADNmc a un ADNmc adenilado en 5' o un ARNmc adenilado en 5'. La ARN ligasa 2 truncada de T4 es una enzima perteneciente a la familia de las ligasas que cataliza la unión de mellas de ARNbc y ARNmc con ARNmc. También puede ligar el extremo 3' del ARN o el ADN con un ADNp en 5' cuando se hibrida con un complemento de ARN, y el extremo 3' del ARN con un ARNp en 5' cuando se hibrida con un complemento de ADN, con eficiencia reducida. La ARN ligasa 2 K227Q de T4 truncada es una enzima perteneciente a la familia de las ligasas que cataliza la ligación del extremo 3' del ARNmc a un ADNmc adenilado en 5' y ARNmc adenilado en 5'. Tiene una reducción de productos secundarios en comparación con la ARN 65

ligasa 2 de T4 truncada. La ARN ligasa 2 KQ de T4 truncada es una enzima perteneciente a la familia de las ligasas que cataliza la ligación del extremo 3' del ARNmc a un ADNmc adenilado en 5' y ARNmc adenilado en 5'. Es una opción preferida para la ligación de ARNmc a adaptadores preadenilados y tiene una reducción de productos secundarios en comparación con la ARN ligasa 2 de T4 truncada.

5

En algunas realizaciones, la ARN ligasa de T4 comprende una mutación K227Q. Véase Viollet et al., "T4 RNA Ligase 2 Truncated Active Site Mutants: Improved Tools for RNA Analysis", BMC Biotechnol. 11.

10

En algunos casos, los cofactores que ayudan en la ligación de las sondas primera y segunda se añaden durante la ligación. En algunos casos, los cofactores incluyen iones de magnesio (Mg^{2+}). En algunos casos, los cofactores incluyen iones de manganeso (Mn^{2+}). En algunos casos, Mg^{2+} se añade en forma de $MgCl_2$. En algunos casos, Mn^{2+} se añade en forma de $MnCl_2$. En algunos casos, la concentración de MgCh es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM. En algunos casos, la concentración de MnCh es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM.

15

En algunos casos, la ligación se produce a un pH en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,0, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,0 o de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,0.

20

En algunas realizaciones, el tampón de ligación incluye un tampón de almacenamiento de enzimas. En algunas realizaciones, el tampón de almacenamiento de enzimas incluye glicerol. En algunas realizaciones, el tampón de ligación se complementa con glicerol. En algunas realizaciones, el glicerol está presente en el tampón de ligación en un volumen total del 15% v/v.

(h) Permeabilización y liberación del producto de ligación

25

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen una etapa de permeabilización. En algunas realizaciones, la permeabilización se produce usando una proteasa. En algunas realizaciones, la proteasa es una endopeptidasa. Las endopeptidasas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, tripsina, quimotripsina, elastasa, termolisina, pepsina, clostripán, glutamil endopeptidasa (GluC), ArgC, peptidil-asp endopeptidasa (ApsN), endopeptidasa LysC y endopeptidasa LysN. En algunas realizaciones, la endopeptidasa es pepsina. En algunas realizaciones, después de crear un producto de ligación (por ejemplo, ligando una primera sonda y una segunda sonda que se hibridan con secuencias adyacentes en el analito), la muestra biológica se permeabiliza. En algunas realizaciones, la muestra biológica se permeabiliza al mismo tiempo o antes de poner en contacto la muestra biológica con una primera sonda y una segunda sonda, hibridando la primera y la segunda sonda con el analito, generando un producto de ligación al ligar la primera y la segunda sonda, y liberando el producto ligado del analito.

35

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen la permeabilización de la muestra biológica de manera que la sonda de captura pueda unirse más fácilmente a la sonda ligada capturada (es decir, en comparación con ausencia de permeabilización). En algunas realizaciones, pueden añadirse reactivos de transcripción inversa (RT) a muestras biológicas permeabilizadas. La incubación con los reactivos de RT puede producir ADNc de longitud completa con código de barras espacial a partir de los analitos capturados (por ejemplo, ARNm poliadenilado). Pueden añadirse reactivos de segunda cadena (por ejemplo, enzimas, cebadores de segunda cadena) a la muestra biológica en el portaobjetos para iniciar la síntesis de la segunda cadena.

40

45

En algunos casos, la etapa de permeabilización incluye la aplicación de un tampón de permeabilización a la muestra biológica. En algunos casos, el tampón de permeabilización incluye un tampón (por ejemplo, Tris pH 7,5), $MgCl_2$, detergente sarkosyl (por ejemplo, lauroil-sarcosinato de sodio), enzima (por ejemplo, proteinasa K y agua libre de nucleasas. En algunos casos, la etapa de permeabilización es se realiza a 37°C. En algunos casos, la etapa de permeabilización se realiza durante de aproximadamente 20 minutos a 2 horas (por ejemplo, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1,5 horas o aproximadamente 2 horas). En algunos casos, la etapa de liberación se realiza durante aproximadamente 40 minutos.

50

55

En algunas realizaciones, después de generar un producto de ligación, el producto de ligación se libera del analito. En algunas realizaciones, se libera un producto de ligación del analito usando una endorribonucleasa. En algunas realizaciones, la endorribonucleasa es ARNasa H, ARNasa A, ARNasa C o ARNasa I. En algunas realizaciones, la endorribonucleasa es ARNasa H. La ARNasa H es una endorribonucleasa que hidroliza específicamente los enlaces fosfodiéster del ARN, cuando se hibrida con ADN. La ARNasa H es parte de una familia conservada de ribonucleasas que están presentes en muchos organismos diferentes. Hay dos clases principales de ARNasa H: ARNasa H1 y ARNasa H2. Las enzimas ARNasa H retrovirales son similares a las ARNasa H1 procariotas. Todas estas enzimas comparten la característica de que pueden escindir el componente de ARN de un heterodúplex ARN:ADN. En algunas realizaciones, la ARNasa H es ARNasa H1, ARNasa H2 o ARNasa H1 o ARNasa H2. En algunas realizaciones, la ARNasa H incluye pero no se limita a la ARNasa HII de *Pyrococcus furiosus*, ARNasa HII de *Pyrococcus horikoshi*, ARNasa HI de *Thermococcus litoralis*, ARNasa HI de *Thermus thermophilus*, ARNasa HI de *E. coli*, o ARNasa HII de *E. coli*.

60

65

En algunos casos, la etapa de liberación se realiza usando un tampón de liberación. En algunos casos, el tampón de liberación incluye uno o más de un tampón (por ejemplo, Tris pH 7,5), enzima (por ejemplo, ARNasa H) y agua libre de

5 nucleasas. En algunos casos, la etapa de liberación se realiza a 37°C. En algunos casos, la etapa de liberación se realiza durante de aproximadamente 20 minutos a 2 horas (por ejemplo, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1,5 horas o aproximadamente 2 horas). En algunos casos, la etapa de liberación se realiza durante aproximadamente 30 minutos.

En algunos casos, la etapa de liberación se produce antes de la etapa de permeabilización. En algunos casos, la etapa de liberación se produce después de la etapa de permeabilización. En algunos casos, la etapa de liberación se produce al mismo tiempo que la etapa de permeabilización (por ejemplo, en el mismo tampón).

10 (i) Sondas de bloqueo

En algunas realizaciones, un dominio de captura de sonda de captura se bloquea antes de añadir un segundo oligonucleótido sonda a una muestra biológica. Esto impide que el dominio de captura de sonda de captura se hibride prematuramente con el dominio de captura.

En algunas realizaciones, se usa una sonda de bloqueo para bloquear o modificar el extremo 3' libre del dominio de captura de sonda de captura. En algunas realizaciones, una sonda de bloqueo puede hibridarse con el dominio de captura de sonda de captura de la segunda sonda para enmascarar el extremo 3' libre del dominio de captura de sonda de captura. En algunas realizaciones, una sonda de bloqueo puede ser una sonda en horquilla o una sonda parcialmente bicatenaria. En algunas realizaciones, el extremo 3' libre del dominio de captura de sonda de captura de la segunda sonda puede bloquearse mediante modificación química, por ejemplo, adición de un grupo azidometilo como resto de protección químicamente reversible, de manera que las sondas de captura no incluyen un extremo 3' libre. Bloquear o modificar el dominio de captura de sonda de captura, particularmente en el extremo 3' libre del dominio de captura de sonda de captura, antes de poner en contacto la segunda sonda con el sustrato, impide la hibridación de la segunda sonda con el dominio de captura (por ejemplo, impide la captura de un poli(A) de un dominio de captura de sonda de captura a un dominio de captura de poli(T)). En algunas realizaciones, una sonda de bloqueo puede denominarse un resto de bloqueo del dominio de captura de sonda de captura.

En algunas realizaciones, las sondas de bloqueo pueden retirarse de manera reversible. Por ejemplo, pueden aplicarse sondas de bloqueo para bloquear el extremo 3' libre del dominio de captura de sonda de captura y/o de las sondas de captura o de ambos. El bloqueo de la interacción entre el dominio de captura de sonda de captura y la sonda de captura en el sustrato puede reducir la captura no específica a las sondas de captura. Después de que la segunda sonda se hibrida con el analito y se liga a una primera sonda, una o más sondas de extensión o un tercer oligonucleótido, las sondas de bloqueo pueden retirarse del extremo 3' del dominio de captura de sonda de captura y/o de la sonda de captura, y el producto de ligación puede migrar y unirse a las sondas de captura en el sustrato. En algunas realizaciones, la retirada incluye la desnaturalización de la sonda de bloqueo del dominio de captura de sonda de captura y/o la sonda de captura. En algunas realizaciones, la retirada incluye retirar un resto de protección químicamente reversible. En algunas realizaciones, la retirada incluye digerir la sonda de bloqueo con una ARNasa (por ejemplo, ARNasa H).

En algunas realizaciones, las sondas de bloqueo son sondas de bloqueo de oligo (dT). En algunas realizaciones, las sondas de bloqueo de oligo (dT) pueden tener una longitud de 15-30 nucleótidos. En algunas realizaciones, las sondas de bloqueo de oligo (dT) pueden tener una longitud de 10-50 nucleótidos, por ejemplo, 10-50, 10-45, 10-40, 10-35, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-50, 15-45, 15-40, 15-35, 15-30, 15-25, 15-20, 20-50, 20-45, 20-40, 20-35, 20-30, 20-25, 25-50, 25-45, 25-40, 25-35, 25-30, 30-50, 30-45, 30-40, 30-35, 35-50, 35-45, 35-40, 40-50, 40-45 o 45-50 nucleótidos. En algunas realizaciones, los agentes de captura de analito pueden bloquearse a diferentes temperaturas (por ejemplo, 4°C y 37°C).

(j) Muestras biológicas

50 Los métodos dados a conocer en el presente documento pueden realizarse en cualquier tipo de muestra. En algunas realizaciones, la muestra es un tejido fresco. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra congelada. En algunas realizaciones, la muestra biológica se congeló previamente. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra fijada en formalina e incluida en parafina (FFPE).

55 Los sujetos de los que pueden obtenerse muestras biológicas pueden ser personas sanas o asintomáticas, personas que tienen o se sospecha que tienen una enfermedad (por ejemplo, cáncer) o una predisposición a una enfermedad y/o personas que necesitan terapia o se sospecha que necesitan terapia. En algunos casos, la muestra biológica puede incluir una o más células enfermas. Una célula enferma puede tener propiedades metabólicas, expresión génica, expresión de proteínas y/o características morfológicas alteradas. Los ejemplos de enfermedades incluyen trastornos inflamatorios, trastornos metabólicos, trastornos del sistema nervioso y cáncer. En algunos casos, la muestra biológica incluye células cancerosas o tumorales. Las células cancerosas pueden derivarse de tumores sólidos, neoplasias malignas hematológicas, líneas celulares, o pueden obtenerse como células tumorales circulantes. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra heterogénea. En algunos casos, la muestra biológica es una muestra heterogénea que incluye células tumorales o cancerosas y/o células del estroma.

65

En algunos casos, el cáncer es cáncer de mama. En algunos casos, el cáncer de mama es cáncer de mama triple positivo (TPBC). En algunos casos, el cáncer de mama es cáncer de mama triple negativo (TNBC).

5 En algunos casos, el cáncer es cáncer colorrectal. En algunos casos, el cáncer es cáncer de ovario. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin o no Hodgkin, cáncer de páncreas, glioblastoma, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, mieloma, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, carcinoma de células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer de esófago o un tipo de cáncer de cabeza o cuello. En determinadas realizaciones, el cáncer tratado es melanoma desmoplásico, cáncer de mama inflamatorio, timoma, cáncer rectal, cáncer anal o glioma de tronco encefálico que puede tratarse quirúrgicamente o que no puede tratarse quirúrgicamente. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

15 Las muestras FFPE generalmente están muy entrecruzadas y fragmentadas y, por tanto, este tipo de muestra permite una recuperación limitada de ARN usando técnicas de detección convencionales. En determinadas realizaciones, los métodos de captura de ARN dirigido proporcionados en el presente documento se ven menos afectados por la degradación del ARN asociada con la fijación de FFPE que otros métodos (por ejemplo, métodos que aprovechan la captura de oligo-dT y la transcripción inversa de ARNm). En determinadas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento permiten la medición sensible de genes específicos de interés que de otro modo podrían pasarse por alto con un enfoque transcriptómico completo.

25 En algunos casos, las muestras FFPE se tiñen (por ejemplo, usado H&E). Los métodos dados a conocer en el presente documento son compatibles con H&E y permitirán un contexto morfológico superpuesto con análisis transcriptómico. Sin embargo, dependiendo de la necesidad, algunas muestras pueden teñirse solo con un colorante nuclear, tal comola tinción de una muestra solo con hematoxilina y no con eosina, cuando se necesita la ubicación de un núcleo celular.

30 En algunas realizaciones, una muestra biológica (por ejemplo, una sección de tejido) puede fijarse con metanol, teñirse con hematoxilina y eosina y obtenerse imágenes. En algunas realizaciones, la fijación, la tinción y la obtención de imágenes se producen antes de que una o más sondas se hibriden con la muestra. Algunas realizaciones de cualquiera de los flujos de trabajo descritos en el presente documento pueden incluir además una etapa de retirada de la tinción (por ejemplo, una etapa de retirada de la tinción con hematoxilina y eosina), después de obtener imágenes de la muestra y antes de permeabilizar la muestra. Por ejemplo, la retirada de la tinción puede realizarse realizando uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o cinco) etapas de lavado (por ejemplo, uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o cinco) etapas de lavado realizadas usando un tampón que incluye HCl). Las imágenes pueden usarse para mapear patrones de expresión génica espacial en la muestra biológica. Puede usarse una enzima de permeabilización para permeabilizar la muestra biológica directamente en el portaobjetos.

40 En algunas realizaciones, la muestra FFPE se desparafina, permeabiliza, equilibra y bloquea antes de que se añadan los oligonucleótidos sonda diana. En algunas realizaciones, se desparafina usando xilenos. En algunas realizaciones, la desparafinación incluye múltiples lavados con xilenos. En algunas realizaciones, la desparafinación incluye múltiples lavados con xilenos seguido por la retirada de los xilenos usando múltiples rondas de alcohol graduado seguido por lavado de la muestra con agua. En algunos aspectos, el agua es agua desionizada. En algunas realizaciones, el equilibrado y el bloqueo incluyen incubar la muestra en un tampón pre-Hyb. En algunas realizaciones, el tampón pre-Hyb incluye ARNt de levadura. En algunas realizaciones, permeabilizar una muestra incluye lavar la muestra con un tampón de fosfato. En algunas realizaciones, el tampón es PBS. En algunas realizaciones, el tampón es PBST.

(k) Determinación de la secuencia del producto de ligación

50 Después de que un producto de ligación de la muestra haya hibridado o se haya asociado con una sonda de captura según cualquiera de los métodos descritos anteriormente en relación con la metodología analítica espacial general basada en células, se analizan los constructos con código de barras que resultan de la hibridación/asociación.

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

60 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos para detectar espacialmente un analito (por ejemplo, detectar la ubicación de un analito, por ejemplo, un analito biológico) de una muestra biológica (por ejemplo, presente en una muestra biológica), comprendiendo el método: (a) opcionalmente teñir y/o obtener imágenes de una muestra biológica sobre un sustrato; (b) permeabilizar (por ejemplo, proporcionar una disolución que comprende un reactivo de permeabilización a) la muestra biológica sobre el sustrato; (c) poner en contacto la muestra biológica con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad captura el

analito biológico; y (d) analizar el analito biológico capturado, detectando así espacialmente el analito biológico; en donde la muestra biológica se retira total o parcialmente del sustrato.

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

20 En algunas realizaciones, al menos una porción de la muestra biológica no se retira del sustrato. Por ejemplo, una parte de la muestra biológica puede permanecer en el sustrato antes de liberar una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura unida a un analito) del sustrato y/o analizar un analito unido a una sonda de captura liberada del sustrato. En algunas realizaciones, al menos una porción de la muestra biológica no se somete a degradación enzimática y/o química de las células (por ejemplo, células permeabilizadas) o ablación del tejido (por ejemplo, ablación láser) antes del análisis de un analito unido a una sonda de captura del sustrato.

25 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos para detectar espacialmente un analito (por ejemplo, detectar la ubicación de un analito, por ejemplo, un analito biológico) de una muestra biológica (por ejemplo, presente en una muestra biológica) que incluyen: (a) opcionalmente teñir y/o obtener imágenes de una muestra biológica sobre un sustrato; (b) permeabilizar (por ejemplo, proporcionar una disolución que comprende un reactivo de permeabilización a) la muestra biológica sobre el sustrato; (c) poner en contacto la muestra biológica con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad captura el analito biológico; y (d) analizar el analito biológico capturado, detectando así espacialmente el analito biológico; donde la muestra biológica no se retira del sustrato.

35 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos para detectar espacialmente un analito biológico de interés de una muestra biológica que incluyen: (a) teñir y/o obtener imágenes de una muestra biológica sobre un sustrato; (b) proporcionar una disolución que comprende un reactivo de permeabilización a la muestra biológica sobre el sustrato; (c) poner en contacto la muestra biológica con una matriz sobre un sustrato, en donde la matriz comprende una o más pluralidades de sondas de captura permitiendo así que una o más pluralidades de sondas de captura capturen el analito biológico de interés; y (d) analizar el analito biológico capturado, detectando así espacialmente el analito biológico de interés; donde la muestra biológica no se retira del sustrato.

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

50 En algunas realizaciones, una sonda de captura puede extenderse (una "sonda de captura extendida", por ejemplo, tal como se describe en el presente documento). Por ejemplo, extender una sonda de captura puede incluir generar ADNc a partir de un ARN capturado (hibridado). Este proceso implica la síntesis de una cadena complementaria del ácido nucleico hibridado, por ejemplo, la generación de ADNc basado en el molde de ARN capturado (el ARN hibridado con el dominio de captura de la sonda de captura). Por tanto, en una etapa inicial de extensión de una sonda de captura, por ejemplo, la generación de ADNc, el ácido nucleico capturado (hibridado), por ejemplo, ARN, actúa como molde para la etapa de extensión, por ejemplo, transcripción inversa.

60 En algunas realizaciones, la sonda de captura se extiende usando transcripción inversa. Por ejemplo, la transcripción inversa incluye la síntesis de ADNc (ADN complementario o de copia) a partir de ARN, por ejemplo, (ARN mensajero), usando una transcriptasa inversa. En algunas realizaciones, la transcripción inversa se realiza mientras el tejido todavía está en su lugar, generando una biblioteca de analitos, donde la biblioteca de analitos incluye los códigos de barras espaciales de las sondas de captura adyacentes. En algunas realizaciones, la sonda de captura se extiende usando una o más ADN polimerasas.

65

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

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

20 En algunas realizaciones, las sondas de captura extendida bicatenarias se tratan para retirar cualquier sonda de captura no extendida antes de la amplificación y/o e análisis, por ejemplo, el análisis de secuencia. Esto puede lograrse mediante una variedad de métodos, por ejemplo, usando una enzima para degradar las sondas no extendidas, tal como una enzima exonucleasa o columnas de purificación.

25 En algunas realizaciones, las sondas de captura extendida se amplifican para producir cantidades que son suficientes para el análisis, por ejemplo, a través de la secuenciación del ADN. En algunas realizaciones, la primera cadena de las sondas de captura extendida (por ejemplo, moléculas de ADN y/o ADNc) actúa como molde para la reacción de amplificación (por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa).

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

35 En algunas realizaciones, las sondas de captura extendida que incluyen el grupo de afinidad pueden acoplarse a un sustrato específico para el grupo de afinidad. En algunas realizaciones, el sustrato puede incluir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el sustrato incluye avidina o estreptavidina y el grupo de afinidad incluye biotina. En algunas realizaciones, el sustrato incluye maltosa y el grupo de afinidad incluye proteína de unión a maltosa. En algunas realizaciones, el sustrato incluye proteína de unión a maltosa y el grupo de afinidad incluye maltosa. En algunas realizaciones, la amplificación de las sondas de captura extendidas puede funcionar para liberar las sondas extendidas de la superficie del sustrato, siempre que las copias de las sondas extendidas no estén inmovilizadas sobre el sustrato.

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

45 En algunas realizaciones, la sonda de captura extendida o complemento o amplicón de la misma se libera de la superficie del sustrato (por ejemplo, matriz) por medios físicos. Por ejemplo, cuando la sonda de captura extendida se inmoviliza indirectamente en el sustrato de la matriz, por ejemplo, a través de la hibridación con una sonda de superficie, puede ser suficiente interrumpir la interacción entre la sonda de captura extendida y la sonda de superficie. Se conocen en la técnica métodos para interrumpir la interacción entre moléculas de ácido nucleico que incluyen desnaturalizar las moléculas de ácido nucleico bicatenarias. Un método sencillo para liberar las moléculas de ADN (es decir, para eliminar la matriz de sondas extendidas) es usar una disolución que interfiere con los enlaces de hidrógeno de las moléculas bicatenarias. En algunas realizaciones, la sonda de captura extendida se libera aplicando una disolución calentada, tal como agua o tampón, de al menos 85°C, por ejemplo, al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99°C. En algunas realizaciones, se añade una disolución que incluye sales, tensioactivos, etc. que pueden desestabilizar adicionalmente la interacción entre las moléculas de ácido nucleico para liberar la sonda de captura extendida del sustrato.

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

10 En algunas realizaciones, las sondas complementarias a la sonda de captura extendida pueden ponerse en contacto con el sustrato. En algunas realizaciones, la muestra biológica puede estar en contacto con el sustrato cuando las sondas se ponen en contacto con el sustrato. En algunas realizaciones, la muestra biológica puede retirarse del sustrato antes de poner en contacto el sustrato con las sondas. En algunas realizaciones, las sondas pueden marcarse con un marcador detectable (por ejemplo, cualquiera de los marcadores detectables descritos en el presente documento). En algunas realizaciones, las sondas que no se unen especialmente (por ejemplo, se hibridan) a una sonda de captura extendida pueden eliminarse por lavado. En algunas realizaciones, las sondas complementarias a la sonda de captura extendida pueden detectarse en el sustrato (por ejemplo, obtención de imágenes, cualquiera de los métodos de detección descritos en el presente documento).

20 En algunas realizaciones, las sondas complementarias a una sonda de captura extendida pueden tener una longitud de aproximadamente 4 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos. En algunas realizaciones, las sondas (por ejemplo, las sondas detectables) complementarias a una sonda de captura extendida pueden tener una longitud de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 90 nucleótidos. En algunas realizaciones, las sondas (por ejemplo, las sondas detectables) complementarias a una sonda de captura extendida pueden tener una longitud de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos. En algunas realizaciones, las sondas (por ejemplo, las sondas detectables) complementarias a una sonda de captura extendida pueden tener una longitud de aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos. En algunas realizaciones, las sondas (por ejemplo, las sondas detectables) complementarias a una sonda de captura extendida pueden tener una longitud de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos. En algunas realizaciones, las sondas (por ejemplo, sondas detectables) complementarias a una sonda de captura extendida pueden tener una longitud de aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30, aproximadamente 31, aproximadamente 32, aproximadamente 33, aproximadamente 34, aproximadamente 35, aproximadamente 36, aproximadamente 37, aproximadamente 38, aproximadamente 39, aproximadamente 40, aproximadamente 41, aproximadamente 42, aproximadamente 43, aproximadamente 44, aproximadamente 45, aproximadamente 46, aproximadamente 47, aproximadamente 48, aproximadamente 49, aproximadamente 50, aproximadamente 51, aproximadamente 52, aproximadamente 53, aproximadamente 54, aproximadamente 55, aproximadamente 56, aproximadamente 57, aproximadamente 58, aproximadamente 59, aproximadamente 60, aproximadamente 61, aproximadamente 62, aproximadamente 63, aproximadamente 64, aproximadamente 65, aproximadamente 66, aproximadamente 67, aproximadamente 68, aproximadamente 69, aproximadamente 70, aproximadamente 71, aproximadamente 72, aproximadamente 73, aproximadamente 74, aproximadamente 75, aproximadamente 76, aproximadamente 77, aproximadamente 78, aproximadamente 79, aproximadamente 80, aproximadamente 81, aproximadamente 82, aproximadamente 83, aproximadamente 84, aproximadamente 85, aproximadamente 86, aproximadamente 87, aproximadamente 88, aproximadamente 89, aproximadamente 90, aproximadamente 91, aproximadamente 92, aproximadamente 93, aproximadamente 94, aproximadamente 95, aproximadamente 96, aproximadamente 97, aproximadamente 98 y aproximadamente 99 nucleótidos.

50 En algunas realizaciones, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 sondas pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridarse) a una sonda de captura extendida. En algunas realizaciones, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 sondas pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridarse) a una sonda de captura extendida. En algunas realizaciones, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 sondas pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridarse) a una sonda de captura extendida. En algunas realizaciones, de aproximadamente 20 a aproximadamente 90 sondas pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridarse) a una sonda de captura extendida. En algunas realizaciones, de aproximadamente 30 a aproximadamente 80 sondas (por ejemplo, sondas detectables) pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridarse) a una sonda de captura extendida. En algunas realizaciones, de aproximadamente 40 a aproximadamente 70 sondas pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridarse) a una sonda de captura extendida. En algunas realizaciones, de aproximadamente 50 a aproximadamente 60 sondas pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridarse) a una sonda de captura extendida. En algunas realizaciones, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18,

aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30, aproximadamente 31, aproximadamente 32, aproximadamente 33, aproximadamente 34, aproximadamente 35, aproximadamente 36, aproximadamente 37, aproximadamente 38, 5 aproximadamente 39, aproximadamente 40, aproximadamente 41, aproximadamente 42, aproximadamente 43, aproximadamente 44, aproximadamente 45, aproximadamente 46, aproximadamente 47, aproximadamente 48, aproximadamente 49, aproximadamente 50, aproximadamente 51, aproximadamente 52, aproximadamente 53, aproximadamente 54, aproximadamente 55, aproximadamente 56, aproximadamente 57, aproximadamente 58, aproximadamente 59, aproximadamente 60, aproximadamente 61, aproximadamente 62, aproximadamente 63, 10 aproximadamente 64, aproximadamente 65, aproximadamente 66, aproximadamente 67, aproximadamente 68, aproximadamente 69, aproximadamente 70, aproximadamente 71, aproximadamente 72, aproximadamente 73, aproximadamente 74, aproximadamente 75, aproximadamente 76, aproximadamente 77, aproximadamente 78, aproximadamente 79, aproximadamente 80, aproximadamente 81, aproximadamente 82, aproximadamente 83, aproximadamente 84, aproximadamente 85, aproximadamente 86, aproximadamente 87, aproximadamente 88, 15 aproximadamente 89, aproximadamente 90, aproximadamente 91, aproximadamente 92, aproximadamente 93, aproximadamente 94, aproximadamente 95, aproximadamente 96, aproximadamente 97, aproximadamente 98 y aproximadamente 99 sondas pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridarse) a una sonda de captura extendida.

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

25 En algunos casos, la sonda ligada y la sonda de captura pueden amplificarse o copiarse, creando una pluralidad de moléculas de ADNc. En algunas realizaciones, el ADNc puede desnaturalizarse del molde de la sonda de captura y transferirse (por ejemplo, a un tubo limpio) para la amplificación y/o la construcción de bibliotecas. El ADNc con código de barras espacial puede amplificarse antes de la construcción de bibliotecas. A continuación, el ADNc puede fragmentarse 30 enzimáticamente y seleccionarse por tamaño para optimizar el tamaño del amplicón de ADNc. Las secuencias P5 y P7 dirigidas a capturar los amplicones en una célula de flujo de secuenciación (instrumentos de secuenciación de Illumina) pueden añadirse a los amplicones, i7 e i5 pueden usarse como índices de muestra, y TruSeq Read 2 puede añadirse a través de reparación de extremos, formación de cola A, ligación de adaptador y PCR. A continuación, los fragmentos de ADNc pueden secuenciarse mediante la secuenciación de extremos emparejados usando TruSeq Read 1 y TruSeq Read 2 como sitios de cebadores de secuenciación. Las secuencias adicionales están dirigidas a instrumentos de secuenciación 35 de Illumina o instrumentos de secuenciación que utilizan esas secuencias; sin embargo, un experto en la técnica comprenderá que también son igualmente aplicables para su uso en los métodos mencionados anteriormente secuencias adicionales o alternativas usadas por otros instrumentos o tecnologías de secuenciación.

40 En algunas realizaciones, cuando una muestra obtiene un código de barras directamente a través de la hibridación con sondas de captura o agentes de captura de analitos hibridados, unidos o asociados con la superficie celular, o introducidos en la célula, tal como se describió anteriormente, la secuenciación puede realizarse en la muestra intacta.

Puede usarse una amplia variedad de diferentes métodos de secuenciación para analizar el analito con código de barras (por ejemplo, el producto de ligación). En general, los polinucleótidos secuenciados pueden ser, por ejemplo, moléculas 45 de ácido nucleico tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), incluyendo variantes o derivados de los mismos (por ejemplo, ADN monocatenario o híbridos de ADN/ARN y moléculas de ácido nucleico con un análogo de nucleótido).

La secuenciación de polinucleótidos puede realizarse mediante diversos sistemas. En términos más generales, la 50 secuenciación puede realizarse usando amplificación de ácidos nucleicos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (por ejemplo, PCR digital y PCR digital de gotitas (ddPCR), PCR cuantitativa, PCR en tiempo real, PCR multiplex, métodos de singleplex basados en PCR, PCR en emulsión), y/o amplificación isotérmica. Los ejemplos no limitativos de métodos para secuenciar material genético incluyen, pero no se limitan a, métodos de hibridación de ADN (por ejemplo, transferencia de tipo Southern), métodos de digestión con enzimas de restricción, métodos de secuenciación de Sanger, 55 métodos de secuenciación de próxima generación (por ejemplo, secuenciación de molécula individual en tiempo real), secuenciación por nanoporos y secuenciación de Polony), métodos de ligación y métodos de micromatrices.

(1) Kits

60 En algunas realizaciones, también se proporcionan en el presente documento kits que incluyen uno o más reactivos para detectar uno o más analitos descritos en el presente documento. En algunos casos, el kit incluye un sustrato que comprende una pluralidad de sondas de captura que comprenden un código de barras espacial y el dominio de captura. En algunos casos, el kit incluye una pluralidad de sondas (por ejemplo, una primera sonda, una segunda sonda, una o 65 más sondas de extensión y/o un tercer oligonucleótido).

Un ejemplo no limitativo de un kit usado para realizar cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluye: (a) un sustrato que comprende una pluralidad de sondas de captura que comprenden un código de barras espacial y un dominio de captura; (b) un sistema que comprende: una pluralidad de primeras sondas y segundas sondas, en donde una primera sonda y una segunda sonda comprenden cada una secuencias que son sustancialmente complementarias a un analito, y en donde la segunda sonda comprende un dominio de unión de captura; y (c) instrucciones para realizar el método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

Otro ejemplo no limitativo de un kit usado para realizar cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluye: (a) una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura; (b) una pluralidad de sondas que comprenden una primera sonda y una segunda sonda, en donde la primera sonda y la segunda sonda son sustancialmente complementarias a secuencias adyacentes de un analito, en donde la segunda sonda comprende (i) un dominio de unión de sonda de captura que puede unirse a un dominio de captura de la sonda de captura y (ii) una secuencia de ligador; (c) una pluralidad de enzimas que comprenden una ribonucleasa y una ligasa; y (d) instrucciones para realizar el método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

Otro ejemplo no limitativo de un kit usado para realizar cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluye: (a) una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura; (b) una pluralidad de sondas que comprenden una primera sonda y una segunda sonda, en donde la primera sonda y la segunda sonda son sustancialmente complementarias a secuencias adyacentes de un analito, en donde la primera sonda incluye una secuencia de ligador, en donde la segunda sonda comprende un dominio de unión de sonda de captura que puede unirse a un dominio de captura de la sonda de captura; (c) una pluralidad de enzimas que comprenden una ribonucleasa y una ligasa; y (d) instrucciones para realizar el método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

En algunas realizaciones de cualquiera de los kits descritos en el presente documento, el kit incluye una segunda sonda que incluye un grupo fosfato preadenilado en su extremo 5' y una primera sonda que comprende al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3'.

EJEMPLOS

30 Ejemplo 1. Análisis de expresión génica espacial de muestras fijadas con FFPE usando ligación con molde de ARN

Otros han demostrado ligación in situ. Véase Credle et al., Nucleic Acids Research, Volumen 45, n.º 14, 21 de agosto de 2017, página e128, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx471> (2017). Sin embargo, los enfoques anteriores han utilizado la hibridación usando colas de poli(A) que conducían a una unión fuera de diana. En este caso, la cola de poli(A) en un oligonucleótido sonda se cambió a otra secuencia.

Como descripción general, se realizó un ejemplo no limitativo de ligación con molde de ARN en una muestra fijada con FFPE tal como se describe en la figura 13. Las muestras fijadas con FFPE se desparafinaron, se tiñeron (por ejemplo, colorante de H&E) y se obtuvieron imágenes 1301. Se retiró la tinción de las muestras (por ejemplo, usando HCl) y se desreticularon 1302. Después de la desreticulación, las muestras se trataron con tampón de prehibridación (por ejemplo, tampón de hibridación sin la primera y la segunda sonda), se añadieron sondas a la muestra, se hibridaron las sondas y se lavaron las muestras 1303. Se añadió ligasa a las muestras para ligar las sondas hibridadas para generar un producto de ligación y luego se lavaron las muestras 1304. Las sondas se liberaron del analito poniendo en contacto la muestra biológica con ARNasa H 1305. Entonces se permeabilizaron las muestras para facilitar la captura del producto de ligación por las sondas de captura en el sustrato 1306. Luego se extendieron 1307 los productos de ligación que se hibridaron con las sondas de captura. Se desnaturalizaron 1308 las sondas de captura extendidas. Las sondas de captura extendida desnaturalizadas se indexaron y las bibliotecas amplificadas se sometieron a control de calidad 1309 antes de secuenciarse.

Se desparafinaron portaobjetos con tejido cerebral de ratón cortados en FFPE, se permeabilizaron con PBST y se equilibraron con un tampón pre-Hyb dos veces durante 5 minutos cada uno. La desreticulación de la muestra se realizó usando o bien un reactivo de desreticulación de TE o bien un reactivo de desreticulación de PBS-tween. Para la desreticulación con TE, se añadieron 100 µl de tampón TE (pH 9,0) (Genemed 10-0046) por muestra. Las muestras tratadas con TE se sometieron a un protocolo de termociclador según la tabla 1.

Tabla 1. Protocolo de termociclador de desreticulación

Desreticulación: temperatura de la tapa: 70°C, volumen 100 µl		
Etapa	Temperatura	Tiempo
Pre calentamiento	70 °C	∞
Desreticulación	70 °C	60 minutos
Mantenimiento	22 °C	∞

Tras el protocolo del termociclador, los portaobjetos se colocaron en un casete de metal y se sometieron a los métodos descritos en la tabla 2.

Tabla 2. Desreticulación con HCl*

5

Etapa	Tiempos
1. Lavado 1: Se añadieron 100 µl de HCl 0,1 N	1 minuto
2. Lavado 2: Se retiró el HCl y se añaden 100 µl de HCl	1 minuto
3. Lavado 3: Se retira el HCl y se añaden 100 µl de HCl	1 minuto
4. Cambio de tampón: Se retiró el HCl y se añadieron 100 µl de tampón TE (pH 9,0)	
5. Se retiró el TE y se añadieron 100 µl de TE (pH 9,0).	
6. Se incubó a 70°C	1 hora
7. Se retiró el TE y se añadieron 100 µl de PBS 1x-Tween (0,05%)	
8. Se incubó a temperatura ambiente	15 minutos
Nota: Se retiró todo el líquido en cada etapa.	

10 Las sondas de RTL se diseñaron para hibridarse con secuencias adyacentes de cada analito (por ejemplo, secuencia de ARNm) de interés en el genoma, incluyendo el receptor de estrógeno, el receptor de progesterona y ERBB2, también conocido como HER2. En este caso, se añadieron 20.056 pares de sondas (por ejemplo, sondas RHS y LHS) a cada muestra de tejido para capturar 19.490 genes diferentes. Se añadieron simultáneamente dos sondas de RTL (una sonda de lado izquierdo (LHS) y una sonda de lado derecho (RHS) (véase por ejemplo **la figura 6**)) para cada analito y se hibridaron en secuencias adyacentes del ARNm diana, formando estructuras dúplex de ARN:ADN. Después de la desreticulación, se retiró el PBS-Tween y se añadieron las sondas de ADN (1 nM de cada sonda) a las muestras de tejido en un tampón de hibridación para hibridar las sondas de ADN con sus respectivas dianas de ARNm. El tampón de hibridación incluyó SSC, formamida o un equivalente, ARNt de levadura como portador y las sondas de ADN RHS y LHS.

15

Un oligonucleótido sonda (por ejemplo, la sonda RHS o la sonda en 3') comprende una secuencia funcional no diana en su extremo 5', mientras que el otro oligonucleótido sonda (por ejemplo, la sonda LHS o la sonda en 5') comprende una secuencia de poliA no diana en su extremo 3'. Las sondas de ADN se añadieron a las muestras de tejido y se incubaron a 50°C durante 2 horas y 30 minutos según el protocolo del termociclador descrito en la tabla 3.

20

Tabla 3. Protocolo de hibridación

Protocolo de termociclador de hibridación		
Hibridación: Temperatura de la tapa: 50°C, Volumen: 100 µl		
Etapa	Temperatura	Tiempo
Pre calentamiento	50 °C	∞
Hibridación	50 °C	2 horas y 30 minutos
Mantenimiento durante los lavados de hibridación posteriores	50 °C	∞
Mantenimiento	22 °C	∞

25 Después de la incubación a 50°C durante 2 ½ horas, se retiró el tampón de hibridación y se lavó el tejido dos veces, incluyendo cada lavado 5 minutos a 50°C con tampón de lavado posterior a la hibridación precalentado hasta 50°C. El tampón de lavado posterior a la hibridación (tampón Post-hyb) incluyó: SSC, ARNt de levadura y agua libre de nucleasas.

25

Para ligar dos oligonucleótidos sonda que contienen dirribonucleótido que se hibridaron de forma adyacente en el ARNm diana tal como se describió anteriormente, cada muestra se incubó con una mezcla de reacción de ADN ligasa de T4, RNL2 (mezcla de ligación). La mezcla de reacción de ligasa incluyó: tampón de ARN ligasa de T4 (NEB B0293 S), ligasa RNL2 y agua libre de nucleasas.

30

Para ligar dos oligonucleótidos sonda de ADN que se hibridaron de manera adyacente en los ARNm diana tal como se describió anteriormente, se añadió a cada muestra SplintR (NEB) en un tampón de ligación. La mezcla de reacción de ligasa incluyó: Tris-HCl (pH 7,5) MnCh ATP, DTT, fluido sustituto, ligasa SplintR (NEB) y agua libre de nucleasas por muestra. Las etapas de ligación y lavado se realizaron tal como se describe en la tabla 4.

35

Después de la ligación de la sonda de ADN, se lavaron las muestras de tejido dos veces durante 5 minutos a 60°C en un tampón de lavado posterior a la ligación de SSC/formamida.

Tabla 4. Protocolo de ligación

5

Ligación de sonda	
Etapa	Tiempo
Se retiró TODO el tampón Post-Hyb antes de añadir Ligase Mix	1 h
Se añadió Ligase Mix y se incubó a 37°C	
Lavado 1: Se retiró toda la Ligase Mix, se añadió el tampón de lavado posterior a la ligación* y se incubó a 60°C durante 5 minutos	5 min
Se calentó el tampón de lavado restante hasta 60°C	
Lavado 2: Se retiró el tampón de lavado posterior a la ligación, se añadió el tampón posterior a la ligación precalentado y se incubó a 60°C durante 5 minutos.	5 min
Se retiró el tampón de lavado posterior a la ligación y se añadió SSC 2X**. Se repitió el lavado con SSC 2X.	
El casete se enfrió a temperatura ambiente antes de añadir <u>ARNasa</u>	
* El tampón de lavado posterior a la ligación incluyó (por muestra): SSC, formamida o equivalente, y agua libre de nucleasas.	

Se añadió ARNasa H para digerir la cadena de ARN del dúplex ARN:ADN hibridado. Brevemente, el ARN de los híbridos ADN:ARN se digirió incubando las muestras con una mezcla de ARNasa H durante 30 minutos a 37°C, donde la mezcla de ARNasa H incluyó: tampón de ARNasa H y ARNasa H. Tras la incubación y mientras la misma permanecía a 37°C, se permeabilizó la muestra biológica para liberar las sondas de RTL ligadas usando 1,25 mg/ml de proteinasa K. En particular, la disolución de proteinasa K incluyó (por muestra): Tris (pH 7,5), MgCl₂, Sarkosyl o SDS, proteinasa K (enzima) y agua libre de nucleasas. La muestra se incubó a 37°C durante al menos 5 minutos en la disolución de proteinasa K. Entonces se lavaron las muestras tres veces con SSC 2x.

10

15

Se permitió que las sondas de ADN ligadas y liberadas que servían como sustituto para el ARNm diana se hibridaran con el dominio de captura en la sonda de captura inmovilizada en la matriz espacial a través de la cola de poliA en el extremo 3' de la sonda RHS. Se copiaron las sondas ligadas capturadas usando la sonda de captura como molde y se liberó el producto de extensión de la matriz espacial. Brevemente, se incubaron los tejidos con una mezcla de extensión de segunda cadena que comprendía ADN polimerasa Kapa Hifi durante 25 minutos a 53°C. Después de la incubación, se retiró la mezcla de extensión de segunda cadena de los tejidos y se lavaron los tejidos con SSC 2x. Se añadió una disolución de KOH a cada uno de los pocillos de tejido, se incubaron los tejidos a temperatura ambiente durante 10 minutos para liberar el producto de extensión de la matriz espacial y se transfirió el sobrenadante de cada pocillo de tejido para la cuantificación y preparación de bibliotecas. La cuantificación de la muestra se realizó mediante qPCR y la mezcla maestra de qPCR KAPA SYBR FAST según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se preparó la mezcla maestra KAPA SYBR añadiendo el cebador cDNA_F de qPCR y el cebador sRNA_R2 de qPCR. El protocolo del termociclador incluyó: 3 minutos a 98°C; 30 ciclos con 5 segundos a 98°C, y 30 segundos a 63°C. Para la preparación de bibliotecas, las muestras se indexaron usando Amp Mix que incluía cebadores de indexación doble y Amp Mix. Luego se secuenciaron y se analizaron los ácidos nucleicos.

20

25

30

Como controles, se realizaron experimentos simultáneos en los que no se añadió ligasa, se añadió pepsina antes del tratamiento con ARNasa H o se añadió pepsina después del tratamiento con ARNasa H.

Tal como se muestra en **las figuras 14-19**, la expresión espacial de los pares de sondas ligadas destaca la fisiología subyacente del tejido cerebral de ratón. **La figura 14** muestra los resultados de PCR que demuestran que se capturó y amplificó un producto de ligación independientemente de que la permeabilización se produjera antes o después del tratamiento con ARNasa H (control positivo = normal, control negativo = sin ligasa). La flecha 1 apunta a una banda de PCR que representa los productos de ligación deseados, mientras que las flechas 2, 3 y 4 representan productos que no son de ligación. **La figura 15** muestra la sonda no específica detectada como una fracción de las lecturas totales para cada condición. **Las figuras 16A-B** muestran que la mayoría de las combinaciones de sondas son específicas. Las flechas indican las sondas RHS que tenían un fondo aumentado y, por tanto, incluyen alguna hibridación no específica. Considerando los recuentos totales en **la figura 17**, las sondas LHS+RHS específicas de genes se superponen con la huella tisular (véanse **las figuras 17A-C**, indicando un círculo negro la huella tisular).

35

40

Además, se añadieron sondas específicas para diversos genes (por ejemplo, Grp88, Penk, Plp1, Nptrx y Mpb2) a la muestra en tampón de hibridación primero durante 30 minutos a 60°C y luego durante 2 horas a 45°C (véanse, por ejemplo, **la figura 18** y **la figura 19**). Cuando se contaron los UMI específicos de la diana, se observó un

45

patrón de expresión más detallado. Véanse, por ejemplo, **las figuras 19B-19F**. Este análisis reveló que una hibridación más prolongada condujo a una mayor sensibilidad. En referencia a **las figuras 18A-18E**, los círculos blancos indican manchas que notifican la expresión del gen indicado.

5 Se realizó una hibridación durante la noche en comparación con una hibridación de 2 horas tal como se ha comentado. El análisis de muestras de cerebro de ratón utilizando 21.833 pares de sondas (por ejemplo, sondas RHS y LHS) añadidas a cada muestra de tejido para capturar 21.604 genes diferentes reveló que la hibridación durante la noche, y por tanto una hibridación más prolongada, condujo a una mayor sensibilidad en comparación con un control positivo (véanse **las figuras 20A-20B**). Se diseñaron sondas de ratón a partir de dianas derivadas de Appris (véase Rodríguez et al., *Nucleic Acids Research*, 46: D213-217, doi: 10.1093/nar/gkx997 (2018)) y GENCODE. Todos los pares de sondas no se superpusieron e incluían en general aproximadamente 1 par de sondas por gen.

15 **Ejemplo 2. Análisis de expresión génica espacial de cáncer de mama triple positivo (TPBC) usando ligación con molde de ARN (RTL)**

Este ejemplo demuestra que puede realizarse RTL en una muestra para identificar la abundancia de analitos y la ubicación espacial de manera no sesgada.

20 Se examinó una muestra de cáncer de mama triple positivo ("TPBC", HER2, receptor de estrógeno y receptor de progesterona positivo) de dos años conservada mediante procesamiento con FFPE para determinar la abundancia de analitos y la ubicación espacial. Las muestras de TPBC se analizaron con sondas de ADN a través de métodos de ligación con molde de ARN. Antes de la etapa de ligación, las muestras de tejido de TPBC se desparafinaron y tiñeron según los protocolos establecidos. Por ejemplo, las muestras de tejido de TPBC FFPE se precalentaron en un baño de agua (40°C), se realizaron cortes (10 µm), se secaron a 42°C durante varias horas y se colocaron en un desecador a temperatura ambiente durante la noche. Los tejidos cortados secos se desparafinaron introduciendo en el horno a 60°C, se movieron a través de una serie de lavados con xileno y EtOH, se aclararon con agua varias veces. Después del aclarado, los tejidos desparafinados se tiñeron con hematoxilina según protocolos establecidos. Se obtuvieron imágenes de los tejidos teñidos, identificando regiones de tumor y estroma. Véase **la figura 21A**.

30 Los tejidos se desreticularon para retirar las reticulaciones de formaldehído dentro de la muestra, liberando así los analitos para la ligación con molde de ARN. Brevemente, las muestras de tejido se incubaron con una disolución de HCl durante 1 minuto y se repitieron dos veces durante un total de 3 minutos. Después de las incubaciones con HCl, se incubaron los cortes de tejido a 70°C durante 1 hora en TE pH 9,0. Se retiró el TE y los tejidos se incubaron en PBS 1x-Tween durante 15 minutos.

35 Las sondas de RTL se diseñaron para hibridarse con secuencias adyacentes de cada analito (por ejemplo, secuencia de ARNm) de interés en el genoma, incluyendo el receptor de estrógeno, el receptor de progesterona y ERBB2, también conocido como HER2.

40 Las sondas se diseñaron a partir de dianas derivadas de Appris (véase, Rodríguez et al., *Nucleic Acids Research*, 46: D213-217, doi: 10.1093/nar/gkx997 (2018)) y GENCODE. Todos los pares de sondas no se superpusieron e incluían en general aproximadamente 1 par de sondas por gen.

45 En este caso, se añadieron 20.056 pares de sondas (por ejemplo, sondas RHS y LHS) a cada muestra de tejido para capturar 19.490 genes diferentes, incluyendo ESR1, PGR y HER2, en el genoma humano. Se añadieron simultáneamente dos sondas de RTL (una sonda de lado izquierdo (LHS) y una sonda de lado derecho (RHS) (véase por ejemplo **la figura 6**)) para cada analito y se hibridaron en secuencias adyacentes del ARNm diana, formando estructuras dúplex de ARN:ADN.

50 Después de la desreticulación, se añadieron las sondas de ADN (1nm de cada sonda) a las muestras de tejido en un tampón de hibridación para hibridar las sondas de ADN con sus respectivas dianas de ARNm. Un oligonucleótido sonda (por ejemplo, la sonda RHS o la sonda en 3') comprende una secuencia funcional no diana en su extremo 5', mientras que el otro oligonucleótido sonda (por ejemplo, la sonda LHS o la sonda en 5') comprende una secuencia de poliA no diana en su extremo 3'. Brevemente, se añadió tampón de hibridación con las sondas de ADN a las muestras de tejido y los tejidos se incubaron a 50°C durante aproximadamente 2 ½ horas. Se eliminó el tampón de hibridación/sonda de ADN y se lavaron los tejidos mediante la adición de un tampón posterior a la hibridación sin sondas de ADN e incubación a 50°C durante 5 minutos, para un total de 3 lavados posteriores a la hibridación.

60 Para ligar los dos oligonucleótidos sonda de ADN que se hibridaron de manera adyacente en los ARNm diana tal como se describió anteriormente, se añadió a cada muestra de tejido SplintR (NEB) en un tampón de ligación y los tejidos se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Después de la ligación de la sonda de ADN, se lavaron las muestras de tejido dos veces durante 5 minutos a 60°C en un tampón de lavado posterior a la ligación de SSC/formamida.

65 A continuación, se añadió ARNasa H para digerir la cadena de ARN del dúplex ARN:ADN hibridado. Brevemente, el ARN de los híbridos ADN:ARN se digirió incubando los tejidos con ARNasa H durante 30 minutos a 37°C. A continuación, la muestra biológica se permeabilizó para liberar las sondas de RTL ligadas y se puso en contacto con una pluralidad de

sondas de captura unidas a un portaobjetos. En particular, después de 30 minutos, los tejidos se lavaron y permeabilizaron añadiendo 1,25 mg/ml de proteinasa K, se incubaron a 37°C durante al menos 5 minutos y luego se lavaron para retirar la proteasa.

- 5 Se permitió que las sondas de ADN ligadas y liberadas que servían como sustituto para el ARNm diana se hibridaran con el dominio de captura en la sonda de captura (sonda de captura inmovilizada en la matriz espacial) a través de la cola de poliA en el extremo 3' de la sonda RHS. Se copiaron las sondas ligadas capturadas usando la sonda de captura como molde y se liberó el producto de extensión de la matriz espacial. Brevemente, se incubaron los tejidos con una mezcla de extensión de segunda cadena que comprendía ADN polimerasa Kapa Hifi (Roche) durante 25 minutos a 53°C. Después
- 10 de la incubación, se retiró la mezcla de extensión de los tejidos y se lavaron los tejidos con SSC. Se añadió una disolución de KOH a cada uno de los pocillos de tejido, se incubaron los tejidos a temperatura ambiente durante 10 minutos para liberar el producto de extensión de la matriz espacial y se transfirió el sobrenadante de cada pocillo de tejido para la cuantificación, la preparación de bibliotecas y la secuenciación en el instrumento de secuenciación NextSeq de Illumina.
- 15 La evaluación de todo el transcriptoma ayudó a comprender mejor la heterogeneidad de TPBC. Por ejemplo, se observó que el uso de 20.056 pares de sondas (por ejemplo, sondas RHS y LHS) para capturar 19.490 genes diferentes reveló resultados comparables a un control positivo en términos de número de UMI por célula frente al número de genes por célula (**figura 21B**). El análisis de la ubicación espacial y la abundancia de cada sonda ligada a RTL que se hibridó con la matriz reveló ocho (8) agrupaciones de expresión diferentes, lo que demuestra que la expresión génica diferencial y la
- 20 ubicación de los genes expresados pueden determinarse usando sondas de RTL. Véanse **las figuras 21C-21D**. En referencia a **la figura 21C**, cada punto en el gráfico es una mancha en la matriz. Cada mancha se asigna a una agrupación, que se indican mediante círculos negros. En algunos casos, las manchas asignadas a una agrupación están fuera del círculo indicado en el gráfico. En referencia a **la figura 21D**, cada mancha en la matriz se asigna a una agrupación y cada agrupación se indica, en parte, mediante círculos. En algunos casos, las manchas se asignan a una agrupación pero no
- 25 están dentro de los círculos indicados en la matriz. Finalmente, se determinó la expresión del analito individual. Una muestra de TPBC mostró de manera rutinaria niveles elevados de receptor de estrógeno, receptor de progesterona y ERBB2 (HER2). Tal como se muestra en **las figuras 21E-21GA**.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la ubicación de un analito en una muestra biológica que comprende:
- 5 a) proporcionar la muestra biológica en una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende: (i) un código de barras espacial y (ii) un dominio de captura;
- 10 (b) poner en contacto una primera sonda y una segunda sonda con la muestra biológica, en donde la primera sonda y la segunda sonda comprenden cada una secuencias que son sustancialmente complementarias a las secuencias del analito, y en donde la segunda sonda comprende un dominio de captura de sonda de captura que es complementario a la totalidad o una porción del dominio de captura;
- (c) hibridar la primera sonda y la segunda sonda con el analito;
- (d) generar un producto de ligación ligando la primera sonda y la segunda sonda;
- (e) liberar el producto de ligación del analito;
- 15 (f) hibridar el producto de ligación con el dominio de captura; y
- (g) determinar (i) la totalidad o parte de la secuencia del producto de ligación unido al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) la totalidad o parte de la secuencia del código de barras espacial, o un complemento del mismo, y usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para determinar la ubicación del analito en la muestra biológica.
2. El método según la reivindicación 1, en donde la primera sonda y la segunda sonda son sustancialmente complementarias a las secuencias adyacentes del analito.
- 20 3. El método según la reivindicación 1, en donde la primera sonda y la segunda sonda se hibridan con secuencias que no son adyacentes entre sí en el analito; opcionalmente, en donde la primera sonda se extiende con una ADN polimerasa, mediante lo cual (i) llena un espacio entre la primera sonda y la segunda sonda y (ii) genera una primera sonda extendida.
- 25 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además (i) hibridar la primera sonda y la segunda sonda con el analito a una temperatura de desde aproximadamente 50°C hasta aproximadamente 75°C, y (ii) hibridar la primera sonda y la segunda sonda con una tercera sonda a una temperatura de desde aproximadamente 15°C hasta aproximadamente 35°C.
- 30 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde poner en contacto la primera sonda y la segunda sonda con la muestra biológica comprende poner en contacto la muestra biológica con 5000 o más pares de sondas, en donde un par de sondas de los 5000 o más pares de sondas comprende la primera sonda y la segunda sonda.
- 35 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la generación del producto de ligación comprende ligar la primera sonda a la segunda sonda usando ligación enzimática o ligación química, en donde la ligación enzimática utiliza una ligasa; en donde opcionalmente la ligasa es una o más de una ARN ligasa de T4 (Rnl2), una ADN ligasa del virus Chlorella PBCV-1, una ADN ligasa monocatenaria o una ADN ligasa de T4.
- 40 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la primera sonda comprende además una secuencia de cebador.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la primera sonda y/o la segunda sonda es una sonda de ADN.
- 45 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la liberación del producto de ligación del analito comprende poner en contacto la muestra biológica con una enzima ARNasa H.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la muestra biológica es una muestra de tejido fijada en formalina e incluida en parafina (FFPE), una muestra de tejido fresca o una muestra de tejido congelada.
- 50 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la muestra biológica se tiñó previamente usando inmunofluorescencia, inmunohistoquímica o hematoxilina y eosina.
- 55 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además poner en contacto la muestra biológica con un agente de permeabilización, en donde el agente de permeabilización se selecciona de un disolvente orgánico, un detergente, una enzima o una combinación de los mismos; opcionalmente en donde el agente de permeabilización comprende proteinasa K o pepsina.
- 60 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el analito comprende ARN, opcionalmente en donde el ARN es ARNm.
14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la etapa de determinación (g) comprende secuenciar (i) la totalidad o una parte de la secuencia del producto de ligación, o un complemento del mismo, y (ii) la totalidad o una parte de la secuencia del código de barras espacial, o un complemento del mismo.
- 65

15. Una composición que comprende:

(a) una matriz espacial que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura;

(b) una muestra biológica en la matriz espacial en donde la muestra biológica comprende una pluralidad de analitos; y

5 (c) una primera sonda y una segunda sonda que están ligadas entre sí, en donde la primera sonda y la segunda sonda comprenden cada una, una o más secuencias que son sustancialmente complementarias a las secuencias del analito y en donde una de la primera o la segunda sonda comprende un dominio de captura de sonda de captura que se hibrida con el dominio de captura de la sonda de captura en la matriz espacial;

10 en donde la composición comprende además una enzima ARNasa H.

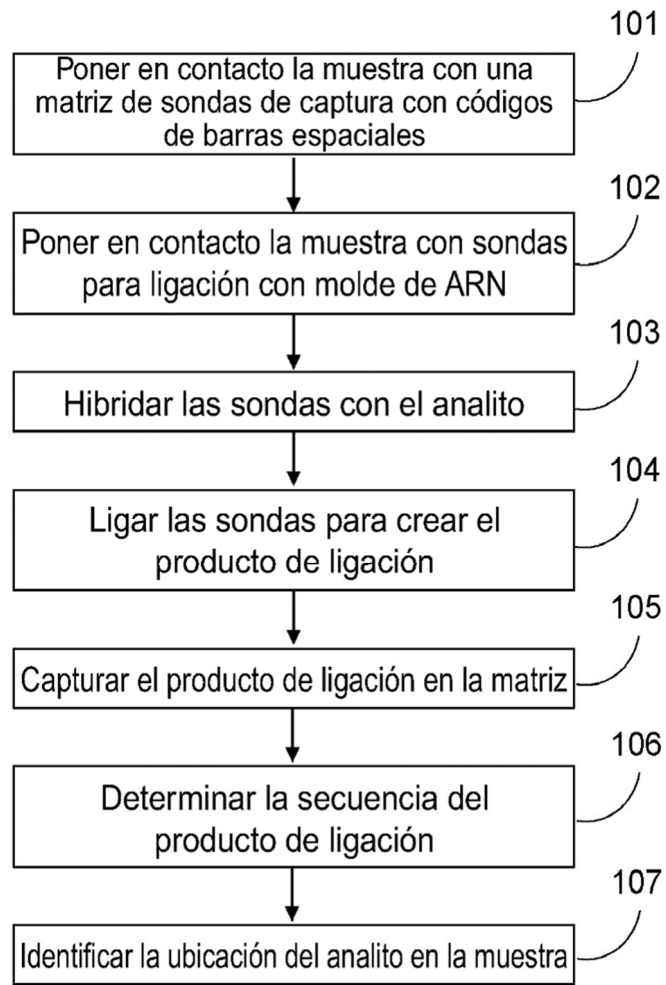


FIG. 1

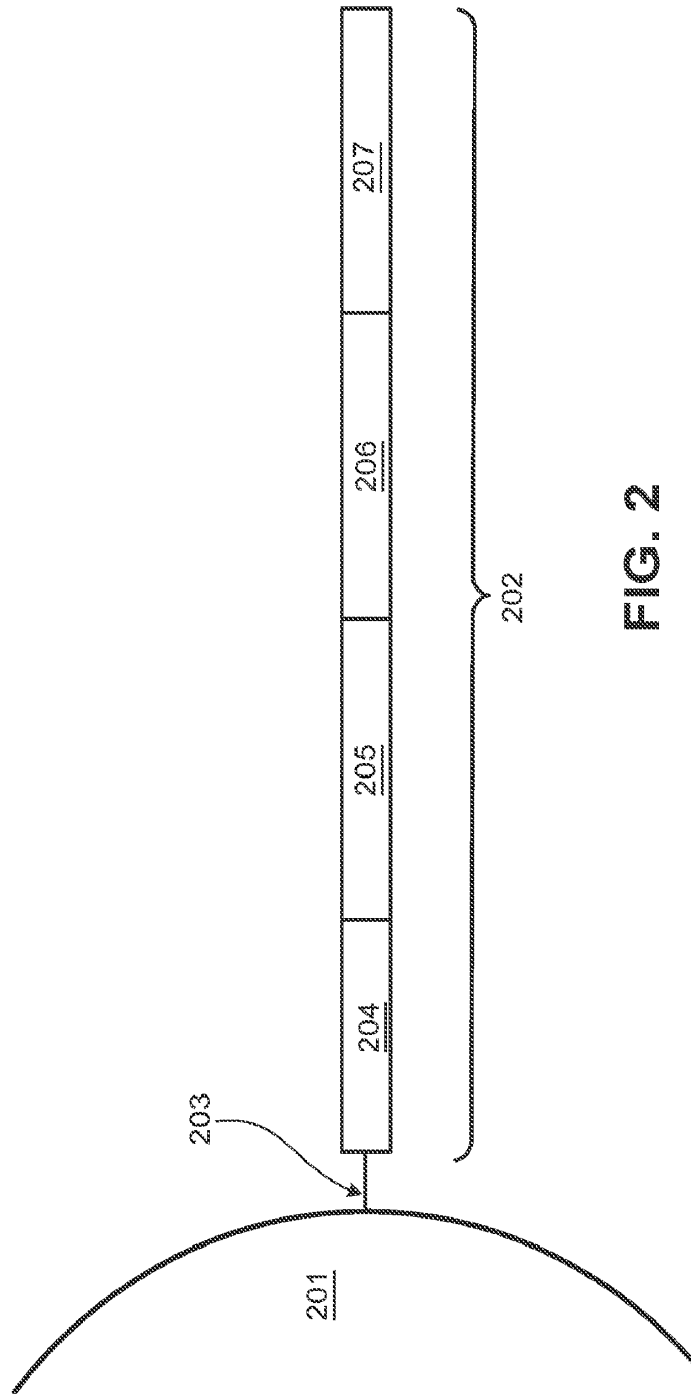


FIG. 2

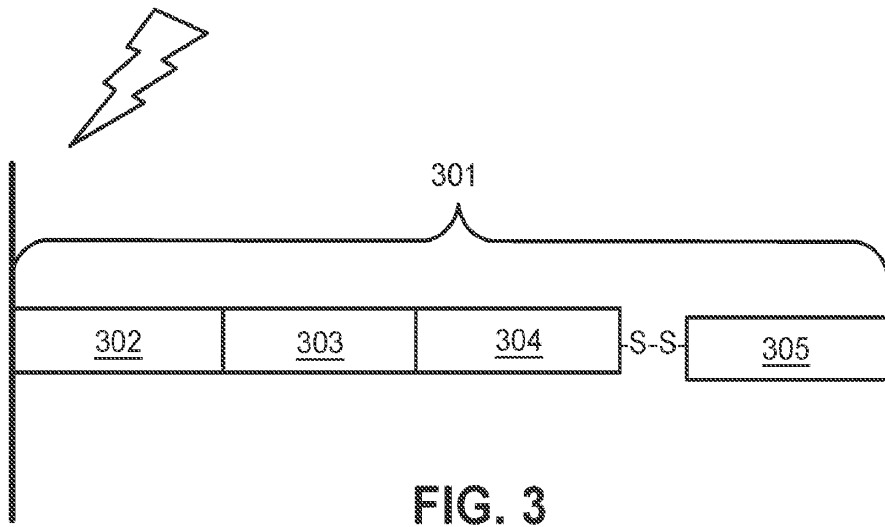


FIG. 3

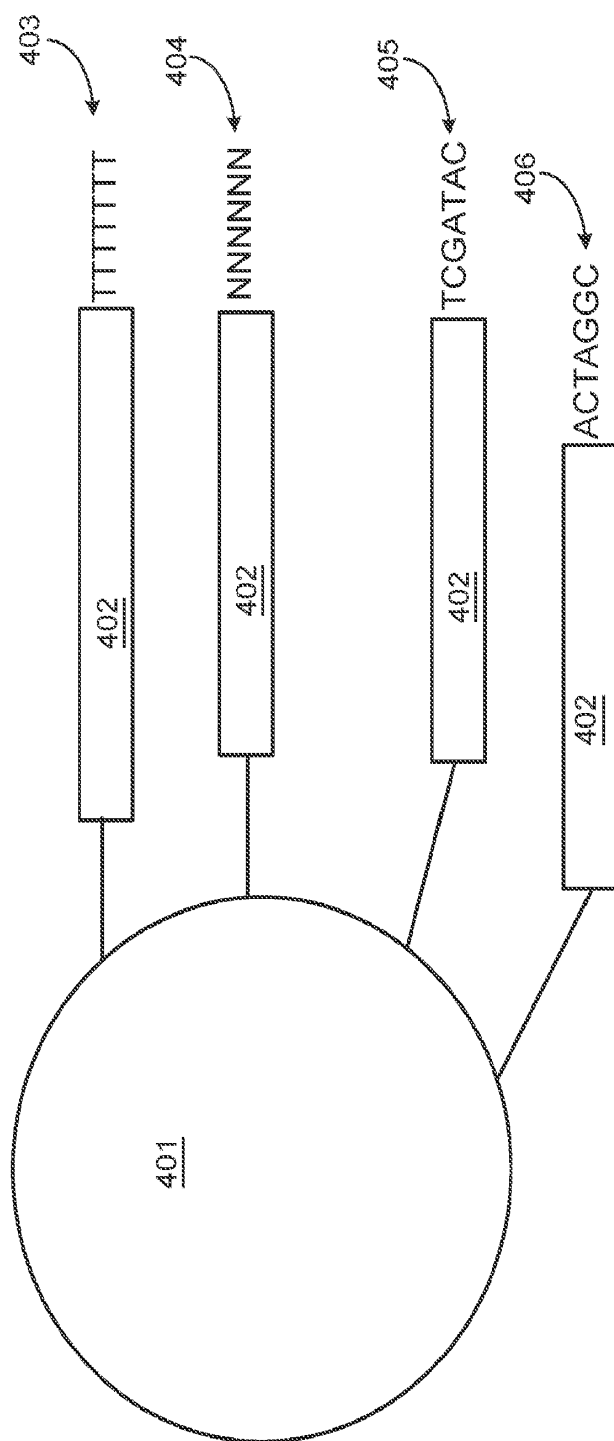


FIG. 4

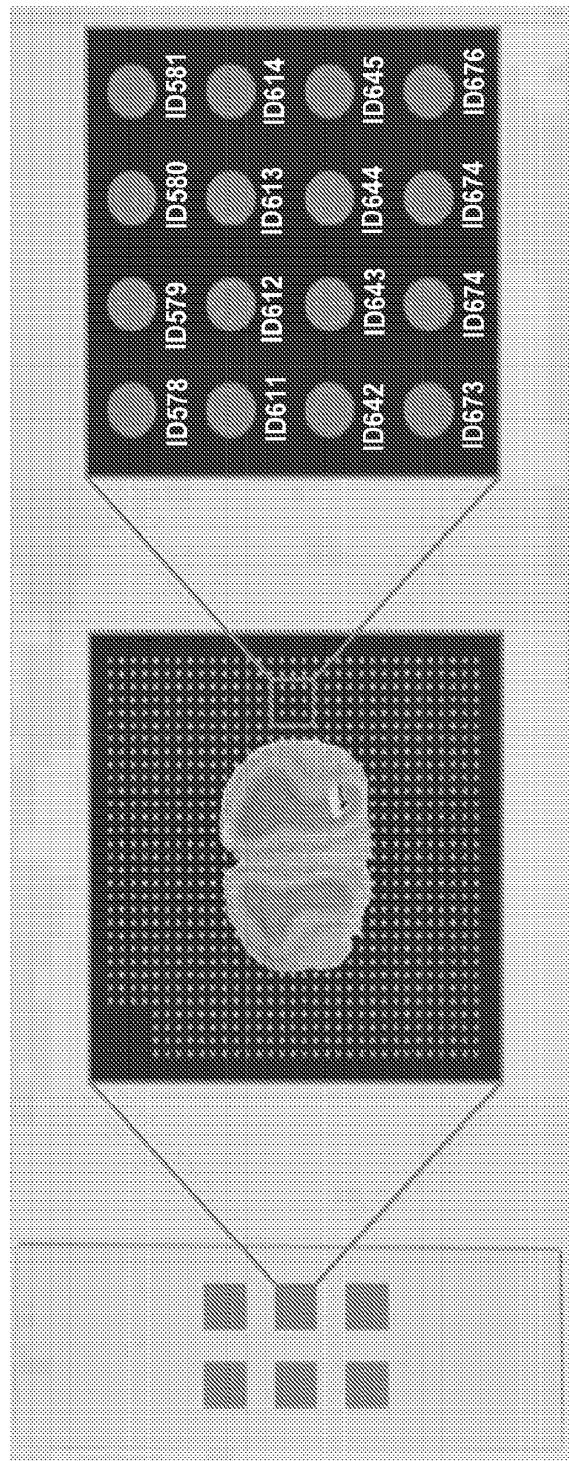


FIG. 5

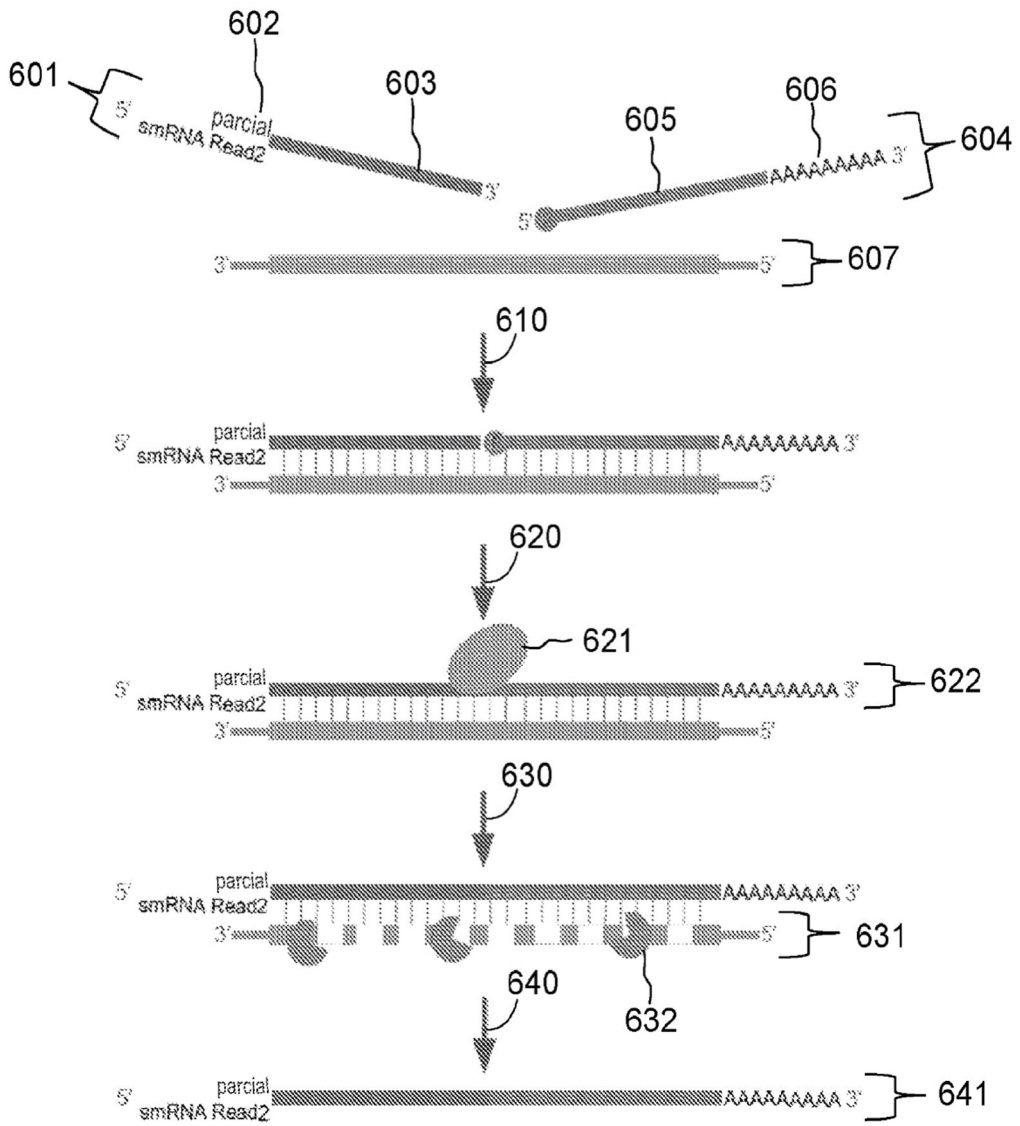


FIG. 6

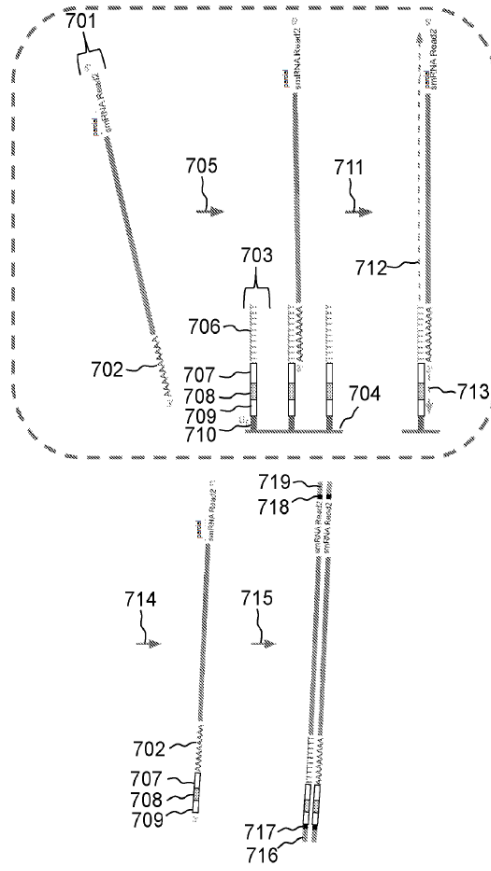


FIG. 7

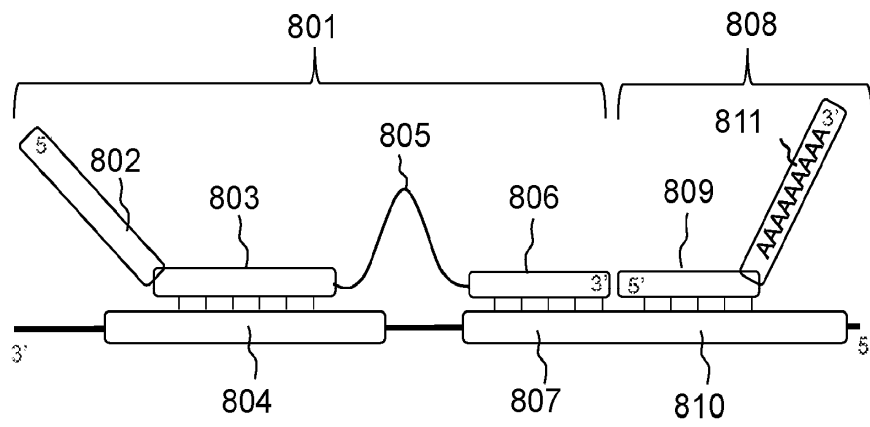


FIG. 8

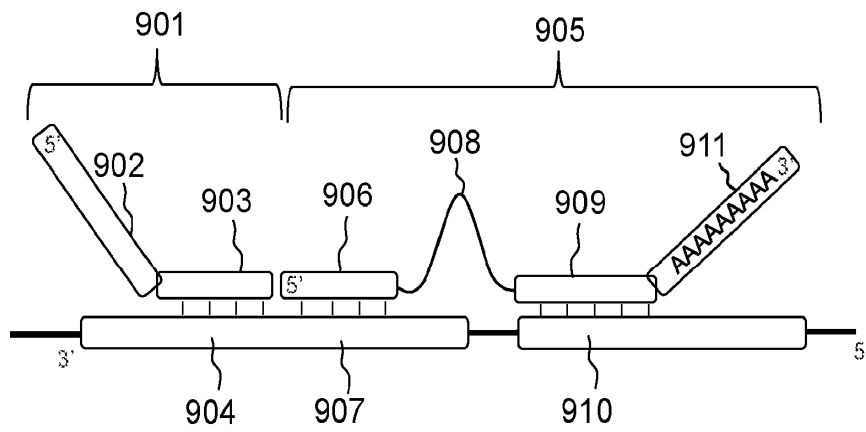


FIG. 9

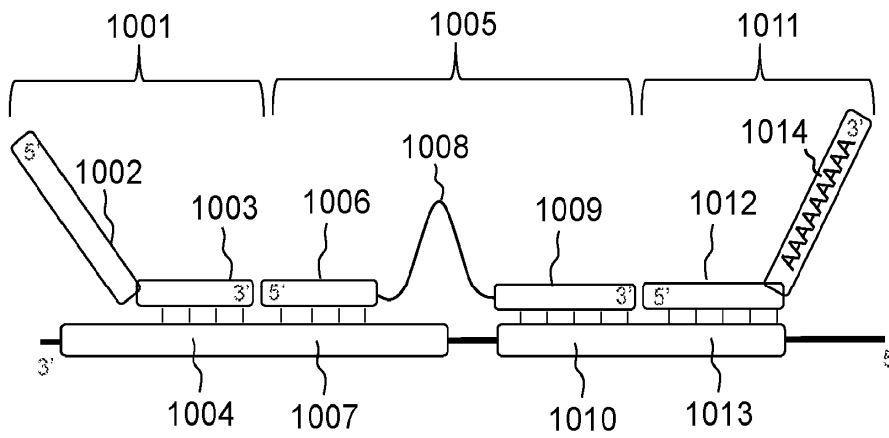


FIG. 10

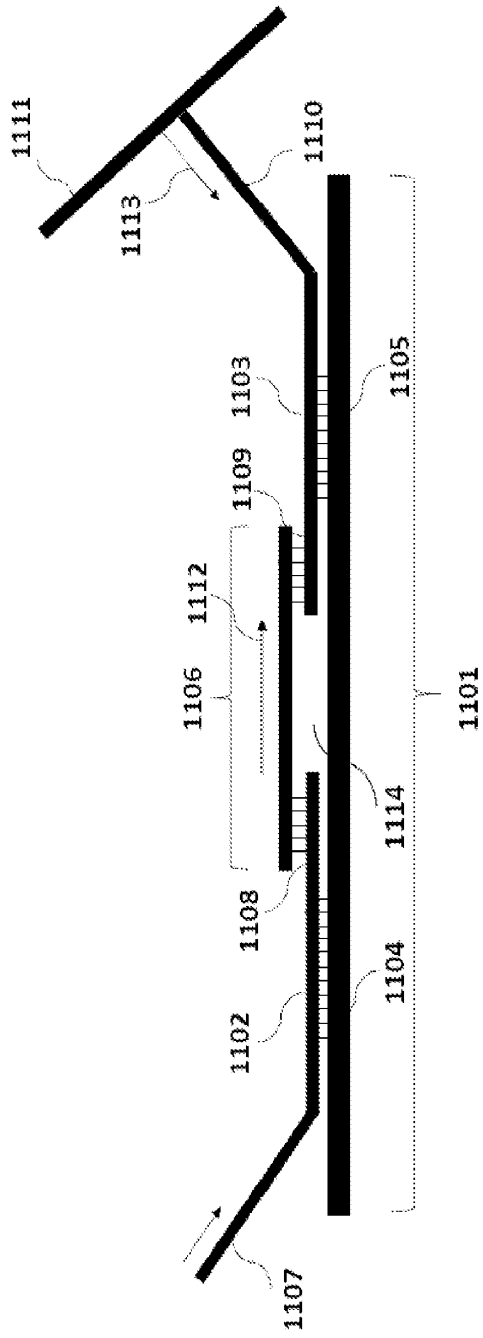


FIG. 11

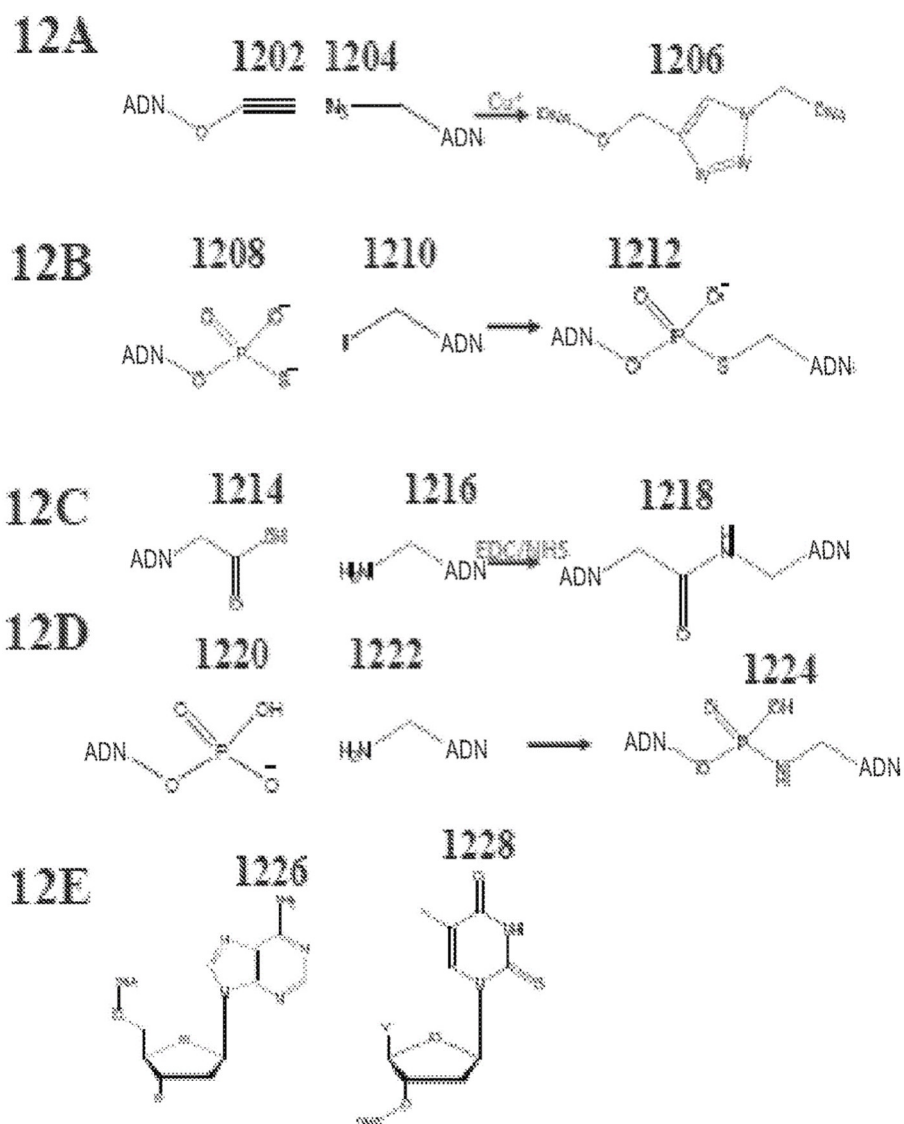


FIG. 12

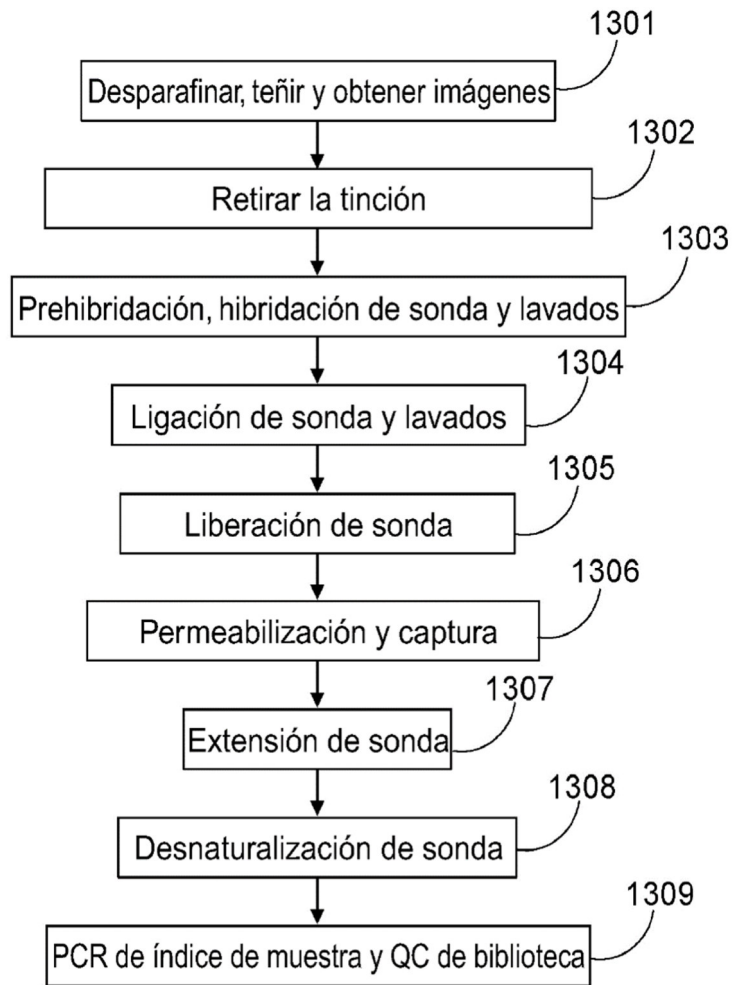


FIG. 13

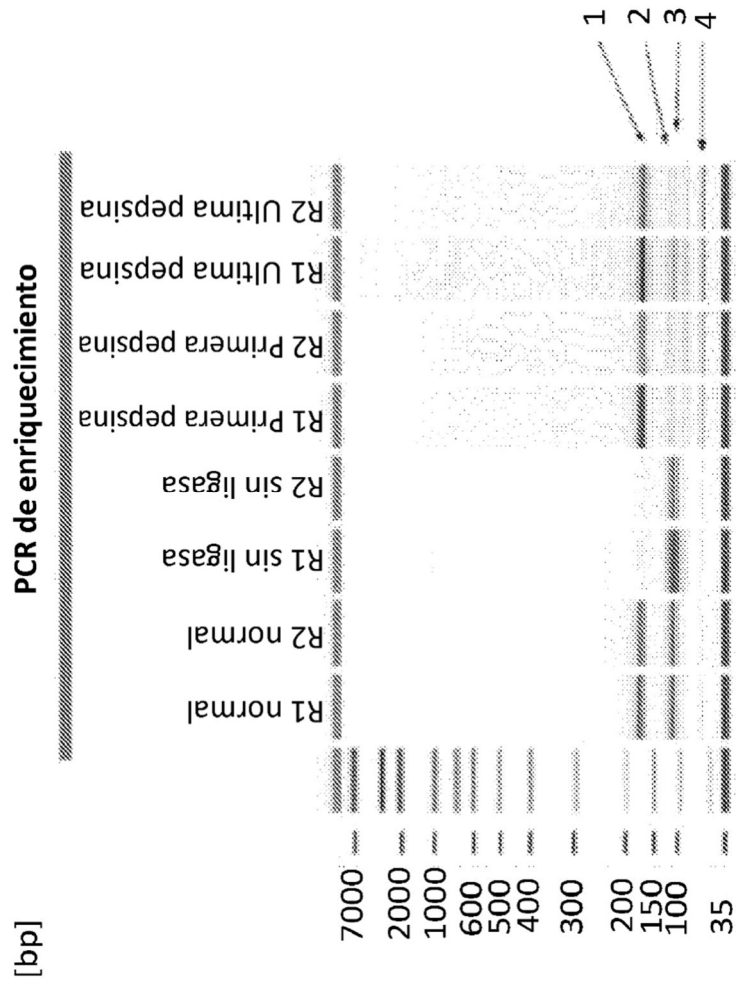
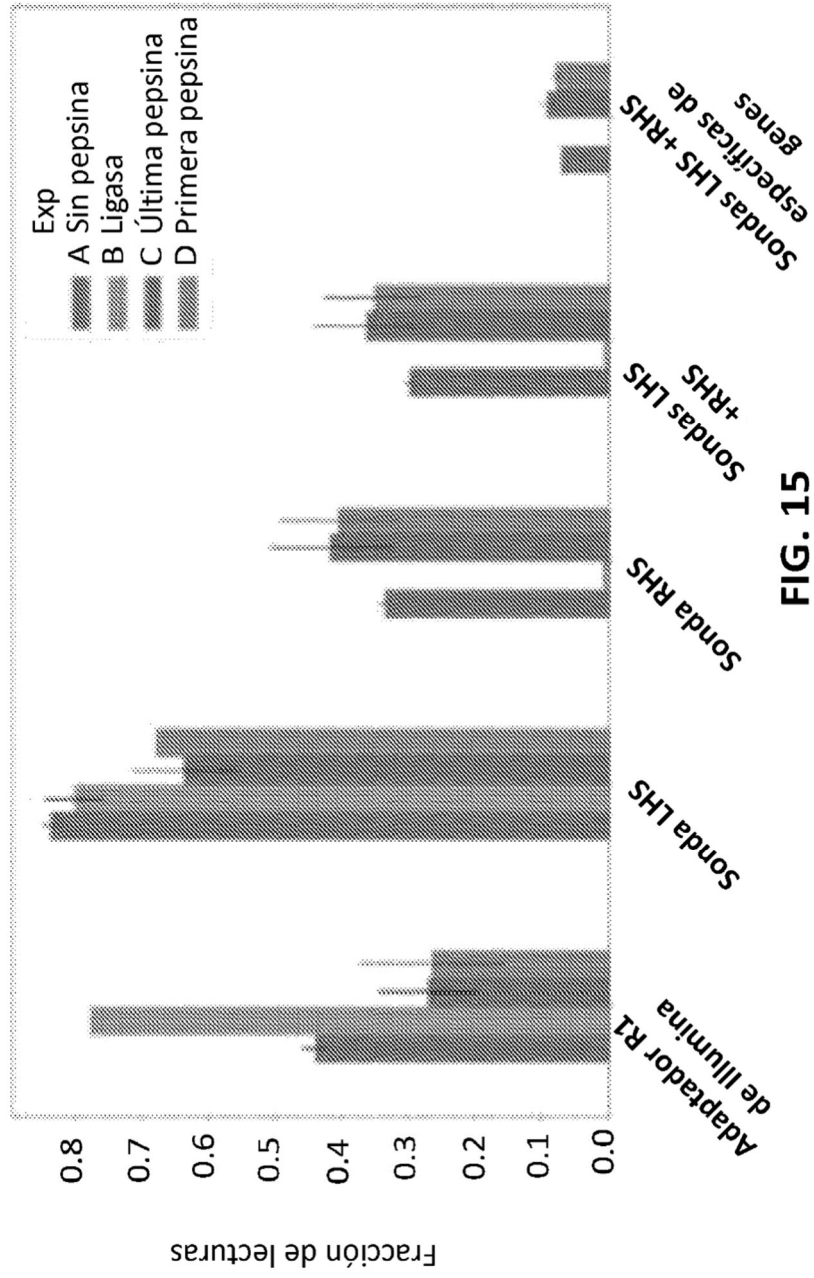


FIG. 14



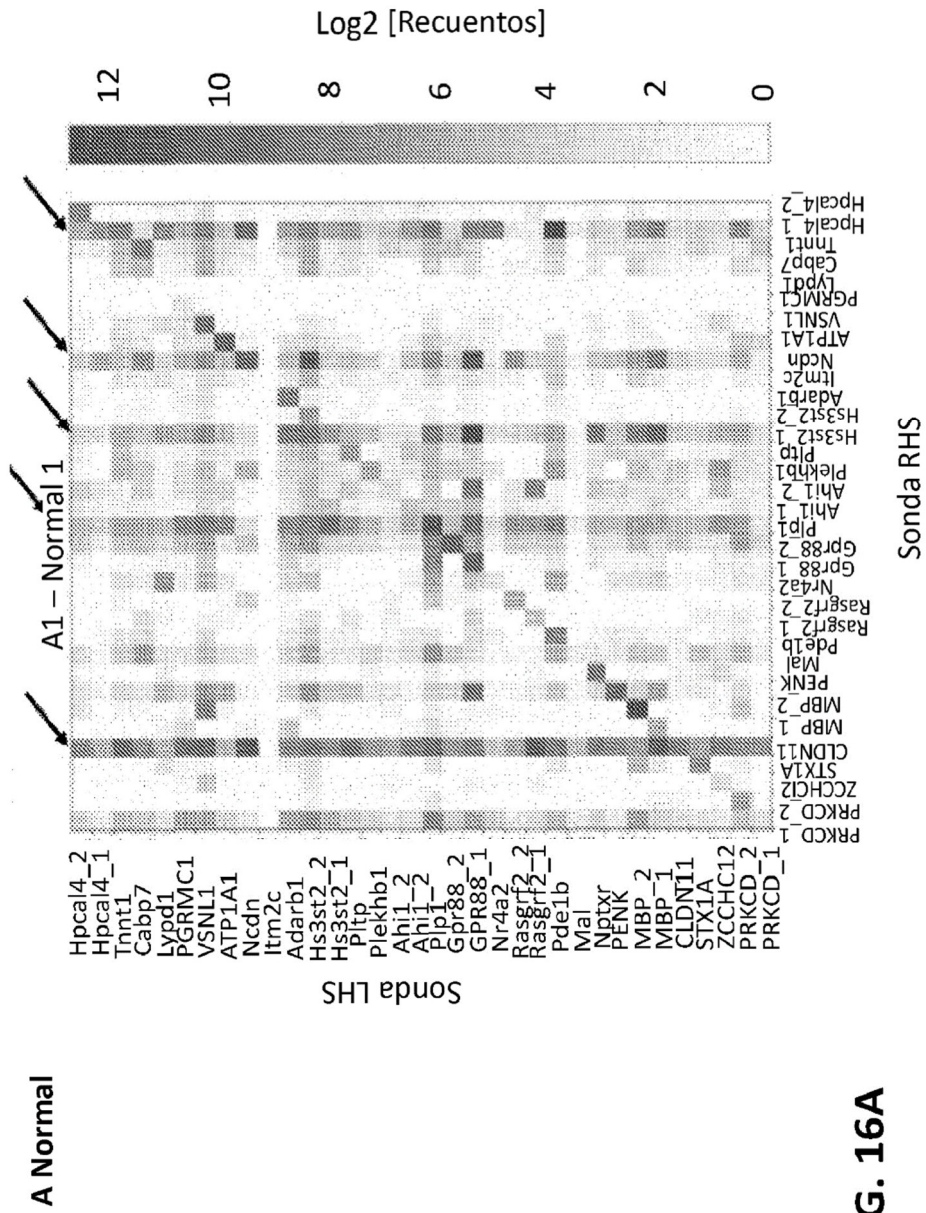


FIG. 16A

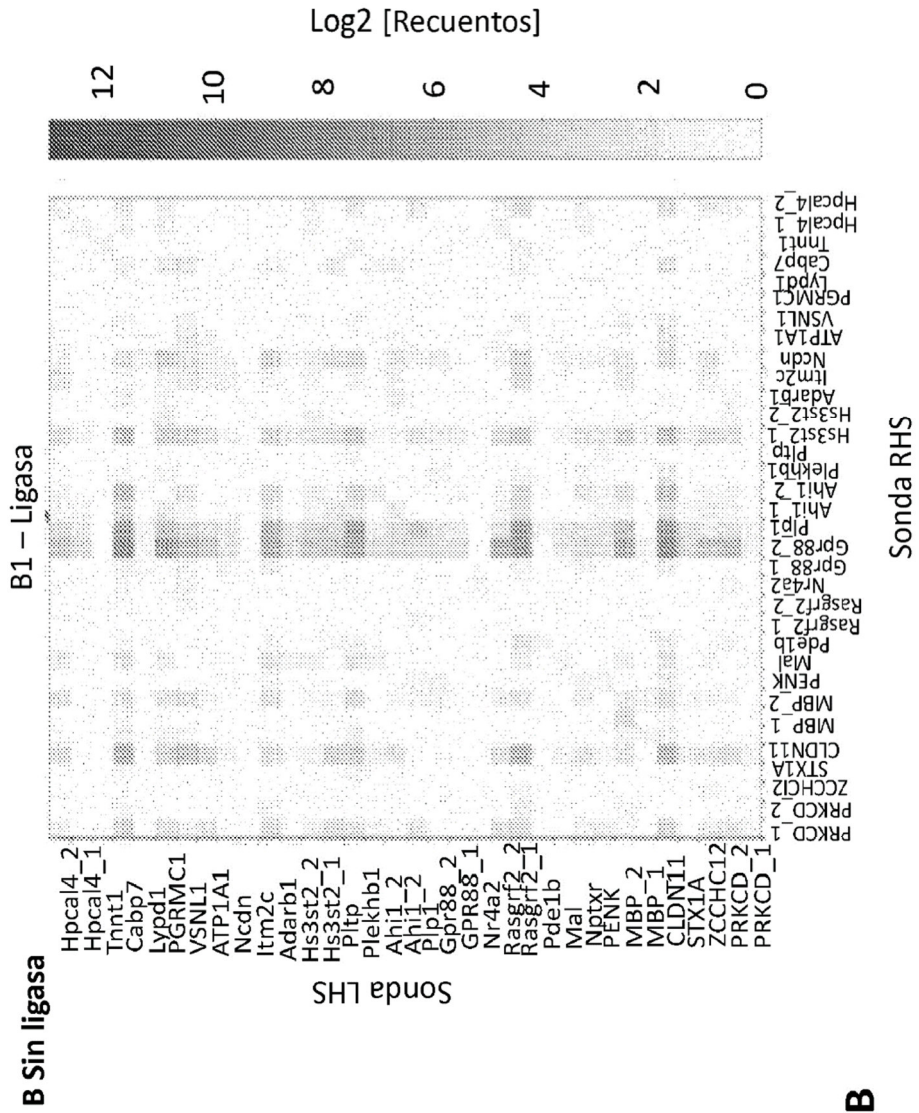


FIG. 16B

Bajo Alto
Nivel de expresión

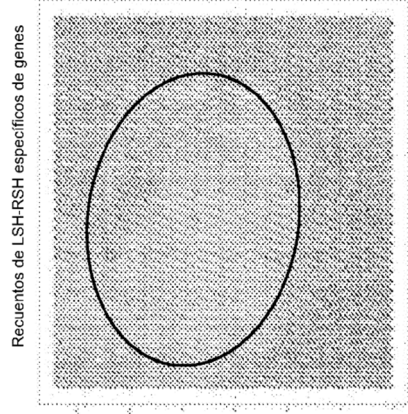


FIG. 17C

Bajo Alto
Nivel de expresión

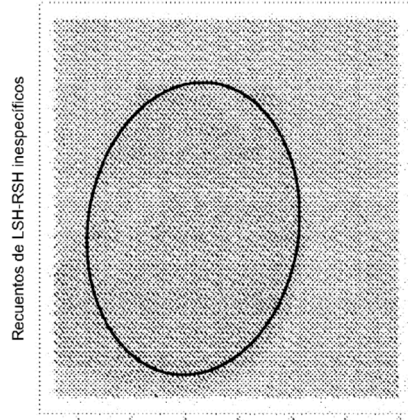


FIG. 17B

Bajo Alto
Nivel de expresión

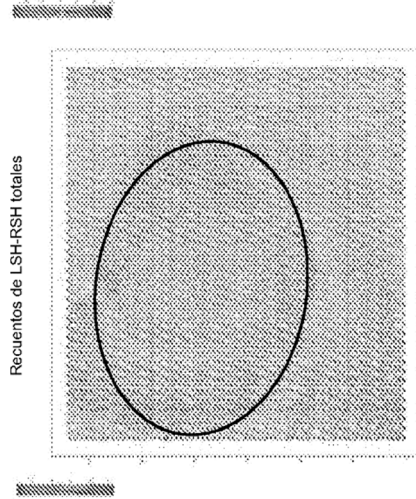
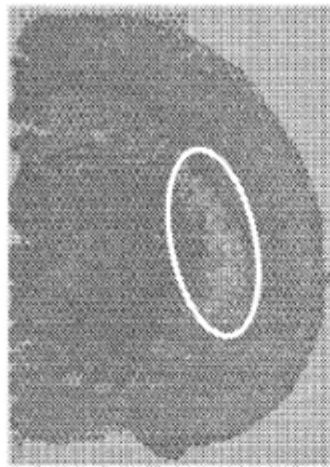


FIG. 17A

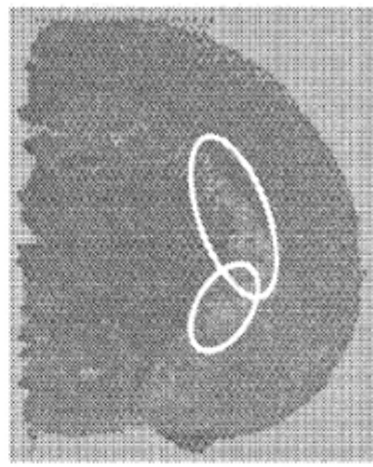


Grp88

Bajo Alto

Nivel de expresión

FIG. 18A



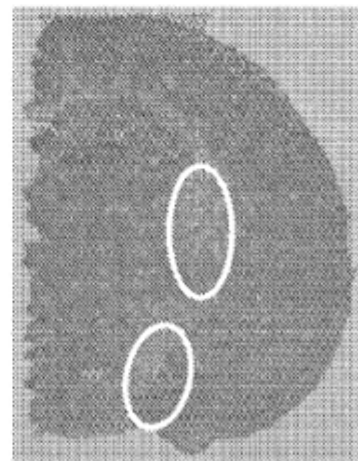
Penk

Bajo Alto

Nivel de expresión

FIG. 18B

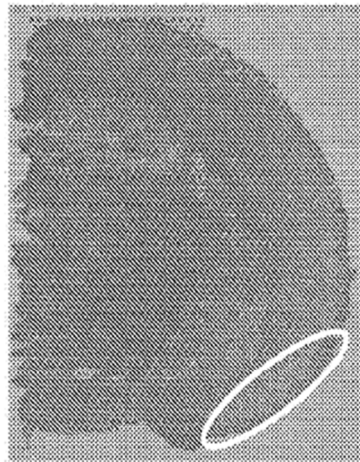
FIG. 18C



Plp1

Bajo Alto

Nivel de expresión



Nptrx

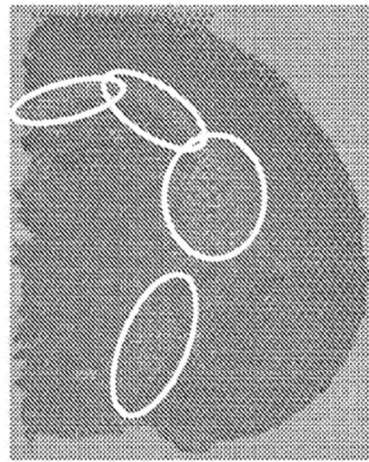
Bajo

Alto



Nivel de expresión

FIG. 18D



Mbp2

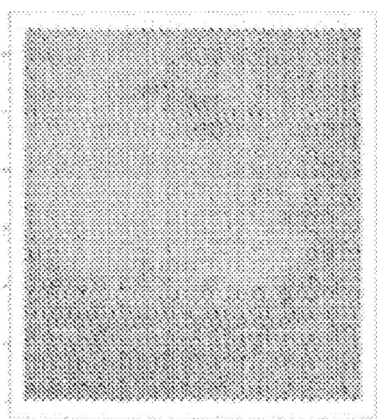
Bajo

Alto



Nivel de expresión

FIG. 18E



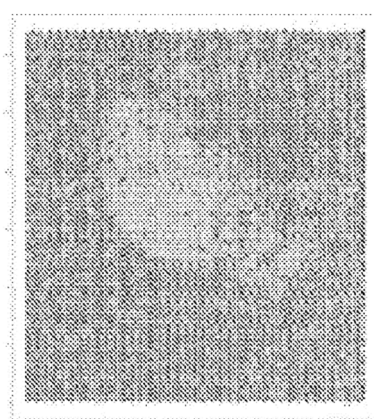
Todas las sondas LHS-RHS específicas

Bajo Alto



Nivel de expresión

FIG. 19A



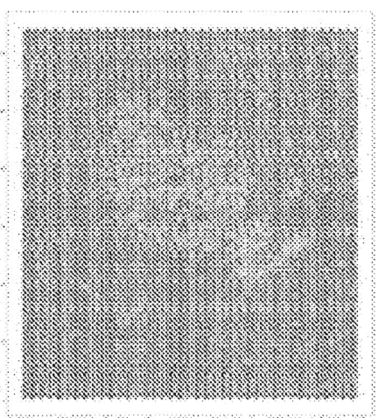
Grp88

Bajo Alto



Nivel de expresión

FIG. 19B



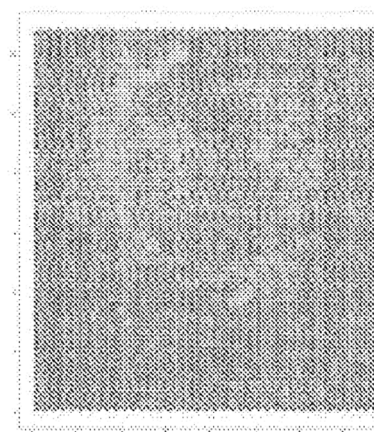
Penk

Bajo Alto



Nivel de expresión

FIG. 19C



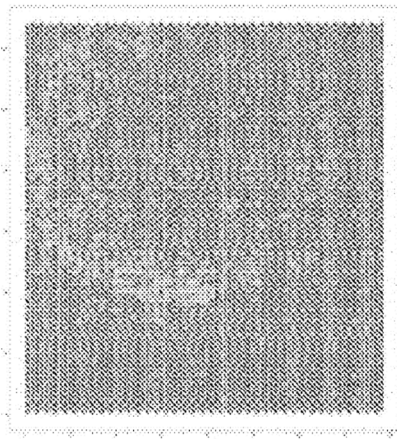
Pip1

Bajo Alto



Nivel de expresión

FIG. 19D



Nptrx

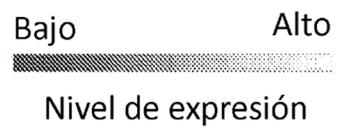
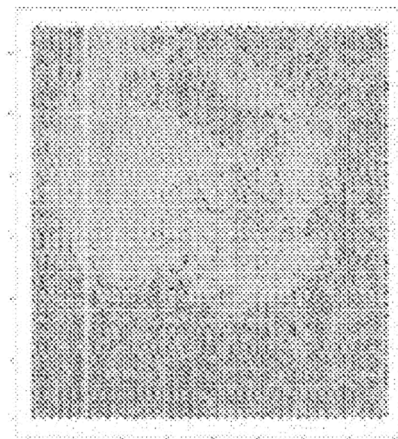


FIG. 19E



Mbp2



FIG. 19F

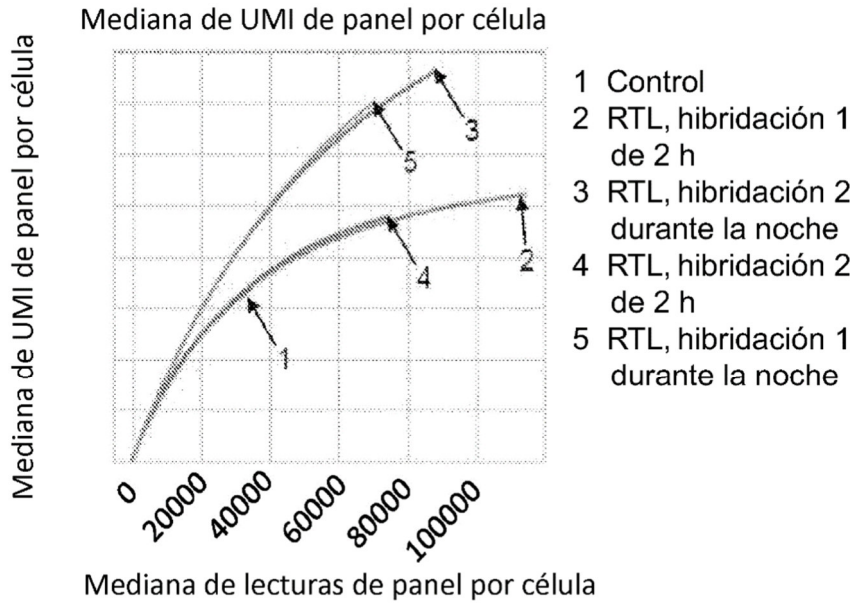


FIG. 20A

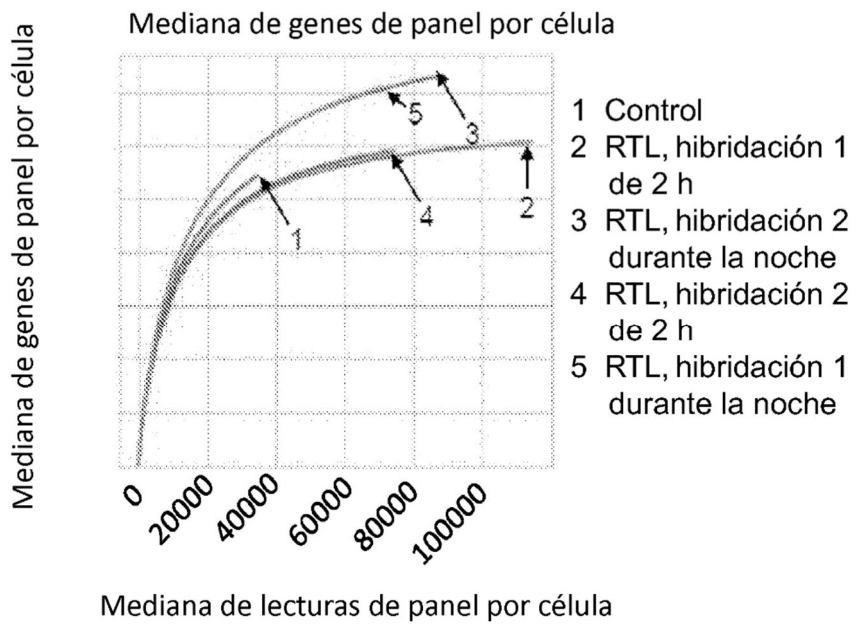


FIG. 20B

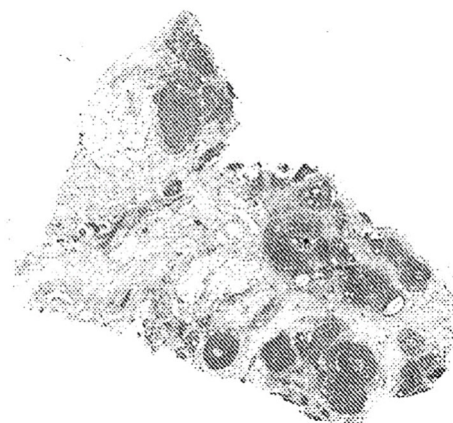


FIG. 21A

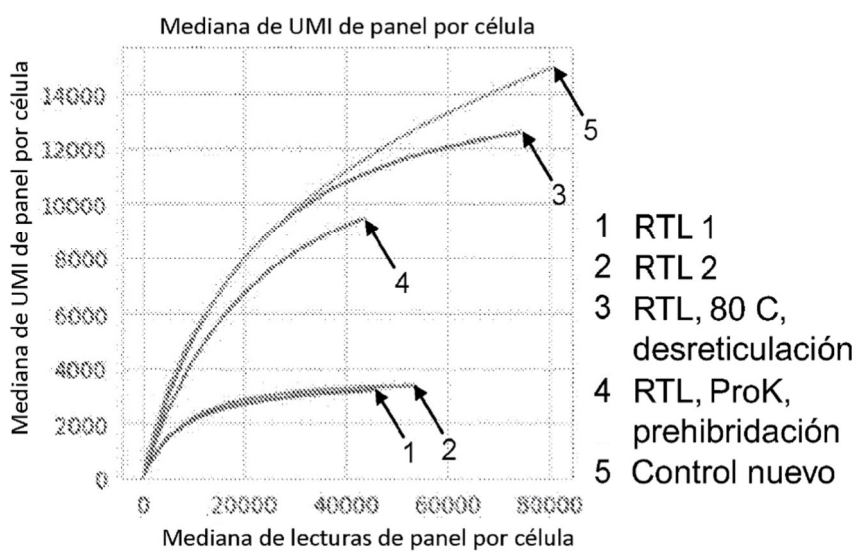


FIG. 21B

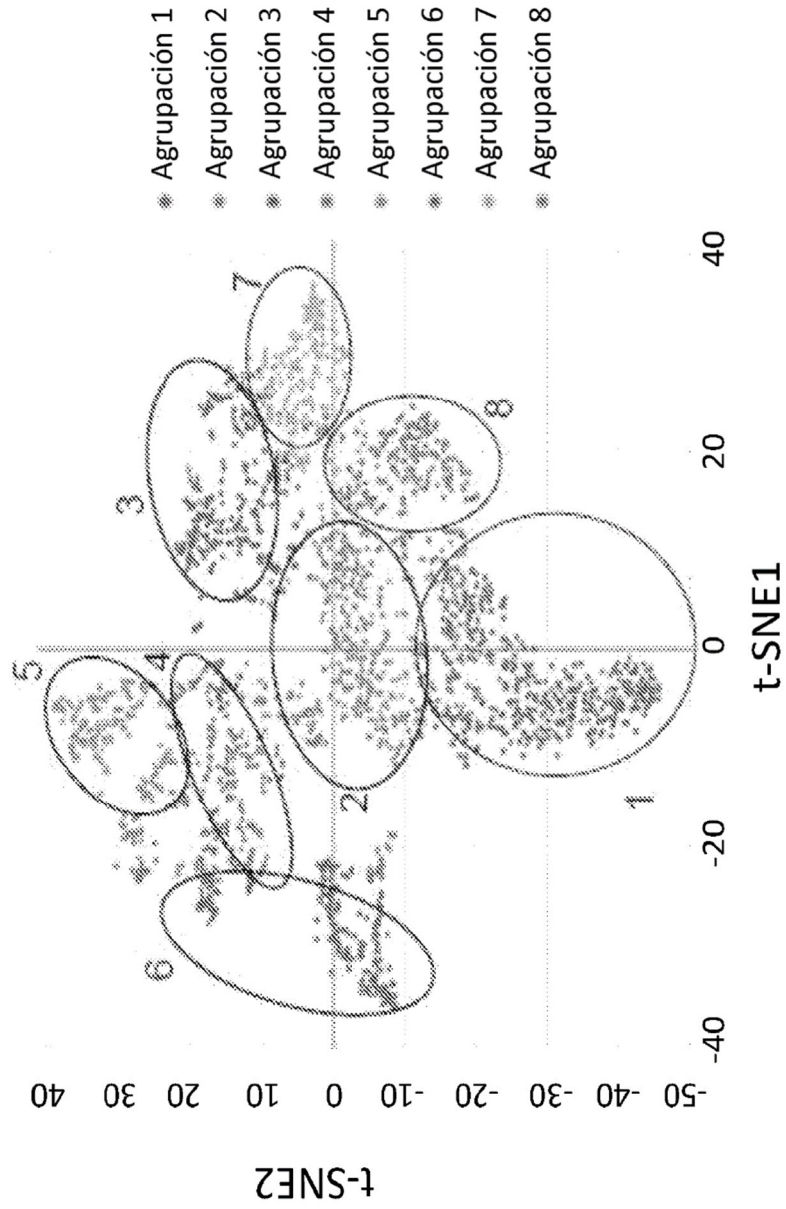


FIG. 21C

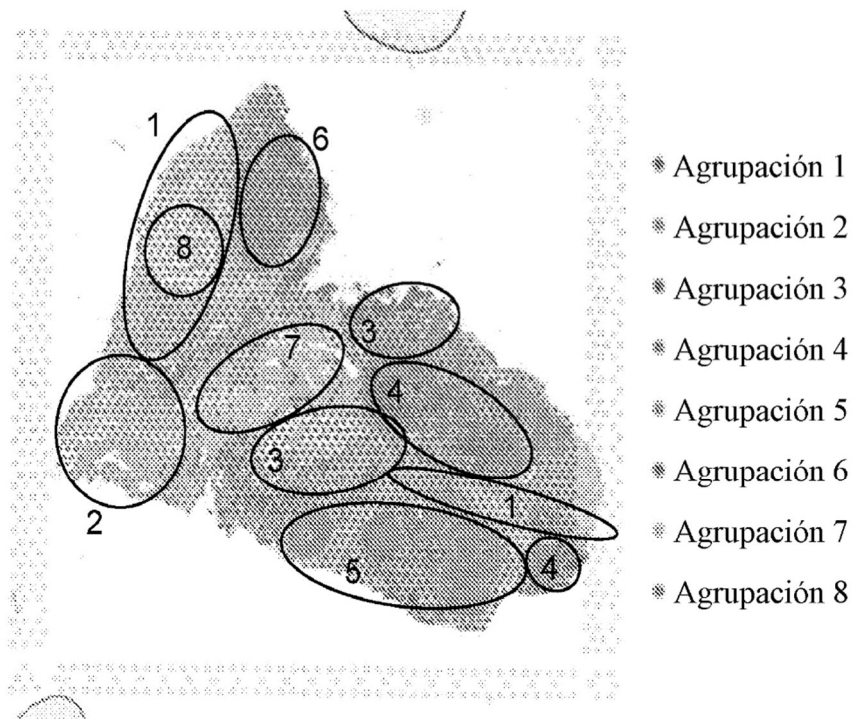
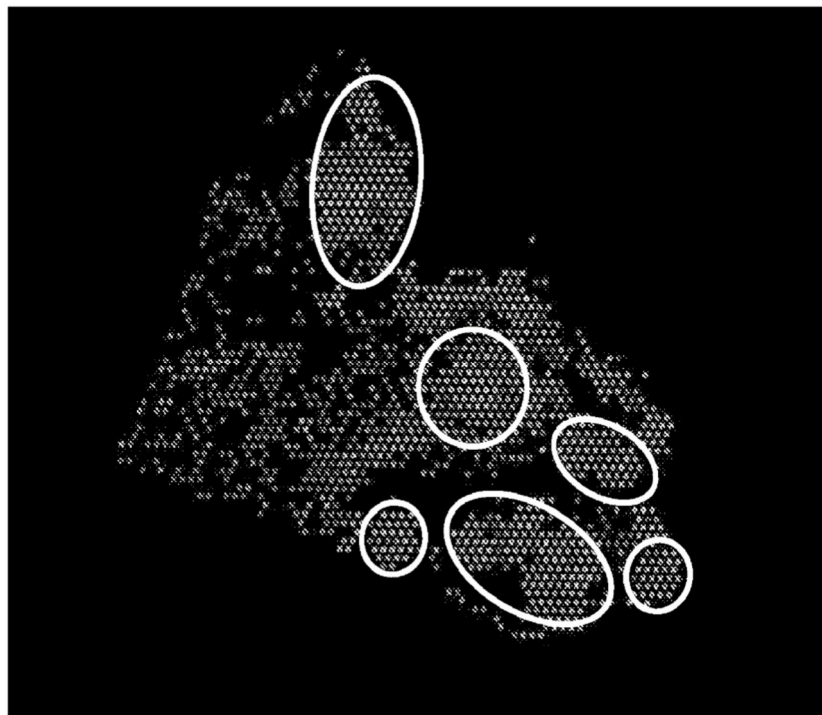


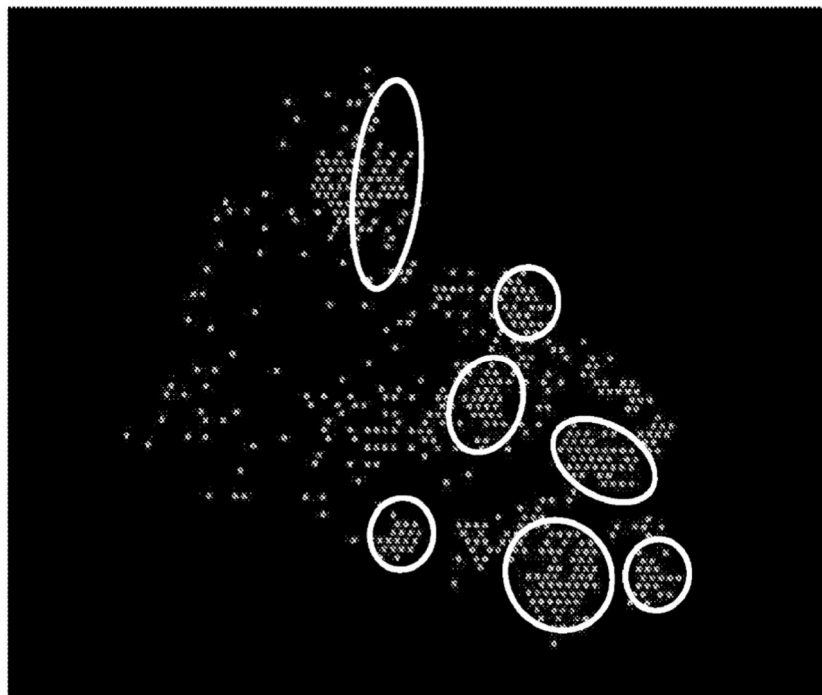
FIG. 21D



ESR1

Bajo  Alto
Nivel de expresión

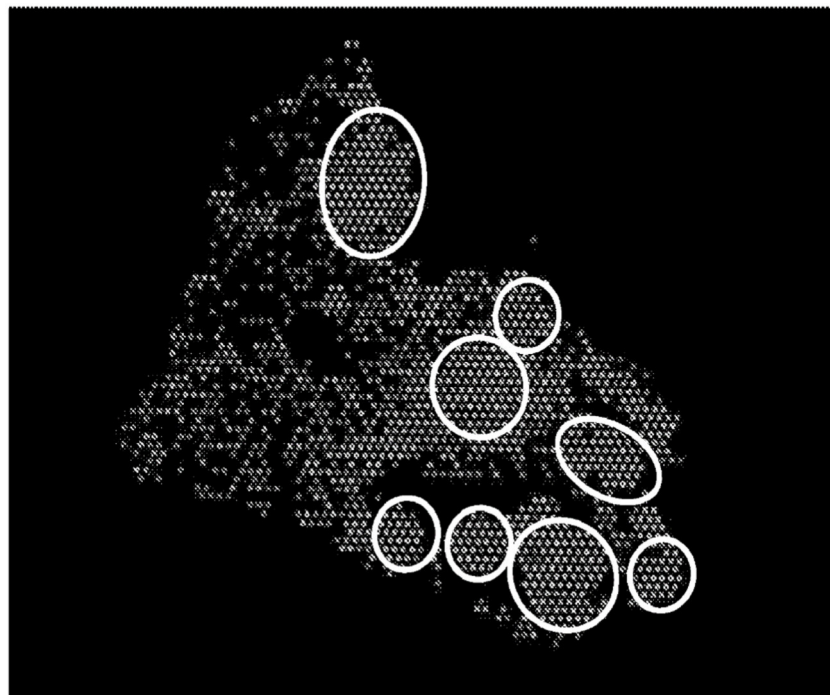
FIG. 21E



PGR

Bajo Alto
Nivel de expresión

FIG. 21F



ERBB2 / HER2



FIG. 21G

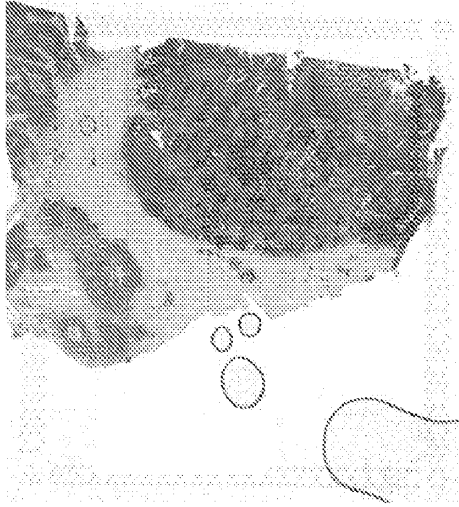


FIG. 22A

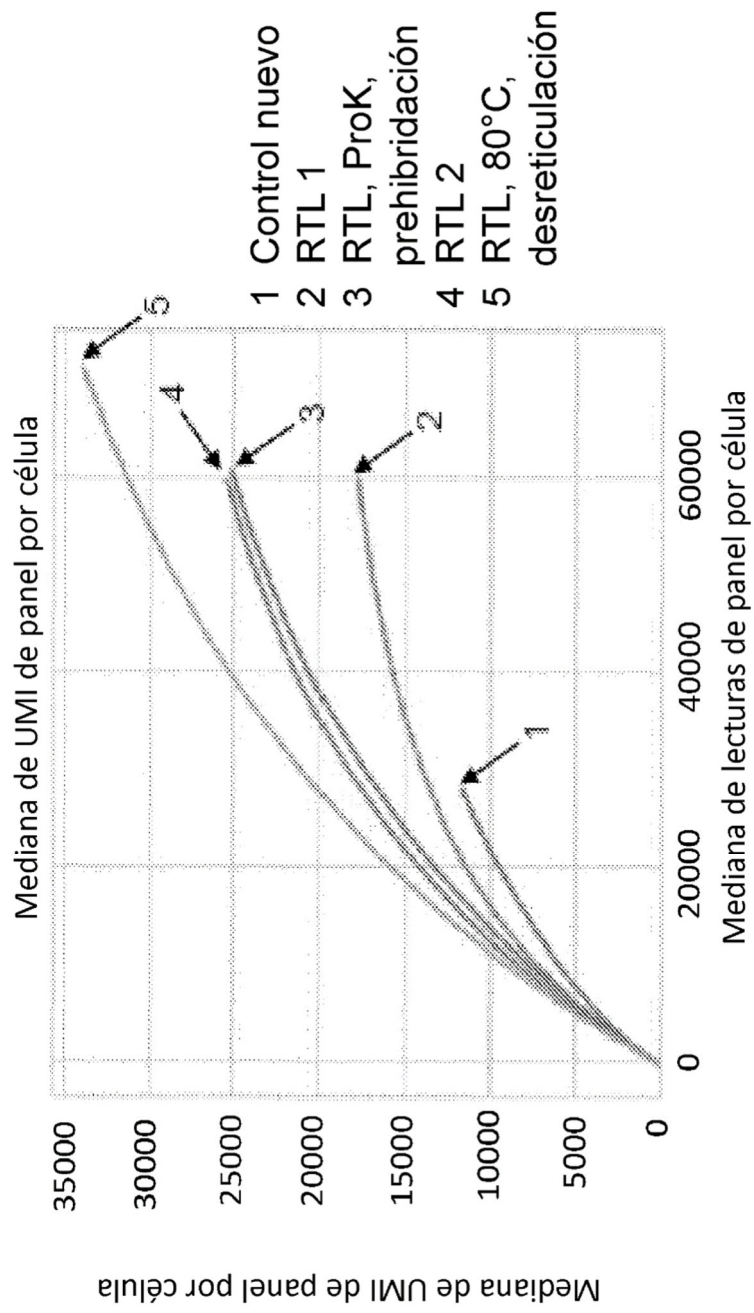


FIG. 22B

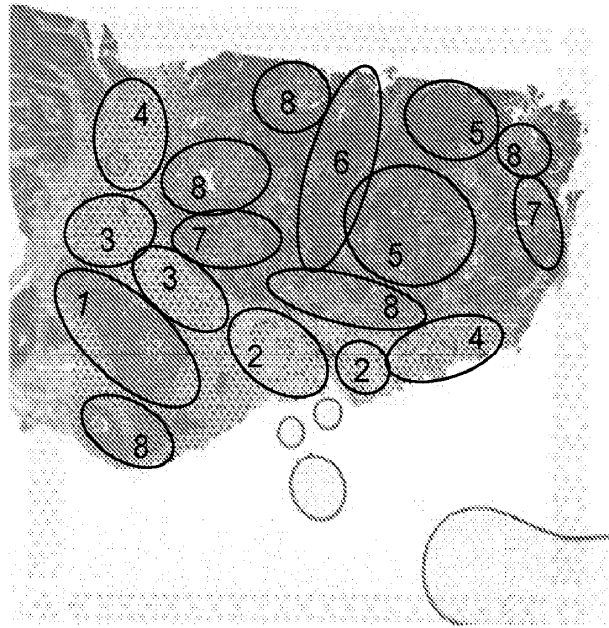


FIG. 22C

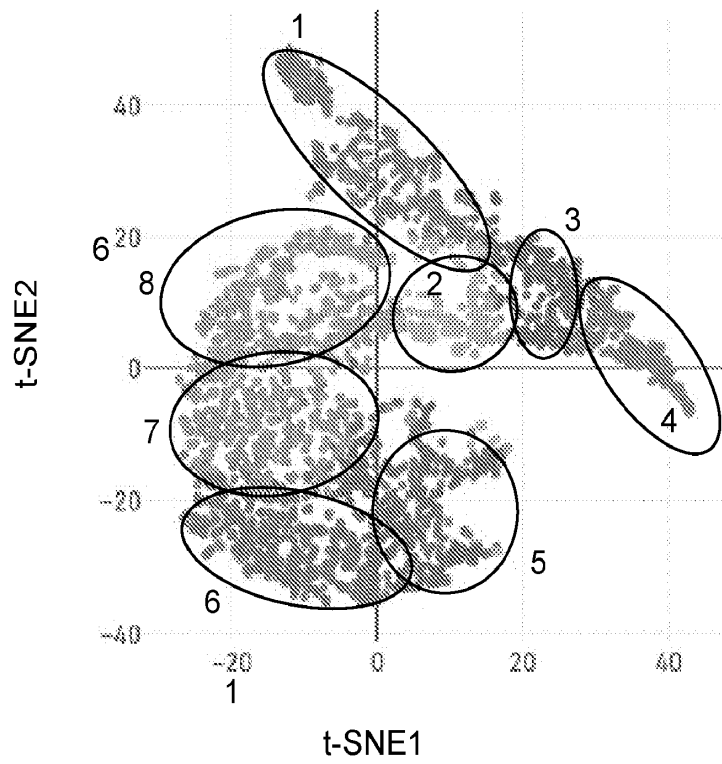


FIG. 22D

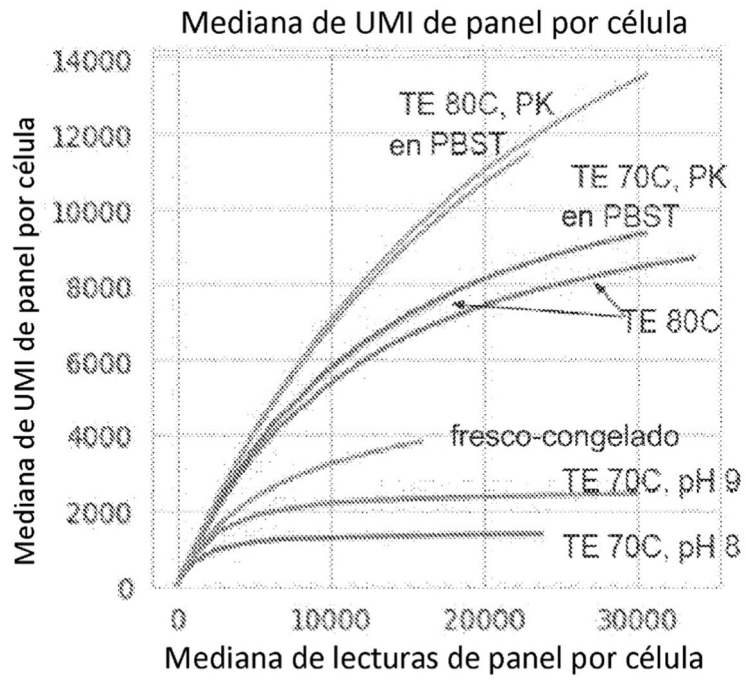
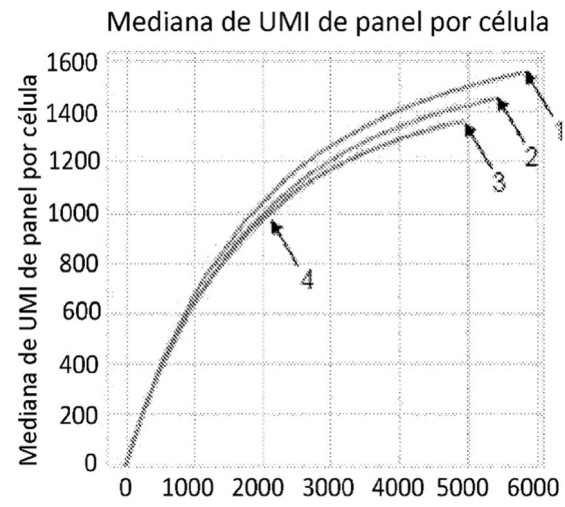
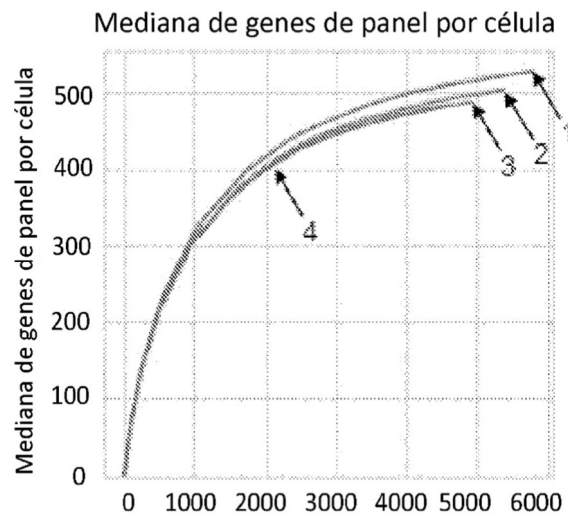


FIG. 23



Mediana de lecturas de panel por célula



Mediana de lecturas de panel por célula

FIG. 24

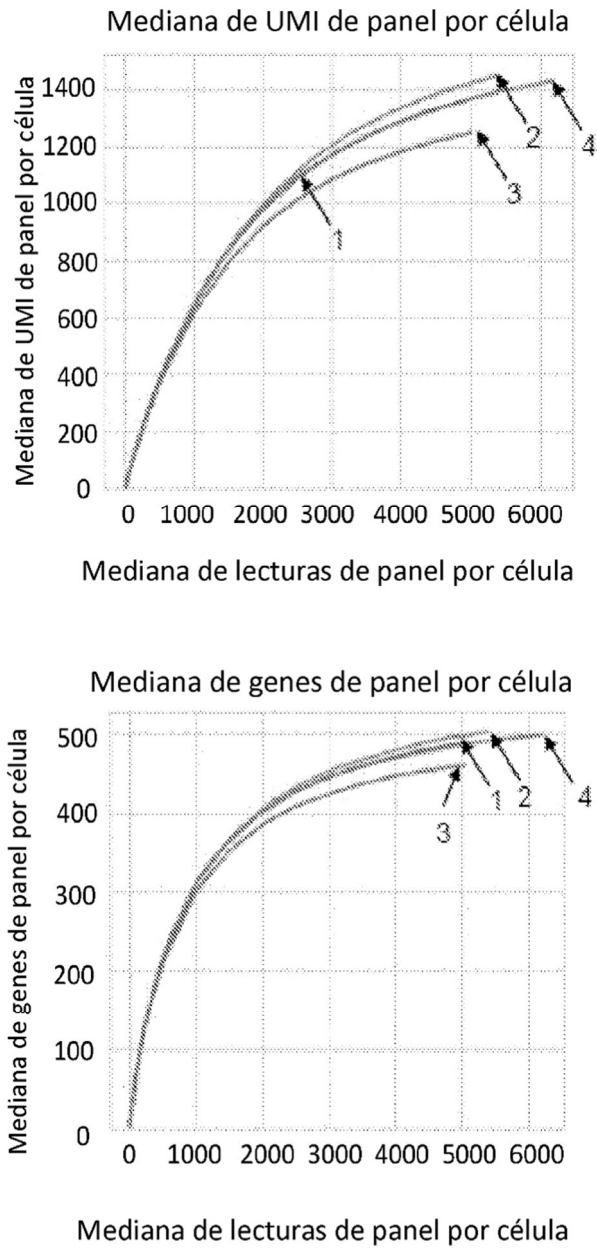


FIG. 25