

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 420**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6841** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2020** E 23157353 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2024** EP 4219754

54 Título: **Métodos para el análisis espacial mediante el uso de la ligazón con plantilla 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:  
16.10.2024

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;  
BAVA, FELICE ALESSIO;  
KATIRAE, LAYLA y  
GALONSKA, CHRISTINA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 982 420 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 mediante el uso de la ligazón con plantilla de ARN

### 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para detectar un analito de interés para interrogar la expresión génica espacial en una muestra mediante el uso de la ligazón con plantilla de ARN.

Antecedentes

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

15 La heterogeneidad espacial se ha estudiado previamente mediante el uso de técnicas que típicamente proporcionan datos para un puñado de analitos en el contexto de tejido intacto o una porción de un tejido (por ejemplo, sección de tejido), o proporcionan datos significativos de analitos de células aisladas, individuales, pero no proporcionan información con respecto a la posición de las células aisladas de la muestra biológica de origen (por ejemplo, tejido).

20 Generalmente, dirigirse a un analito particular en una muestra biológica utiliza una sonda de captura que se dirige a una secuencia de transcripción común tal como una cola similar al ARNm poli(A). Sin embargo, este enfoque es capaz de detectar un alto número de analitos fuera de la diana. Los métodos tales como la ligazón con plantilla de ARN ofrecen una alternativa a la captura indiscriminante de una secuencia de transcripción común. Véase, por ejemplo, Yeakley, PLoS One, 25;12(5):e0178302 (2017). Sin embargo, aún existe la necesidad de desarrollar una alternativa para la captura de secuencia de transcripción común (por ejemplo, cola similar al ARNm poli(A)) de analitos diana que sea capaz de detectar un analito(s) en un transcriptoma completo mientras proporciona información sobre la ubicación espacial y la abundancia de un analito diana.

25

Resumen

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

30 La captura de ARN dirigido es una alternativa atractiva a la captura de ARNm poli(A) para interrogar la expresión génica espacial en una muestra (por ejemplo, un tejido FFPE). En comparación con la captura de ARNm poli(A), la captura de ARN dirigido como se describe en la presente descripción se ve menos afectada por la degradación del ARN asociada con la fijación de FFPE en comparación con los métodos dependientes de la captura de oligo-dT y la transcripción inversa del ARNm. La captura de ARN dirigido adicional como se describe en la presente descripción permite la medición sensible de genes específicos de interés que de cualquier otra manera podrían omitirse con un enfoque transcriptómico completo. La captura de ARN dirigido 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 descritos en la presente  
35 descripción, pueden determinarse la ubicación y la abundancia de las dianas de ARN.

40 En un aspecto, esta descripción presenta un método para determinar una 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, 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 la sonda de captura; (c) hibridar la primera sonda y la segunda sonda con el analito; (d) generar un producto de ligazón al ligar la primera sonda y la segunda sonda; (e) liberar el producto ligado del analito; (f) hibridar el producto de la ligazón al dominio de captura; y (g) determinar (i) toda o una parte de la secuencia del producto de ligazón unido al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) toda 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

determinar la abundancia y ubicación del analito en la muestra biológica. En algunos casos, los métodos incluyen determinar la abundancia de un analito en una ubicación en la muestra biológica.

En algunas modalidades, la primera sonda y la segunda sonda son sustancialmente complementarias a las 5 secuencias adyacentes del analito. En algunas modalidades, la primera sonda y la segunda sonda hibridan con secuencias que no son adyacentes entre sí en el analito.

En algunas modalidades, 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 modalidades, hibridar la primera sonda y la segunda sonda con el analito se realiza a una primera temperatura. En algunas modalidades, hibridar la tercera sonda con la primera 10 sonda y la segunda sonda se realiza a una segunda temperatura. En algunas modalidades, la primera temperatura es una temperatura más alta que la segunda temperatura. En algunas modalidades, la primera temperatura es de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 75 °C, de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, la segunda temperatura es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 35 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, o de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C. En algunas modalidades, la primera sonda se extiende con una ADN polimerasa, al rellenar de esta manera un espacio entre la primera 15 sonda y la segunda sonda y al generar una primera sonda extendida.

En algunas modalidades, la primera sonda incluye una secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito. En algunas modalidades, la segunda sonda incluye además: (i) una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana del analito; (ii) una secuencia enlazadora; (iii) una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a una tercera secuencia diana del analito; y (iv) un dominio de captura de la sonda de captura que es capaz de unirse a un 20 dominio de captura de una sonda de captura. En algunas modalidades, la primera secuencia diana del analito es directamente adyacente a la segunda secuencia diana del analito. En algunas modalidades, la segunda secuencia diana no es directamente adyacente a la tercera secuencia diana en el analito. En algunas modalidades, 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 al analito.

En algunas modalidades, la segunda sonda incluye una secuencia que es sustancialmente complementaria a 25 una tercera secuencia diana del analito. En algunas modalidades, la primera sonda incluye: (i) una primera secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito; (ii) una secuencia enlazadora; y (iii) segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a la segunda secuencia diana del analito. En algunas modalidades, la segunda secuencia diana es directamente adyacente a la tercera secuencia diana. En algunas modalidades, la primera secuencia diana no es directamente adyacente a la segunda secuencia diana en el analito. En algunas modalidades, la primera secuencia diana y la segunda secuencia diana son (i) en diferentes exones del analito o (ii) se ubican dentro del mismo exón pero 30 no son directamente adyacentes al analito.

En algunas modalidades, la secuencia enlazadora incluye un total de aproximadamente 1 nucleótido a aproximadamente 100 nucleótidos. En algunas modalidades, el enlazador incluye además una secuencia de código de barras que sirve como un proxy para identificar el analito.

En algunas modalidades, la primera sonda incluye al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3', 35 y donde la segunda sonda incluye un nucleótido fosforilado en el extremo 5'.

En algunas modalidades, la generación de un producto de ligazón incluye ligar (i) la primera sonda a la segunda sonda o (ii) la primera sonda extendida a la segunda sonda mediante el uso de ligazón enzimática o ligazón química, donde la ligazón enzimática utiliza una ligasa. En algunas modalidades, la ligasa es una o más de una ligasa de ARN de T4 (Rnl2), una ligasa splintR, una ligasa de ADN de una sola hebra o una ligasa de ADN de T4.

40 En algunas modalidades, la segunda sonda incluye un grupo fosfato preadenilado en su extremo 5', y donde la primera sonda incluye al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3'. En algunas modalidades, la etapa de generar un producto de ligazón incluye ligar un extremo 3' de la primera sonda al extremo 5' de la segunda sonda mediante el uso de una ligasa que no requiere trifosfato de adenosina para la actividad de la ligasa. En algunas modalidades, la ligasa se selecciona del grupo que consiste en: 5' AppADN/ARN ligasa termoestable, ligasa de ARN T4 truncada 2, ligasa de ARN T4 truncada 2 K227Q, ligasa de ARN T4 truncada 2 KQ, ADN ligasa del virus PBCV-1 de la clorella, o cualquiera de sus combinaciones.

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

5 En algunas modalidades, el método incluye además proporcionar un resto de bloqueo del dominio de captura de la sonda de captura interactúa con el dominio de captura de la sonda de captura. En algunas modalidades, el método incluye además liberar el resto de bloqueo del dominio de captura de la sonda de captura del dominio de captura de la sonda de captura antes de la etapa (f). En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura incluye una secuencia poliadenilada (poli(A)) o un complemento del mismo. En algunas modalidades, el resto de bloqueo del dominio de captura de la sonda de captura incluye una secuencia de poliuridina, una secuencia de politimidina o ambas. En algunas modalidades, la liberación de la secuencia de poliuridina de la secuencia poli(A) incluye desnaturalizar el producto de ligazón o poner en contacto el producto de ligazón con una endonucleasa, exonucleasa o ribonucleasa. En algunas modalidades, el dominio de captura  
10 de la sonda de captura incluye una secuencia que es complementaria a todo o una porción del dominio de captura de la sonda de captura. En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura incluye una secuencia degenerada.

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

15 En algunas modalidades, la tercera sonda es una sonda de ADN.

En algunas modalidades, el resto de bloqueo del dominio de captura de la sonda de captura es una sonda de ADN.

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

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

25 En algunas modalidades, la muestra biológica es una muestra de tejido. En algunas modalidades, la muestra de tejido es una muestra de tejido fijada en formalina y embebida en parafina (FFPE), una muestra de tejido fresco o congelado. En algunas modalidades, la muestra de tejido es la muestra de tejido FFPE, y la muestra de tejido se desconecta. En algunas modalidades, la muestra biológica se tiñó previamente. En algunas modalidades, la muestra biológica se tiñó previamente mediante el uso de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. En algunas modalidades, la muestra biológica se tiñó previamente mediante el uso de hematoxilina y eosina.

30 En algunas modalidades, el método incluye además poner en contacto la muestra biológica con un agente de permeabilización, donde el agente de permeabilización se selecciona de un solvente orgánico, un detergente, y una enzima, o sus combinaciones. En algunas modalidades, el agente de permeabilización se selecciona del grupo que consiste en: una endopeptidasa, una proteasa dodecilsulfato de sodio (SDS), polietilenglicol éter de terc-octilfenilo, polisorbato 80 y polisorbato 20, N-lauroilsarcosina solución salina de sodio, saponina, Tritón X-100™ y Tween-20™. En algunas modalidades, la endopeptidasa es pepsina o proteinasa K.

35 En algunas modalidades, el método incluye además, antes de la etapa (a), fijar la muestra biológica. En algunas modalidades, la etapa de fijar la muestra biológica se realiza mediante el uso de uno o ambos de metanol y acetona.

En algunas modalidades, el analito incluye ARN. En algunas modalidades, el ARN es un ARNm.

40 En algunas modalidades, la etapa de determinación incluye amplificar todo o parte del producto de ligazón unido específicamente al dominio de captura. En algunas modalidades, un producto amplificador incluye (i) toda o parte de la secuencia del producto de ligazón unido específicamente al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) toda o una parte de la secuencia del código de barras espacial, o un complemento del mismo. En algunas modalidades, la etapa de determinación incluye secuenciación. En algunas modalidades, la etapa de secuenciación incluye secuenciación *in situ*, métodos de secuenciación de Sanger, métodos de secuenciación de próxima generación y secuenciación de nanoporos.

En otro aspecto, esta descripción 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 cada una de una primera sonda y una segunda sonda incluye 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 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

En otro aspecto, esta descripción 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 las secuencias adyacentes de un analito, donde la segunda sonda incluye (i) un dominio de captura de la sonda de captura que es capaz de unirse a un dominio de captura de la sonda de captura y (ii) una secuencia enlazadora; (c) una pluralidad de enzimas que incluyen una ribonucleasa y una ligasa; y (d) instrucciones para realizar el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

En otro aspecto, esta descripción 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 las secuencias adyacentes de un analito, donde la primera sonda incluye una secuencia enlazadora, donde la segunda sonda incluye un dominio de captura de la sonda de captura que es capaz de unirse a un dominio de captura de la sonda de captura; (c) una pluralidad de enzimas que incluyen una ribonucleasa y una ligasa; e (d) instrucciones para realizar el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

En algunas modalidades, 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 de la ligasa.

En otro aspecto, esta descripción 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 de sonda y un segundo oligonucleótido de sonda hibridados a un analito y ligados entre sí, donde el primer oligonucleótido de sonda y el segundo oligonucleótido de sonda incluyen cada uno una secuencia que es sustancialmente complementaria a las secuencias adyacentes del analito y donde una de la primera sonda o la segunda sonda incluye un dominio de captura de la sonda de captura.

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

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

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

La forma singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una o más células, que comprenden sus mezclas. "A y/o B" se usa en la presente descripción para incluir todas las siguientes alternativas: "A", "B", "A o B" y "A y B".

Varias modalidades de las características de esta descripción se describen en la presente descripción. Sin embargo, debe entenderse que tales modalidades se proporcionan simplemente a manera de ejemplo, y pueden ocurrir numerosas variaciones, cambios, y sustituciones para los expertos en la técnica.

#### Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos ilustran ciertas modalidades de las características y ventajas de esta descripción. Estas modalidades no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones adjuntas de ninguna manera. Los símbolos de referencia similares en los dibujos indican características similares.

La Figura 1 muestra un flujo de trabajo de análisis espacial ilustrativo.

La Figura 2 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una sonda de captura con código de barras, como se describe en la presente descripción.

5

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 ilustrativa.

10

La Figura 5 es un esquema que muestra el arreglo ilustrativo de características con código de barras dentro de una matriz.

La Figura 6 es un diagrama esquemático que muestra un flujo de trabajo ilustrativo para la ligazón con plantilla de ARN.

15

La Figura 7 es un diagrama esquemático que muestra un flujo de trabajo ilustrativo para capturar un producto de ligazón 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 enlazadora y una segunda sonda.

20

La Figura 9 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una segunda sonda que incluye una secuencia enlazadora 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.

25

La Figura 11 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una ligazón con plantilla de ARN mediante el uso de un primer oligonucleótido de sonda, un segundo oligonucleótido de sonda y un tercer oligonucleótido de sonda.

Las Figuras 12A-12E muestran varios enfoques para la ligazón 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 del enlace fosforamidato. La Figura 12E ilustra una reacción de conjugación.

30

La Figura 13 muestra un flujo de trabajo ilustrativo de ligazón con plantilla de ARN.

La Figura 14 muestra resultados de PCR de enriquecimiento para la detección de diversas sondas. R1 = corrida 1; R2 = corrida 2. (1) representa la banda para el producto de ligazón con la sonda de captura. (2), (3) y (4) representan productos sin ligazón.

35

La Figura 15 muestra el resto de lecturas para varias 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 mediante el uso de recuentos totales de oligonucleótidos de sonda (Figura 17A), recuentos de oligonucleótidos de sonda inespecíficos (Figura 17B), y recuentos de oligonucleótidos de sonda específicos de genes (Figura 17C).

40

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 mediante el uso de recuentos totales de oligonucleótidos de sonda (Figura 19A) y oligonucleótido de sonda específico de gen (Figuras 19B-19F).

La Figura 20A muestra la mediana de identificadores moleculares únicos (UMI) por célula frente a las lecturas medias por célula para diferentes condiciones de hibridación.

La Figura 20B muestra la mediana de genes por célula frente a lecturas medias por célula para diferentes 5 condiciones de hibridación.

La Figura 21A muestra tinción con hematoxilina para una sección de una muestra de tejido de cáncer de mama triple positivo.

La Figura 21B muestra la mediana del UMI por recuento celular frente a la lectura media por célula para las 10 diferentes condiciones.

La Figura 21C muestra la proyección t-SNE de puntos en ocho conglomerados diferentes.

La Figura 21D muestra el mismo tejido de la Figura 21A con varios conglomerados (n=8 conglomerados) expresados en diferentes áreas del tejido.

La Figura 21E muestra la expresión del receptor de estrógenos (ESR1). 15

La Figura 21F muestra la expresión del receptor de estrógenos receptor de progesterona (PGR).

La Figura 21G muestra la expresión de ERBB2, también conocido como HER2.

La Figura 22A muestra una tinción con hematoxilina para una sección de la muestra de cáncer de ovario. 20

La Figura 22B muestra la mediana del UMI por célula frente a la lectura media por célula para las diferentes condiciones.

La Figura 22C muestra el mismo tejido de la Figura 25A con varios conglomerados (n=8 conglomerados) expresados en diferentes áreas del tejido.

La Figura 22D muestra la proyección t-SNE de puntos en ocho conglomerados diferentes. 25

La Figura 23 muestra la mediana de los UMI por célula frente a las lecturas por célula para diferentes condiciones de desentrecruzamiento.

La Figura 24 muestra la mediana de los UMI por célula frente a las lecturas por célula (panel superior) y la 30 mediana de los genes por célula frente a las lecturas por célula (panel inferior) para diferentes condiciones de tratamiento (ARNasa).

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

### 35 Descripción detallada

La captura de ARN dirigido es una alternativa atractiva a la captura de ARNm poli(A) con el fin de interrogar la expresión génica espacial en el tejido FFPE. En comparación con la captura de ARNm poli(A), la captura de ARN dirigido se ve menos afectada por la degradación del ARN asociada con la fijación de FFPE que los métodos dependientes de la captura oligo-dT y la transcripción inversa del ARNm; permite la medición sensible 40 de genes específicos de interés que de cualquier otra manera podrían omitirse con un enfoque transcriptómico completo; y es escalable, con sondas demostradas dirigidas a una gran fracción del transcriptoma.

Las metodologías y composiciones de análisis espacial descritas en la presente descripción pueden proporcionar una gran cantidad de analito y/o datos de expresión para una variedad de analitos dentro de una muestra biológica a alta resolución espacial, mientras retienen el contexto espacial nativo. Los métodos y 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, una célula de mamífero o una muestra de tejido de mamífero) y un dominio de captura que es capaz de unirse a un analito (por ejemplo, una proteína y/o un ácido nucleico) producido por y/o presente en una célula. Los métodos y composiciones de análisis espacial también pueden incluir el uso de una sonda de captura que tiene un dominio de captura que captura un agente intermediario para la detección indirecta de un analito. Por ejemplo, el agente intermediario puede incluir una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, un código de barras) asociada con el agente intermediario. Por lo tanto, la detección del agente intermediario es indicativa del analito en la muestra de célula o tejido.

Los aspectos no limitantes de las metodologías y composiciones de análisis espacial se describen en las patentes de Estados Unidos núms. 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, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núms. 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 2020/176788, Rodriques y otros, Science 363(6434):1463-1467, 2019; Lee y otros, Nat. Protoc. 10(3):442-458, 2015; Trejo y otros, PLoS ONE 14(2):e0212031, 2019; Chen y otros, Science 348(6233):aaa6090, 2015; Gao y otros, BMC Biol. 15:50, 2017; y Gupta y otros, Nature Biotechnol. 36:1197-1202, 2018; la guía del usuario de los kits de reactivos de expresión génica espacial de Visium (por ejemplo, Rev. C, con fecha de junio de 2020), y/o la guía del usuario de kits de reactivos de optimización de tejidos espaciales de Visium (por ejemplo, Rev. C, con fecha de julio de 2020), ambos están disponibles en el sitio web de documentación de asistencia genómica 10x, y puede usarse en la presente descripción en cualquier combinación. En el documento WO 2018/091676, los cebadores de códigos de barras se liberan de una matriz direccionable en las muestras de tejido en la matriz y la resolución espacial de la transcripción se obtiene mediante la secuenciación de ADNc con código de barras espacial. El documento WO 2017/019481 se refiere a la detección espacialmente resuelta de analitos (tales como ARNm) mediante la ligazón de sondas y la amplificación de las sondas ligadas con cebadores inmovilizados (para preservar la resolución espacial) y la detección mediante el uso de sondas fluorescentes. Otros aspectos no limitantes de las metodologías y composiciones de análisis espacial se describen en la presente descripción.

Puede encontrarse alguna terminología general que puede usarse en esta descripción en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. Típicamente, un "código de barras" es una etiqueta, o identificador, que transmite o es capaz de transmitir información (por ejemplo, información sobre un analito en una muestra, una perla, y/o una sonda de captura). Un código de barras puede ser parte de un analito o independiente de un analito. Puede unirse un código de barras a un analito. Un código de barras en particular puede ser único con relación a otros códigos de barras. Para el propósito de esta descripción, un "analito" puede incluir cualquier sustancia biológica, estructura, resto o componente a analizar. El término "diana" puede referirse de manera similar a un analito de interés.

Los analitos pueden clasificarse ampliamente en uno de dos grupos: analitos de ácido nucleico y analitos de ácido no nucleico. Los ejemplos de analitos de ácidos no nucleicos incluyen, pero no se limitan a, lípidos, carbohidratos, péptidos, proteínas, glicoproteínas (unidas a N o unidas a O), lipoproteínas, fosfoproteínas, variantes de proteínas fosforiladas o acetiladas específicas, variantes de amidación de proteínas, variantes de hidroxilación de proteínas, variantes de metilación de proteínas, variantes de ubiquitilación de proteínas, variantes de sulfatación de proteínas, proteínas virales (por ejemplo, cápside viral, envoltura viral, recubrimiento viral, accesorio viral, glicoproteínas virales, espícula viral, etc.), proteínas extracelulares e intracelulares, anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno. En algunas modalidades, el/los analito(s) pueden localizarse en ubicación(es) subcelulares, que incluyen, por ejemplo, orgánulos, por ejemplo, mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplasmático, cloroplastos, vesículas endocíticas, vesículas exocíticas, vacuolas, lisosomas, etc. En algunas modalidades, los analito(s) pueden ser péptidos o proteínas, que incluyen, sin limitación, anticuerpos y enzimas. Pueden encontrarse ejemplos adicionales de analitos en el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. En algunas modalidades, un analito puede detectarse indirectamente, tal como mediante la detección de un agente intermediario, por ejemplo, un producto de ligazón o un agente de captura de analito (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con oligonucleótidos), tal como los descritos en la presente descripción.

Una "muestra biológica" se obtiene típicamente del sujeto para su análisis mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas que incluyen, pero no se limitan a, biopsia, cirugía y microscopía de captura láser (LCM), y generalmente incluye células y/u otro material biológico del sujeto. En algunas modalidades, una muestra biológica puede ser una sección de tejido. En algunas modalidades, 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 limitantes de tinciones incluyen tinciones histológicas (por ejemplo, hematoxilina y/o eosina) y tinciones inmunológicas (por ejemplo, tinciones fluorescentes). En algunas modalidades, puede obtenerse una imagen

de una muestra biológica (por ejemplo, una muestra biológica fijada y/o teñida). Las muestras biológicas también se describen en el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

- 5 En algunas modalidades, 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. Los agentes y condiciones de permeabilización ilustrativos se describen en el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

10 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 en base a la característica a la que se une el analito (por ejemplo, directa o indirectamente) en la matriz, y la ubicación espacial relativa de la característica dentro de la matriz.

15 Una "sonda de captura" se refiere a cualquier molécula capaz de capturar (directa o indirectamente) y/o marcar un analito (por ejemplo, un analito de interés) en una muestra biológica. En algunas modalidades, la sonda de captura es un ácido nucleico o un polipéptido. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un identificador molecular único (UMI)) y un dominio de captura. En algunas modalidades, una sonda de captura puede incluir un dominio de escisión y/o un dominio funcional (por ejemplo, un sitio de unión al 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 de Estados Unidos núm. 2020/0277663. La generación de sondas de captura puede lograrse mediante cualquier método apropiado, que incluye los descritos en el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

En algunas modalidades, puede detectarse más de un tipo de analito (por ejemplo, ácidos nucleicos y proteínas) a partir de una muestra biológica (por ejemplo, simultáneamente o secuencialmente) mediante el uso de cualquier técnica de multiplexación adecuada, tal como las descritas en el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

25 En algunas modalidades, la detección de uno o más analitos (por ejemplo, analitos proteicos) puede realizarse mediante el uso de uno o más agentes capturadores de analitos. Como se usa en la presente descripción, un "agente de captura de analito" se refiere a un agente que interactúa 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 modalidades, el agente de captura de analito incluye: (i) un resto de unión al analito (por ejemplo, que se une a un analito), por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo; (ii) código de barras del resto de unión al analito; y (iii) una secuencia de captura de analito. Como se usa en la presente descripción, el término "código de barras del resto de unión al analito" se refiere a un código de barras que se asocia con o identifica de cualquier otra manera el resto de unión al analito. Como se usa en la presente descripción, el término "secuencia de captura de analito" se refiere a una región o resto configurado para hibridarse, unirse, acoplarse o interactuar de cualquier otra manera con un dominio de captura de una sonda de captura. En algunos casos, un código de barras del resto de unión al analito (o porción del mismo) puede ser capaz de eliminarse (por ejemplo, escindirse) del agente de captura de analito. Puede encontrarse una descripción adicional de los agentes capturadores de analitos en el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

35 Existen 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 se asocia con una ubicación espacial particular. Un método es promover analitos o sustitutos de analitos (por ejemplo, agentes intermediarios) 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 (como se describe más adelante en la presente descripción) 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 es 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 (como se describe más adelante en la presente descripción) 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 covalente o no

covalente de la superficie celular. La interacción puede ser una interacción intracelular facilitada por un sistema de suministro 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 eliminarse opcionalmente para el análisis. La muestra puede disociarse opcionalmente antes del análisis. Una vez que la célula etiquetada se asocia con la sonda de captura con código de barras espacial, las sondas de captura pueden analizarse para obtener información resuelta espacialmente sobre la célula etiquetada.

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, la muestra teñida puede obtenerse una imagen en la matriz mediante el uso de modalidades de campo claro (para obtener una imagen de la tinción de la muestra con hematoxilina y eosina) y/o fluorescencia (para obtener una imagen de las características). Opcionalmente, la muestra puede desteñirse antes de la permeabilización. En algunas modalidades, los analitos se liberan luego de la muestra y las sondas de captura que forman la matriz con código de barras espacial hibridan o se unen a los analitos liberados. La muestra se elimina entonces de la matriz y las sondas de captura se escinden de la matriz. La muestra biológica y la matriz se obtienen después opcionalmente por segunda vez en una o ambas modalidades mientras que los analitos se transcriben por inversa en ADNc, y se prepara y secuencia una biblioteca de amplicones. Luego, las imágenes se superponen espacialmente para correlacionar la información de las muestras biológicas identificadas espacialmente. Cuando la muestra y la matriz no se obtienen imágenes una segunda vez, se suministra un archivo de coordenadas puntuales en su lugar. El archivo de coordenadas de puntos 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 describe otro flujo de trabajo ilustrativo que utiliza una matriz con código de barras espacial en un sustrato, donde las sondas de captura con código de barras espacial se conglomeran en áreas llamadas 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 de 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 al colocar el conjunto de matriz/muestra dentro de una solución a granel. Alternativamente, los reactivos de permeabilización pueden administrarse a la muestra mediante 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 se hacen migrar hacia la matriz de captura con código de barras espacial mediante el uso de cualquier número de técnicas descritas en la presente descripción. Por ejemplo, la migración de analitos puede ocurrir mediante el uso de una tapa de medio resistente a la difusión y una migración pasiva. Como otro ejemplo, la migración de analitos puede ser una migración activa, mediante el uso de 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 o unirse de cualquier otra manera a un analito diana. La muestra biológica puede eliminarse opcionalmente de la matriz.

Las sondas de captura pueden escindirse opcionalmente de la matriz, y a los analitos capturados puede añadirse un código de barras espacial mediante la realización de una reacción de ADNc de la primera hebra de la transcriptasa inversa. Una reacción de ADNc de la primera hebra puede realizarse opcionalmente mediante el uso de oligonucleótidos que conmutan de plantilla. Por ejemplo, un oligonucleótido que conmuta de plantilla puede hibridarse con una cola poli(C) añadida a un extremo 3' del ADNc mediante una enzima de transcriptasa inversa de una manera independiente de la plantilla. La plantilla de ARNm original y el oligonucleótido que conmuta de plantilla pueden desnaturalizarse del ADNc y la sonda de captura con código de barras espacial puede entonces hibridarse con el ADNc y puede generarse un complemento del ADNc. La ADNc de la primera hebra puede purificarse y recolectarse después para etapas de amplificación aguas abajo. El ADNc de la primera hebra puede amplificarse mediante el uso de PCR, donde los cebadores directos e inversos flanquean el código de barras espacial y las regiones de analito de interés, lo que genera una biblioteca asociada con un código de barras espacial particular. En algunas modalidades, la preparación de la biblioteca puede cuantificarse y/o controlarse con calidad para verificar el éxito de las etapas de preparación de la biblioteca. En algunas modalidades, el ADNc comprende una secuencia de cebador de secuenciación por síntesis (SBS). Los amplicones de la biblioteca se secuencian y analizan para decodificar la información espacial.

En algunos casos, las sondas de captura pueden configurarse para preparar, replicar y, en consecuencia, producir opcionalmente productos de extensión con código de barras a partir de una plantilla (por ejemplo, una plantilla de ADN o ARN, tal como un analito o un agente intermediario (por ejemplo, un producto de ligazón o un agente de captura de analito), o una porción de este), o derivados de este (véase, por ejemplo, el documento

WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663 con respecto a sondas de captura extendidas). En algunos casos, las sondas de captura pueden configurarse para formar productos de ligazón con una plantilla (por ejemplo, una plantilla de ADN o ARN, tal como un analito o un agente intermediario, o porción de este), crear de esta manera productos de ligazón que sirven como sustitutos para una plantilla.

5

Una "sonda de captura" se refiere a cualquier molécula capaz de capturar (directa o indirectamente) y/o marcar un analito (por ejemplo, un analito de interés) en una muestra biológica. En algunas modalidades, la sonda de captura es un ácido nucleico o un polipéptido. En algunas modalidades, la sonda de captura 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 reversiblemente a un sustrato a través de un enlazador. La sonda de captura puede incluir una o más secuencias funcionales, que pueden incluir una secuencia de unión a la celda de flujo específica del secuenciador, por ejemplo, una secuencia P5 o P7, así como también una secuencia funcional, que puede incluir secuencias de cebadores de secuenciación, por ejemplo, un sitio de unión al cebador R1, un sitio de unión al cebador R2. En algunas modalidades, la secuencia es una secuencia P7 y la secuencia es un sitio de unión al 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. Las diferentes secuencias de la sonda de captura no necesitan estar de la manera secuencial como se representa en este ejemplo, sin embargo, el dominio de captura debe colocarse en una ubicación en el código de barras en donde puede ocurrir la captura y extensión del analito del dominio de captura para crear una copia del analito.

10

15

La Figura 2 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una sonda de captura, como se describe en la presente descripción. Como se muestra, la sonda de captura 202 se acopla opcionalmente a una característica 201 mediante un dominio de escisión 203, tal como un enlazador 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 la celda de flujo específica del secuenciador, por ejemplo, una secuencia P5 o P7, así como también la secuencia funcional 205, que puede incluir secuencias de cebadores de secuenciación, por ejemplo, un sitio de unión del cebador R1. En algunas modalidades, la secuencia 204 es una secuencia P7 y la secuencia 205 es un sitio de unión al cebador R1. Puede incluirse un código de barras espacial 206 dentro de la sonda de captura para su uso en la codificación del analito diana. Las secuencias funcionales pueden seleccionarse generalmente para su compatibilidad con cualquiera de una variedad de diferentes sistemas de secuenciación, por ejemplo, Ion Torrent Proton o PGM, instrumentos de secuenciación Illumina, PacBio, Oxford Nanopore, etc., y sus requisitos. En algunas modalidades, las secuencias funcionales pueden seleccionarse para su compatibilidad con sistemas de secuenciación no comercializados. Los ejemplos de tales sistemas y técnicas de secuenciación, para los cuales pueden usarse secuencias funcionales adecuadas, incluyen (pero no se limitan a) secuenciación de Ion Torrent Proton o PGM, secuenciación de Illumina, secuenciación PacBio SMRT y secuenciación Oxford Nanopore. Además, en algunas modalidades, las secuencias funcionales pueden seleccionarse para su compatibilidad con otros sistemas de secuenciación.

20

25

30

En algunas modalidades, el código de barras espacial 206, las secuencias funcionales 204 (por ejemplo, secuencia de unión a la celda de flujo) y 205 (por ejemplo, secuencias de cebadores 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 mediante el uso de un péptido penetrante celular. La Figura 3 es un esquema que ilustra una sonda de captura escindible que incluye un péptido penetrante 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 penetrante 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.

35

En algunos casos, la descripción proporciona características multiplexadas con código de barra espacial. La Figura 4 es un diagrama esquemático de una característica con código de barras espacial multiplexada ilustrativa. En la Figura 4, el 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.) puede 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 tienen 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, cada tipo de sonda de captura con código de barras espacial posee

40

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 poli(T) 403, diseñado para capturar analitos diana del 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 N-mer aleatorio 404 para el análisis de ADNg.

5 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 solo se muestran cuatro constructos diferentes con código de barras de sonda de captura en la Figura 4, los constructos con código de barras de sonda de captura pueden adaptarse para los análisis de cualquier analito dado asociado con un ácido nucleico y capaz de unirse con tal constructo. Por ejemplo, los esquemas mostrados en la Figura 4 también

10 pueden usarse para el análisis simultáneo de otros analitos descritos en la presente descripción, que incluye, pero no se limitan a: (a) ARNm, un constructo de trazado de linaje, la superficie celular o las proteínas y metabolitos intracelulares, y ADNg; (b) ARNm, cromatina accesible (por ejemplo, ATAC-seq, DNase-seq, y/o MNase-seq) superficie celular o proteínas y metabolitos intracelulares, y un agente de perturbación (por ejemplo, un ARNcr/ARNgu de CRISPR, TALEN, nucleasa con dedos de zinc, y/o oligonucleótido antisentido como se describe en la presente descripción); (c) ARNm, superficie celular o proteínas y/o metabolitos intracelulares, un agente de etiquetado con código de barras (por ejemplo, los multímeros de MHC descritos

15 en la presente descripción), y una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias (por ejemplo, receptor de linfocitos T). En algunas modalidades, un agente de perturbación puede ser una molécula pequeña, un anticuerpo, un fármaco, un aptámero, un miARN, un entorno físico (por ejemplo, cambio de temperatura) o cualesquiera otros agentes de perturbación conocidos.

Las características adicionales de las sondas de captura se describen en el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. La generación de sondas de captura puede lograrse mediante cualquier método apropiado, que incluye los descritos en el documento WO

20 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

Como se usa en la presente descripción, 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, lo que extiende de esta manera la longitud total de la sonda de captura. Por ejemplo, un "extremo 3' extendido" indica que se añadieron nucleótidos adicionales al nucleótido más 3' de la sonda de captura para

25 extender la longitud de la sonda de captura, por ejemplo, mediante reacciones de polimerización usadas para extender moléculas de ácido nucleico que incluyen polimerización moldeada catalizada por una polimerasa (por ejemplo, una ADN polimerasa o una transcriptasa inversa). En algunas modalidades, la extensión de 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 intermediario unido específicamente al dominio de captura de la sonda de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura se extiende mediante el uso de una o más ADN polimerasas. Las sondas de captura extendidas incluyen la secuencia de

30 la sonda de captura y la secuencia del código de barras espacial de la sonda de captura.

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

35 Las variantes adicionales de métodos de análisis espacial, que incluyen en algunas modalidades, una etapa de obtención de imágenes, se describen en el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. Los análisis de analitos capturados (y/o agentes intermediarios o porciones de estos), por ejemplo, que incluyen la eliminación de muestras, extensión de sondas de captura, secuenciación (por ejemplo, de una sonda de captura extendida escindida y/o una molécula de ADNc complementaria a una sonda de captura extendida), secuenciación en la matriz (por ejemplo, usar, por ejemplo, hibridación in situ o enfoques de ligazón in situ), análisis temporal, y/o captura de proximidad, se describen en

40 el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. Algunas medidas de control de calidad se describen en el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

La información espacial puede proporcionar información de importancia biológica y/o médica. Por ejemplo, los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden permitir: identificación de uno o más biomarcadores (por ejemplo, diagnóstico, pronóstico, y/o para determinar la eficacia de un tratamiento) de una

5 enfermedad o trastorno; identificación de una diana farmacológica candidata para el tratamiento de una enfermedad o trastorno; identificación (por ejemplo, diagnóstico) de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno; identificación del estadio y/o pronóstico de una enfermedad o trastorno en un sujeto; identificación de un sujeto como que tiene una mayor posibilidad de desarrollar una enfermedad o trastorno; controlar la progresión de una enfermedad o trastorno en un sujeto; determinación de la eficacia de un tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto; identificación de una subpoblación de pacientes para la que un tratamiento es efectivo para una enfermedad o trastorno; modificación de un tratamiento de un sujeto con una enfermedad o trastorno; selección de un sujeto para participar en un ensayo clínico; y/o selección de un tratamiento para un sujeto con una enfermedad o trastorno.

10 La información espacial puede proporcionar información de importancia biológica. Por ejemplo, los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden permitir: identificación de perfiles de expresión del transcriptoma y/o proteoma (por ejemplo, en tejido sano y/o enfermo); identificación de múltiples tipos de analitos en proximidad cercana (por ejemplo, análisis vecino más cercano); determinación de genes y/o proteínas reguladas positiva y/o negativamente en tejido enfermo; caracterización de microentornos tumorales; caracterización de las respuestas inmunitarias tumorales; caracterización de los tipos de células y su colocalización en el tejido; e identificación de variantes genéticas dentro de los tejidos (por ejemplo, basado en perfiles de expresión génica y/o proteica asociados con biomarcadores específicos de enfermedades o trastornos).

15 Típicamente, para los métodos basados en matrices espaciales, un sustrato funciona como un soporte para la unión directa o indirecta de sondas de captura a características de la matriz. Una "característica" es una entidad que actúa como soporte o depósito para varias entidades moleculares usadas en el análisis espacial. En algunas modalidades, algunas o todas las características de una matriz se funcionalizan para la captura de analitos. Los sustratos ilustrativos se describen en el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. Las características ilustrativas y los atributos geométricos de una matriz pueden encontrarse en el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

20 La Figura 5 representa un arreglo ilustrativo de características con código de barras dentro de una matriz. De izquierda a derecha, la Figura 5 muestra (izquierda) una diapositiva que incluye seis matrices con código de barras espacial, (centro) un esquema ampliado de una de las seis matrices con código de barras espacial, que muestra una cuadrícula de características con código 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 (etiquetado como ID578, ID579, ID560, etcétera).

25 Generalmente, pueden capturarse analitos y/o agentes intermediarios (o porciones de estos) cuando se pone en contacto una muestra biológica con un sustrato que incluye sondas de captura (por ejemplo, un sustrato con sondas de captura incrustadas, manchadas, impresas, fabricadas sobre el sustrato, o un sustrato con características (por ejemplo, perlas, pocillos, áreas sobre un sustrato) que comprenden sondas de captura). Como se usa en la presente descripción, "contacto," "contactado" y/o "poner en contacto," una muestra biológica con un sustrato se refiere a cualquier contacto (por ejemplo, directo o indirecto) de manera que las sondas de captura pueden interactuar (por ejemplo, unirse covalente o no covalentemente (por ejemplo, hibridar)) con analitos de la muestra biológica. La captura puede lograrse activamente (por ejemplo, mediante el uso de electroforesis) o pasivamente (por ejemplo, mediante el uso de difusión). La captura de analitos se describe además en el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663.

30 En algunos casos, el análisis espacial puede realizarse al unir y/o introducir una molécula (por ejemplo, un péptido, un lípido o una molécula de ácido nucleico) que tiene un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial) a una muestra biológica (por ejemplo, a una célula en una muestra biológica). En algunas modalidades, 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 modalidades, después de unir y/o introducir una molécula que tiene un código de barras a una muestra biológica, la muestra biológica puede separarse físicamente (por ejemplo, disociarse) en células individuales o grupos de células para su análisis. Algunos de estos métodos de análisis espacial se describen en el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 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 mediante el uso de ligazón con plantilla de ARN (RTL). Los métodos de RTL se han descrito anteriormente. Véase, por

ejemplo, Credle y otros, Nucleic Acids Res. 21 de agosto de 2017;45(14):e128. Típicamente, la 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 poli(A), una secuencia no homopolimérica). Después de la hibridación con el analito, una ligasa (por ejemplo, la ligasa SplintR) liga los dos oligonucleótidos juntos, lo que crea un producto de ligazón. 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 ligazón. Después de la ligazón, el producto de ligazón se libera del analito. En algunos casos, el producto de ligazón se libera mediante el uso de una endonucleasa (por ejemplo, ARNasa H). El producto de ligazón liberado puede entonces capturarse mediante sondas de captura (por ejemplo, en lugar de la captura directa de un analito) en una matriz, opcionalmente amplificada y secuenciada, lo que determina así la ubicación y opcionalmente la abundancia del analito en la muestra biológica.

Durante el análisis de la 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 varios métodos para obtener la información espacial. En algunas modalidades, las sondas de captura específicas y los analitos que capturan se asocian 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 códigos de barras espaciales pueden almacenarse (por ejemplo, en una base de datos) junto con la información de ubicación de matriz específica, de manera que cada código de barras espacial se asigna de manera única a una ubicación de matriz particular.

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 está presente un tipo de código de barras espacial de manera que los códigos de barras espaciales se asocian de manera única con una única característica de la matriz. Cuando sea necesario, las matrices pueden decodificarse mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción de manera que los códigos de barras espaciales se asocian de manera única con las ubicaciones de las características de la matriz, y este mapeo puede almacenarse como se describió anteriormente.

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

Algunos flujos de trabajo ilustrativos de análisis espacial se describen en el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. Véase, por ejemplo, la modalidad ilustrativa que comienza con "En algunos ejemplos no limitantes de los flujos de trabajo descritos en la presente descripción, la muestra puede sumergirse..." del documento WO 2020/176788 y/o de la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. Véase también, por ejemplo, la guía del usuario de kits de reactivos para la expresión génica espacial de Visium (por ejemplo, Rev C, con fecha de junio de 2020), y/o la guía del usuario de kits de reactivos para la optimización de tejidos espaciales de Visium (por ejemplo, Rev C, con fecha de julio de 2020).

En algunas modalidades, el análisis espacial puede realizarse mediante el uso de hardware y/o software dedicados, tales como cualquiera de los sistemas descritos en el documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663, o cualquiera de uno o más de los dispositivos o métodos descritos en el documento WO 2020/123320.

Los sistemas adecuados para realizar el análisis espacial pueden incluir componentes tales como una cámara (por ejemplo, una celda de flujo o una cámara sellable y hermética a los fluidos) para contener una muestra biológica. La muestra biológica puede montarse, por ejemplo, en un soporte de muestra biológica. Una o más cámaras de fluidos pueden conectarse a la cámara y/o al soporte de muestras a través de conductos de fluidos, y los fluidos pueden suministrarse dentro de la cámara y/o soporte de muestras a través de bombas de fluidos,

fuentes de vacío, u otros dispositivos acoplados a los conductos de fluidos que crean un gradiente de presión para impulsar el flujo de fluidos. Una o más válvulas también pueden conectarse a conductos de fluidos para regular el flujo de reactivos desde los depósitos hasta la cámara y/o el soporte de muestras.

- 5 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 no se limitan a, un medio de almacenamiento magnético, óptico, u otro estado sólido, persistente, que puede escribirse y/o reescribirse). La unidad de control puede conectarse opcionalmente a uno o más dispositivos remotos a través de una red. La unidad de control (y sus componentes) pueden generalmente realizar cualquiera de las etapas y funciones descritas en la presente descripción. Cuando el sistema se conecta a un dispositivo remoto, el dispositivo remoto (o dispositivos) puede realizar cualquiera de las etapas o características descritas en la presente descripción. 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 (por ejemplo, láseres basados en LED, basados en diodos) para iluminar una muestra, un sustrato con características, analitos de una muestra biológica capturada en un sustrato, y varios medios de control y calibración.

- 10 Los sistemas pueden incluir opcionalmente instrucciones de software codificadas y/o implementadas en uno o más de medios de almacenamiento tangibles y componentes de hardware tales como circuitos integrados de aplicación específica. Las instrucciones de 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 de software realice cualquiera de las etapas o funciones del método descritas en la presente descripción.

- 20 En algunos casos, los sistemas descritos en la presente descripción pueden detectar (por ejemplo, registrar una imagen) la muestra biológica en la matriz. Los métodos ilustrativos para detectar la muestra biológica en una matriz se describen en la solicitud PCT núm. 2020/061064 y/o en la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 16/951,854.

- 25 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 incluyen sondas de captura puede facilitar el análisis espacial, que puede usarse para detectar diferencias en la presencia y/o el nivel de analito dentro de diferentes posiciones en la muestra biológica, por ejemplo, para generar un mapa tridimensional de la presencia y/o el nivel de analito. Los métodos ilustrativos para generar un mapa bidimensional y/o tridimensional de la presencia y/o el nivel de analito se describen en la solicitud PCT núm. 2020/053655 y los métodos de análisis espacial se describen generalmente en el documento WO 2020/061108 y/o en la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 16/951,864.

- 30 En algunos casos, un mapa de la presencia y/o el nivel de analito puede alinearse a una imagen de una muestra biológica mediante el uso de uno o más marcadores fiduciales, por ejemplo, objetos colocados en el campo visual de un sistema de obtención de imágenes que aparecen en la imagen producida, como se describe en el documento WO 2020/123320, la solicitud PCT núm. 2020/061066 y/o la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 16/951,843. Los marcadores fiduciales pueden usarse como un 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 una ubicación de una muestra o matriz en un sustrato con relación a un marcador fiducial) y/o para mediciones cuantitativas de tamaños y/o distancias.

35

I. Captura de ARN mediante el uso de ligazón con plantilla de ARN

(a) Fondo general

- 40 Aunque están disponibles técnicas tales como la secuenciación del genoma completo y la secuenciación del exoma completo, estas técnicas tienen inconvenientes en que proporcionan mucha información y aumentan los costos de un experimento. En situaciones en las que se prefiere examinar un número más limitado de analitos, en la presente descripción se proporcionan métodos para la captura de ARN dirigido. La captura de un derivado de un analito (por ejemplo, un producto de ligazón) proporciona una especificidad mejorada con respecto a la detección de un analito. Esto se debe a que se requieren al menos dos sondas específicas para una diana para hibridar con la diana con el fin de facilitar la ligazón y la captura final del ácido nucleico.

Con referencia a la Figura 1, en una modalidad ilustrativa de la descripción, 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 matriz de sondas de captura con código de barras espacial. En algunos casos, la matriz está en 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. 5 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 las secuencias del analito, y en donde la segunda sonda incluye un dominio de captura de la sonda de captura; la primera sonda y la segunda sonda 103 se hibridan con secuencias complementarias en el analito. Después de la hibridación se genera un producto de ligazón que comprende la primera sonda y la segunda sonda 104 y el producto de ligazón se libera del analito. El producto de ligazón liberado se libera entonces 105 para hibridarse con el dominio de captura de una sonda 10 en la matriz. Después de la captura, (i) puede determinarse toda o una parte de la secuencia del producto de ligazón unido específicamente al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) toda o una parte de la secuencia del código de barras espacial, o un complemento del mismo 106 y luego puede usarse la secuencia determinada de (i) y (ii) 107 para identificar la ubicación del analito en la muestra biológica.

Con referencia a la Figura 13, en otro ejemplo no limitante, una muestra biológica se desparafina, se tife y se obtienen imágenes 1301. Después de la decoloración y desentrecruzamiento 1302, se añaden sondas a la 15 muestra e hibridan con un analito 1303. En algunos casos, las sondas son sondas de ADN. En algunos casos, las sondas son sondas que contienen dirribo. Las sondas se ligan 1304 y luego se liberan mediante el uso de una endonucleasa tal como la ARNasa H 1305. Las sondas ligadas se capturan en una matriz mediante una sonda de captura 1306, extendida mediante el uso de una polimerasa 1307 y desnaturalizada 1308. Después de la limpieza de control de calidad 1309, se determina la abundancia y ubicación de un analito.

Un ejemplo no limitante de los métodos descritos en la presente descripción se representa en la Figura 6. Después de que una muestra biológica se pone en contacto con un sustrato que incluye una pluralidad de 20 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 poli-A) 606, la primera sonda 601 y una segunda sonda 604 hibridan 610 con un analito 607. Una ligasa 621 liga 620 la primera sonda a la segunda sonda lo que genera de esta manera un producto de ligazón 622. El producto de ligazón se libera 630 del analito 631 al dirigir el analito mediante el uso de una endorribonucleasa 632. La muestra se permeabiliza 640 y el producto de ligazón 641 es capaz de hibridarse con una sonda de captura en el sustrato.

25 También se proporcionan en la presente descripción 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 ligazón use una ligasa que no requiere trifosfato de adenosina para la actividad de la ligasa.

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

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

35 En algunas modalidades, como se muestra en la Figura 7, el producto de ligazón 701 incluye un dominio de captura de la 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 modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción 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 modalidades, 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 40 identificador molecular único (UMI) 707, un código de barras espacial 708, una secuencia funcional 709, y un dominio de escisión 710.

En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción incluyen la permeabilización de la muestra biológica de manera que la sonda de captura puede unirse más fácilmente a la sonda ligada capturada (es decir, en comparación con la ausencia de permeabilización). En algunas modalidades, los reactivos de transcripción inversa (RT) pueden añadirse a muestras biológicas permeabilizadas. La incubación

con los reactivos de 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). Los reactivos de la segunda hebra (por ejemplo, cebadores de la segunda hebra, enzimas) pueden añadirse a la muestra biológica en el portaobjetos para iniciar la síntesis de la segunda hebra.

5 En algunas modalidades, el ADNc puede desnaturalizarse 714 de la plantilla de la sonda de captura y transferirse (por ejemplo, a un tubo limpio) para la amplificación, y/o construcción de biblioteca. El ADNc de longitud completa, con código de barras espacial, puede amplificarse 715 mediante PCR antes de la construcción de la biblioteca. El ADNc puede entonces fragmentarse enzimáticamente y seleccionarse por tamaño para optimizar el tamaño del amplicón del ADNc. P5 716, i5 717, i7 718, y P7 719, y pueden usarse como índices de muestra, y TruSeq Lectura 2 puede añadirse mediante reparación final, cola A, ligazón adaptadora y PCR. Los fragmentos de ADNc pueden secuenciarse entonces mediante el uso de secuenciación de extremo emparejado mediante el uso de TruSeq Lectura 1 y TruSeq Lectura 2 como sitios de cebadores de secuenciación.

(b) Sondas para la ligazón con plantilla de ARN

15 Los métodos proporcionados en la presente descripción utilizan pares de sondas (o conjuntos; los términos son intercambiables). En algunos casos, los pares de sondas se diseñan de manera que cada sonda se hibrida con una secuencia en un analito que es específico del analito (por ejemplo, en comparación con todo el genoma). Es decir, en algunos casos, un único par de sondas puede ser específico de un único analito.

20 En otras modalidades, las sondas pueden diseñarse de manera que una de las sondas de un par es una sonda que se hibrida con una secuencia específica. Entonces, 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 manera que cada una se una a una secuencia específica. Por ejemplo, una segunda sonda puede diseñarse para hibridarse con una secuencia de tipo silvestre, y otra segunda sonda puede diseñarse para detectar una secuencia mutada. Por lo tanto, en algunos casos, un conjunto de sondas puede incluir una primera sonda y dos segundas sondas (o viceversa).

25 Por otro lado, en algunos casos, las sondas pueden diseñarse de manera que cubran regiones conservadas de un analito. Por lo tanto, en algunos casos, una sonda (o 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).

30 En algunas modalidades, los conjuntos de sondas recubren todo o casi todo un genoma (por ejemplo, genoma humano). En los casos en los que los conjuntos de sondas se diseñan para recubrir un genoma completo (por ejemplo, el genoma humano), los métodos descritos en la presente descripción pueden detectar analitos de manera imparcial. En algunos casos, un par de oligonucleótidos de sonda se diseña para recubrir un analito (por ejemplo, transcrito). En algunos casos, más de un par de oligonucleótidos de sonda (por ejemplo, un par de sonda que comprende una primera sonda y una segunda sonda) se diseña para recubrir 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 hibridar con un único analito. Los factores a considerar al diseñar sondas es la presencia de variantes (por ejemplo, SNP, mutaciones) o múltiples isoformas expresadas por un único gen. En algunos casos, el par de oligonucleótidos de sonda no se hibrida con el analito completo (por ejemplo, un transcrito), sino que el par de oligonucleótidos de sonda se hibrida con una porción de todo el analito (por ejemplo, transcrito).

35 En algunos casos, aproximadamente 5000, 10 000, 15 000, 20 000 o más pares de oligonucleótidos de sonda (por ejemplo, un par de sondas que comprende una primera sonda y una segunda sonda) se usan en los métodos descritos en la presente descripción. En algunos casos, se usan aproximadamente 20 000 pares de oligonucleótidos de sonda en los métodos descritos en la presente descripción

40 En algunos casos, la captura de ARN es una captura de ARN dirigido. La captura de ARN dirigido mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción permite el examen de un subconjunto de analitos de ARN de todo el transcriptoma. En algunas modalidades, el subconjunto de analitos incluye un ARN diana individual. En algunas modalidades, el subconjunto de analitos incluye dos o más ARN dirigidos. En algunas modalidades, el subconjunto de analitos incluye uno o más ARNm transcritos por uno o más genes dirigidos. En algunas modalidades, el subconjunto de analitos incluye una o más variantes de corte y empalme de ARNm de uno o más genes dirigidos. En algunas modalidades, el subconjunto de analitos incluye ARN no poliadenilados en una muestra biológica. En algunas modalidades, el subconjunto de analitos incluye la

detección de ARNm que tienen uno o más polimorfismos de un único nucleótido (SNP) en una muestra biológica.

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

En algunas modalidades, 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,  
15 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.

20 En algunos casos, los métodos descritos en la presente descripción pueden detectar la abundancia y ubicación de al menos 5000, 10 000, 15 000, 20 000 o más analitos diferentes.

En algunas modalidades, el subconjunto de analitos detectados mediante métodos de captura de ARN dirigidos proporcionados en la presente descripción 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 la presente descripción puede incluir al menos aproximadamente 5 %, al menos  
25 aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, o más de los ARNm presentes en el transcriptoma de una o más células.

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

En la presente descripción se describen modalidades adicionales de sonda(s) y conjunto(s) de sondas.

(i) Primera sonda

35 En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción incluyen una primera sonda. Como se usa en la presente descripción, una "primera sonda" puede referirse a una sonda que hibrida con todo 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 modalidades, la "primera sonda" puede usarse indistintamente con el "primer oligonucleótido de sonda."

40 En algunas modalidades, la primera sonda incluye ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos que son capaces de participar en interacciones de tipo Watson-Crick o de pares de bases análogas. En algunas modalidades, la primera sonda incluye desoxirribonucleótidos. En algunas modalidades, la primera sonda incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. En algunas modalidades, 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 modalidades, la porción del primer oligonucleótido que no es un ácido desoxirribonucleico es un ácido ribonucleico o cualquier otro ácido nucleico no ácido desoxirribonucleico como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades 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 modalidades, la primera sonda incluye solo desoxirribonucleótidos y después de la hibridación de la primera sonda con la molécula de ARNm da como resultado un híbrido ADN:ARN.

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

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

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

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

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

En algunas modalidades, una primera sonda incluye al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3'. En tales casos, un segundo oligonucleótido de sonda comprende un nucleótido fosforilado en el extremo 5'. En algunas modalidades, 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 limitante 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 modalidades, una primera sonda incluye una secuencia auxiliar que no se hibrida con un analito. En algunas modalidades, la secuencia auxiliar puede usarse para hibridar con sondas adicionales.

(ii) Segunda sonda

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción incluyen una segunda sonda. Como se usa en la presente descripción, una "segunda sonda" puede referirse a una sonda que hibrida con todo 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 modalidades, la "segunda sonda" puede usarse indistintamente con el "segundo oligonucleótido de sonda." Un experto en la técnica apreciará que el orden de las sondas es arbitrario, y por lo tanto los contenidos de la primera sonda y/o segunda sonda como se describe en la presente descripción son intercambiables.

En algunas modalidades, la segunda sonda incluye ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos que son capaces de participar en interacciones de tipo Watson-Crick o de pares de bases análogas. En algunas modalidades, la segunda sonda incluye desoxirribonucleótidos. En algunas modalidades, la segunda sonda incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. En algunas modalidades, 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 modalidades, la porción de la segunda sonda que no es un ácido desoxirribonucleico es un ácido ribonucleico o cualquier otro ácido nucleico no ácido desoxirribonucleico como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades 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 modalidades, la segunda sonda incluye solo desoxirribonucleótidos y, tras la hibridación de la primera sonda con la molécula de ARNm, da como resultado un híbrido ADN:ARN.

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



aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 45 nucleótidos, o aproximadamente 45 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos).

En algunas modalidades, una segunda sonda incluye una secuencia del dominio de captura de la sonda de  
 5 captura. Como se usa en la presente descripción, un "dominio de captura de la 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 modalidades, el "dominio de captura del dominio de captura" puede usarse indistintamente con el "dominio de unión de la sonda de captura." En algunas modalidades, 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 la sonda de captura.

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

En algunas modalidades, una segunda sonda incluye un nucleótido fosforilado en el extremo 5'. El nucleótido  
 25 fosforilado en el extremo 5' puede usarse en una reacción de ligazón para ligar la segunda sonda a la primera sonda.

Como se muestra en la Figura 6, un ejemplo no limitante de una segunda sonda 604, que puede denominarse 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 la sonda de captura 606.

30 En algunas modalidades, una segunda sonda incluye una secuencia auxiliar que no se hibrida con un analito. En algunas modalidades, la secuencia auxiliar puede usarse para hibridar con sondas adicionales.

### (iii) Múltiples sondas

En algunas modalidades, los métodos de captura de ARN diana como se describe en la presente descripción incluyen múltiples oligonucleótidos de sonda. En algunas modalidades, los métodos incluyen 2, 3, 4 o más  
 35 oligonucleótidos de sonda. En algunas modalidades, cada uno de los oligonucleótidos de sonda incluye ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos que son capaces de participar en interacciones de tipo Watson-Crick o de pares de bases análogas. En algunas modalidades, cada uno de los oligonucleótidos de sonda incluye desoxirribonucleótidos. En algunas modalidades, cada uno de los oligonucleótidos de sonda incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos.

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

En algunos casos, los métodos incluyen una primera sonda y se usan múltiples segundas sondas (o viceversa), con las múltiples segundas sondas que se hibridan con diferentes secuencias (por ejemplo, secuencia de tipo silvestre frente a mutante, diferentes isoformas, variantes de corte y empalme) para identificar la secuencia de un analito. Se aprecia que este método puede utilizarse para detectar mutaciones únicas (por ejemplo, mutaciones puntuales, SNP, variantes de corte y empalme, etc.) o puede mutaciones multinucleotídicas (por ejemplo, inserciones, eliminaciones, etc.).

Los métodos proporcionados en la presente descripción pueden aplicarse a una única 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 primeros oligonucleótidos de sonda y una pluralidad de segundos oligonucleótidos de sonda. En algunos casos, una o más regiones diana de moléculas de ácido nucleico de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico pueden comprender la misma secuencia. La primera y segunda regiones diana (por ejemplo, la primera y segunda secuencias diana) de una molécula de ácido nucleico de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico pueden ser adyacentes entre sí.

10 (iv) Primera sonda que tiene una secuencia enlazadora

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

15 Como se usa en la presente descripción, una "secuencia enlazadora" 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 se disponen entre secuencias que hibridan con un analito, secuencias que unen las secuencias específicas del analito de una sonda). En algunas modalidades, un enlazador incluye una secuencia que no es sustancialmente complementaria a la secuencia del analito diana o a las secuencias específicas del analito de una primera sonda, una segunda sonda o una sonda de extensión. En algunas modalidades, la secuencia enlazadora incluye ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o nucleótidos sintéticos, donde la secuencia dentro del enlazador no es sustancialmente complementaria al analito diana o las secuencias específicas del analito de una primera sonda, una segunda sonda, o una sonda de extensión.

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

25 En algunas modalidades, una secuencia enlazadora incluye una secuencia de código de barras que sirve como un proxy para identificar el analito. En algunas modalidades, la secuencia de código de barras es una secuencia que es al menos 70 % idéntica (por ejemplo, al menos 75 % idéntica, al menos 80 % idéntica, al menos 85 % idéntica, al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica o al menos 99 % idéntica) a una secuencia en el analito. En algunas modalidades donde una secuencia enlazadora incluye una secuencia de código de barras, la secuencia de código de barras se ubica 5' a la secuencia enlazadora. En algunas modalidades donde una secuencia enlazadora incluye una secuencia de código de barras, la secuencia de código de barras se ubica 3' a la secuencia enlazadora. En algunas modalidades, la secuencia de código de barras se dispone entre dos secuencias enlazadoras. En tales casos, las dos secuencias enlazadoras que flanquean la secuencia de código de barras pueden considerarse parte de la misma secuencia enlazadora.

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

35 Un ejemplo no limitante de un método para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica incluye una primera sonda que incluye una secuencia enlazadora 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 enlazadora; (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 la sonda de captura que es capaz de unirse a un dominio de captura de una sonda de captura; (c) hibridar la primera sonda y la segunda sonda con el analito; (d) unir la primera sonda y la segunda sonda, crear de esta manera un producto de ligazón; (e) liberar el producto de ligazón del analito; (f) hibridar el dominio de unión de la sonda de captura con un dominio de captura; y (g) determinar (i) toda o parte de la secuencia del producto de ligazón unido

específicamente al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) toda o 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.

5 Un ejemplo no limitante de un método para identificar una ubicación de un analito en una muestra biológica donde el método incluye una primera sonda que incluye un enlazador y una segunda sonda puede incluir los componentes como se muestra en la Figura 8. Una primera sonda 801 incluye una secuencia funcional 802, una primera secuencia 803 esa secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana 804 del analito, una secuencia enlazadora 805; y una segunda secuencia 806 que es sustancialmente complementaria 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 la sonda de captura 811 que es capaz de unirse a un dominio de captura de una sonda  
10 de captura.

1) Primera sonda

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

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

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

En algunas modalidades donde una primera sonda incluye un enlazador, la primera sonda incluye una secuencia que es de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos (por ejemplo, una secuencia de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 250 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, aproximadamente 10  
30 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 250 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 250 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 150  
35 nucleótidos, aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 250 nucleótidos, aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos a aproximadamente 250 nucleótidos, o aproximadamente 250 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos).

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

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

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

15

2) Segunda sonda

En algunas modalidades donde una primera sonda incluye una secuencia enlazadora, una segunda sonda incluye una secuencia que es sustancialmente complementaria a una tercera secuencia diana del analito y un dominio de captura de la sonda de captura que es capaz de unirse a un dominio de captura de una sonda de captura. En algunas modalidades donde una primera sonda incluye un enlazador, una segunda sonda incluye una secuencia que es de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en la presente descripción.

20

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

25

En algunas modalidades donde una primera sonda incluye una secuencia enlazadora, una primera secuencia diana no es adyacente a una segunda secuencia diana. Por ejemplo, la primera secuencia diana y la segunda secuencia diana se ubican en diferentes exones de la misma molécula de ARNm. En otro ejemplo, la primera secuencia diana y la segunda secuencia diana se ubican en el mismo exón de la misma molécula de ARNm pero no son adyacentes. En algunos casos, la primera sonda y la segunda sonda se hibridan con secuencias que separan 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.

30

En algunas modalidades donde una primera sonda incluye una secuencia enlazadora, una segunda secuencia diana es directamente adyacente a una tercera secuencia diana.

35

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

40

(v) Segunda sonda que tiene un enlazador

También se proporcionan en la presente descripción 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 enlazadora. El uso de un par de sondas donde la segunda sonda incluye una secuencia enlazadora

permite una mayor flexibilidad en el diseño de sondas RTL, principalmente al aumentar las secuencias dentro del analito que pueden usarse como secuencias diana opcionales.

Un ejemplo no limitante 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 enlazador 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 sonda son sustancialmente complementarias a las 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 enlazadora; (iii) una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a una tercera secuencia diana del analito; y (iv) un dominio de unión de la sonda de captura que es capaz de unirse a un dominio de captura de una sonda de captura; (c) hibridar la primera sonda y la segunda sonda con el analito; (d) unir la primera sonda y la segunda sonda, crear de esta manera un producto de ligazón; (e) liberar el producto de ligazón del analito; (f) hibridar el dominio de unión de la sonda de captura con un dominio de captura; y (g) determinar (i) toda o parte de la secuencia del producto de ligazón unido específicamente al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) toda o 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 limitante 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 enlazador puede incluir los componentes 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 enlazadora 908; y una segunda secuencia 909 que es sustancialmente complementaria a una segunda secuencia diana 910 del analito, y un dominio de captura de la sonda de captura 911 que es capaz de unirse a un dominio de captura de una sonda de captura.

#### 1) Primera sonda

En algunas modalidades donde una segunda sonda incluye una secuencia enlazadora, una primera sonda incluye una secuencia que es sustancialmente complementaria a una primera secuencia diana del analito.

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

En algunas modalidades donde un enlazador está en una segunda sonda, una primera sonda incluye una secuencia que es de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en la presente descripción.

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

En algunas modalidades donde una segunda sonda incluye una secuencia enlazadora, una primera sonda incluye al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3'. En algunas modalidades, 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'.

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

2) Segunda sonda

10 En algunas modalidades donde un enlazador 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 enlazadora (por ejemplo, cualquiera de las secuencias enlazadoras ilustrativas descritas en la presente descripción); (iii) una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a la tercera secuencia diana del analito; y (iv) un dominio de captura de la sonda de captura (por ejemplo, cualquiera de los dominios de captura de la sonda de captura ilustrativos descritos en la presente descripción) que es capaz de unirse a un dominio de captura de una sonda de captura.

15 En algunas modalidades donde una segunda sonda incluye una secuencia enlazadora, la segunda sonda incluye una secuencia que es de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en la presente descripción.

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

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

35 En algunas modalidades donde una segunda sonda incluye una secuencia enlazadora, una segunda secuencia diana no es adyacente a una tercera secuencia diana en la molécula de ARNm. Por ejemplo, la segunda secuencia diana y la tercera secuencia diana se ubican en diferentes exones de la misma molécula de ARNm. En otro ejemplo, la segunda secuencia diana y la tercera secuencia diana se ubican en el mismo exón de la misma molécula de ARNm pero no son adyacentes.

En algunas modalidades donde una segunda sonda incluye una secuencia enlazadora, una primera secuencia diana es directamente adyacente a una segunda secuencia diana.

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

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

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

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

También se proporcionan en la presente descripción 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 RTL, principalmente al aumentar las secuencias dentro del analito que pueden usarse como secuencias diana opcionales. En algunos casos, el uso de una sonda de extensión también puede usarse para interrogar las variantes (por ejemplo, variantes de corte y empalme) que abarcan mayores distancias que pueden interrogarse mediante el uso de una primera o segunda sonda con una secuencia enlazadora.

Un ejemplo no limitante 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 la 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 sondas de extensión al analito; (d) ligar la primera sonda, una o más sondas de extensión, y la segunda sonda, crear de esta manera un producto de ligazón que es sustancialmente complementario al analito; (e) liberar el producto de ligazón del analito; (f) hibridar el dominio de unión de la sonda de captura con un dominio de captura; y (g) determinar (i) toda o parte de la secuencia del producto de ligazón unido específicamente al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) toda o 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 limitante 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 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 enlazadora 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 la sonda de captura 1014.

(i) Primera sonda

En algunas modalidades 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 modalidades, una secuencia de la primera sonda es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % complementaria a una primera porción del analito. En algunas modalidades, la secuencia de la primera sonda que es sustancialmente complementaria a una primera porción del analito puede incluir una secuencia que es de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, o cualquiera de los subintervalos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, la primera sonda incluye una secuencia funcional. En algunas modalidades, la secuencia funcional es una secuencia de cebador.

En algunas modalidades 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 modalidades, 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'.

5 En algunas modalidades 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.

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

15 (ii) Sonda de extensión

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

25 En algunas modalidades, la secuencia funcional incluye una secuencia de código de barras. En algunas modalidades, la sonda de extensión puede incluir un enlazador y una secuencia de código de barras. En tales casos, las secuencias enlazadoras pueden flanquear el código de barras, el código de barras puede ser 5' a una secuencia enlazadora, o el código de barras puede ser 3' a una secuencia enlazadora. En algunas modalidades, una secuencia de código de barras está flanqueada por una secuencia enlazadora 5' (por ejemplo, cualquiera de las secuencias enlazadoras ilustrativas descritas en la presente descripción) y una secuencia enlazadora 3' (por ejemplo, cualquiera de las secuencias enlazadoras ilustrativas descritas en la presente descripción).

30 En algunas modalidades, la sonda de extensión incluye de 5' a 3': una primera secuencia, una secuencia enlazadora 5', un código de barras, una secuencia enlazadora 3' y una segunda secuencia.

En algunas modalidades, las sondas de extensión incluyen una secuencia que es de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos o cualquiera de los subintervalos descritos en la presente descripción.

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

40 En algunas modalidades, 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.

En algunas modalidades, la primera secuencia diana del analito y la segunda diana del analito se ubican dentro del mismo exón. En tales casos, la primera secuencia diana y la segunda secuencia diana no son directamente adyacentes.

En algunas modalidades, 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 modalidades, la primera secuencia diana del analito y la segunda secuencia diana del analito se ubican en diferentes exones del mismo gen.

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

(iii) Segunda sonda

- En algunas modalidades 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 la sonda de captura (por ejemplo, cualquiera de los dominios de captura de la sonda de captura ilustrativos  
15 descritos en la presente descripción).

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

- En algunas modalidades 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  
25 sonda de extensión. En algunas modalidades, la sonda de extensión incluye al menos dos ácidos ribonucleicos basados en el extremo 3', la primera sonda incluye al menos dos ácidos ribonucleicos en el extremo 3', o ambos. En algunas modalidades, 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.

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

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

- También se proporcionan en la presente descripción 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 RTL, principalmente al aumentar las secuencias dentro del analito que pueden usarse como secuencias  
40 diana opcionales. En algunos casos, el uso de dos o más sondas de extensión también puede usarse para interrogar las variantes (por ejemplo, variantes de corte y empalme) que abarcan mayores distancias que pueden interrogarse mediante el uso de una sonda de extensión.

Un ejemplo no limitante 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 la sonda de captura, y en donde la primera 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 al analito; (d) ligar la primera sonda, una o más sondas de extensión, y la segunda sonda, crear de esta manera un producto de ligazón que es sustancialmente complementario al analito; (e) liberar el producto de ligazón del analito; (f) hibridar el dominio de unión de la sonda de captura con un dominio de captura; y (g) determinar (i) toda o parte de la secuencia del producto de ligazón unido específicamente al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) toda o 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 modalidades, 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, 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 modalidades donde el método incluye dos (o más) sondas de extensión, la primera secuencia diana se ubica en un primer exón, la segunda secuencia diana se ubica en un segundo exón, y la tercera secuencia diana y la cuarta secuencia diana se ubican en un tercer exón. En algunas modalidades donde el método incluye dos (o más) sondas de extensión, la primera secuencia diana se ubica en un primer exón, la segunda secuencia diana se ubica en un segundo exón, y la tercera secuencia diana se ubica en un tercer exón, y la cuarta secuencia diana se ubica en un cuarto exón. En algunas modalidades donde el método incluye dos (o más) sondas de extensión, la primera secuencia diana y las segundas secuencias diana se ubican en un primer exón, y la tercera secuencia diana y la cuarta secuencia diana se ubican en un segundo exón. En algunas modalidades donde el método incluye dos (o más) sondas de extensión, la primera secuencia diana y las segundas secuencias diana se ubican en un primer exón, y la tercera secuencia diana se ubica en un segundo exón, y la cuarta secuencia diana se ubica en un tercer exón.

En algunas modalidades, 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 la una o más sondas de extensión adicionales, y la una o más sondas de extensión adicionales que abarcan oligonucleótidos a la segunda sonda, crear de esta manera un producto de ligazón que incluye una o más secuencias que son sustancialmente complementarias al analito. En algunas modalidades, donde los métodos incluyen dos (o más) sondas de extensión, el método incluye ligar: la primera sonda a la 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, crear de esta manera un producto de ligazón que incluye una o más secuencias que son sustancialmente complementarias al analito.

En algunas modalidades, cada sonda de extensión adicional puede incluir una secuencia funcional (por ejemplo, cualquiera de la secuencia funcional descrita en la presente descripción). Por ejemplo, cada sonda de extensión adicional puede incluir una secuencia enlazadora (por ejemplo, cualquiera de las secuencias enlazadoras ilustrativas descritas en la presente descripción). 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 ilustrativas descritas en la presente descripción) y una secuencia enlazadora (por ejemplo, cualquiera de las secuencias enlazadoras descritas en la presente descripción). En algunas modalidades donde una sonda de extensión adicional incluye un código de barras y un enlazador, unas secuencias enlazadoras pueden flanquear el código de barras, el código de barras puede ser 5' a una secuencia enlazadora, o el código de barras puede ser 3' a una secuencia enlazadora. En algunas modalidades, una secuencia de código de barras está flanqueada por una secuencia enlazadora 5' (por ejemplo, cualquiera de las secuencias enlazadoras ilustrativas descritas en la presente descripción) y una secuencia enlazadora 3' (por ejemplo, cualquiera de las secuencias enlazadoras ilustrativas descritas en la presente descripción). En algunas modalidades, una sonda de extensión adicional puede incluir de 5' a 3': una primera secuencia, una secuencia enlazadora 5', un código de barras, una secuencia enlazadora 3' y una segunda secuencia.

(d) Métodos prehibridación

## (i) Obtención de imágenes y tinción

Antes de añadir las sondas, en algunos casos, las muestras biológicas pueden teñirse mediante el uso de una amplia variedad de manchas y técnicas de tinción. En algunos casos, la muestra biológica es una sección en un portaobjetos (por ejemplo, una sección de 10 µm). En algunos casos, la muestra biológica se seca después de colocarla en un portaobjetos de vidrio. En algunos casos, la muestra biológica se seca a 42 °C. En algunos casos, el secado ocurre 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 secador a temperatura ambiente).

En algunas modalidades, una muestra puede teñirse mediante el uso de cualquier número de tinciones biológicas, que incluyen, pero no se limitan a, naranja acridina, marrón Bismarck, carmín, azul coomassie, violeta cresilica, DAPI, eosina, bromuro de etidio, fucsina ácida, hematoxilina, tinciones Hoechst, yodo, verde metilo, azul de metileno, rojo neutro, azul Nilo, rojo Nilo, tetróxido de osmio, yoduro de propio, rodamina o safranina. En algunos casos, los métodos descritos en la presente descripción incluyen obtener imágenes de la muestra biológica. En algunos casos, la obtención de imágenes de la muestra se produce antes de desaminar la muestra biológica. En algunos casos, la muestra puede teñirse mediante el uso de técnicas de tinción conocidas, que incluyen Can-Grunwald, Giemsa, hematoxilina y eosina (H&E), Jenner, Leishman, tricromo de Masson, Papanicolaou, Romanowsky, plata, Sudán, Wright, y/o técnicas de tinción con Ácido Periódico Schiff (PAS). La tinción con PAS se realiza típicamente después de la fijación de formalina o acetona. En algunos casos, la mancha es una mancha de H&E.

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

En algunas modalidades, las muestras biológicas pueden decolorarse. Los métodos para decolorar o que decoloran una muestra biológica se conocen en la técnica, y generalmente dependen de la naturaleza de la mancha(s) aplicada a la muestra. Por ejemplo, la tinción con H&E puede decolorarse al lavar la muestra en HCl, o cualquier otro ácido (por ejemplo, ácido selénico, ácido sulfúrico, ácido hidroyódico, ácido benzoico, ácido carbónico, ácido málico, ácido fosfórico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido sulfuroso, ácido tricloroacético, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido ortofosfórico, ácido arsénico, ácido selenoso, ácido crómico, ácido cítrico, ácido fluorhídrico, ácido nitroso, ácido isocianico, ácido fórmico, selenuro de hidrógeno, ácido molíbdico, ácido láctico, ácido acético, ácido carbónico, sulfuro de hidrógeno, o sus combinaciones). En algunas modalidades, la decoloración puede incluir 1, 2, 3, 4, 5 o más lavados en un ácido (por ejemplo, HCl). En algunas modalidades, la decoloración puede incluir añadir HCl a una solución aguas abajo (por ejemplo, solución de permeabilización). En algunas modalidades, la decoloración puede incluir disolver una enzima usada en los métodos descritos (por ejemplo, pepsina) en una solución ácida (por ejemplo, HCl). En algunas modalidades, después de decolorar la hematoxilina con un ácido, pueden añadirse otros reactivos a la solución de decoloración para elevar el pH para su uso en otras aplicaciones. Por ejemplo, la SDS puede añadirse a una solución de tinción de ácido para elevar el pH en comparación con la solución de tinción de ácido sola. Como otro ejemplo, en algunas modalidades, se aplican una o más tinciones de inmunofluorescencia a la muestra mediante acoplamiento de anticuerpos. Tales manchas pueden eliminarse mediante el uso de técnicas tales como escisión de enlaces disulfuro mediante el tratamiento con un agente reductor y lavado con detergente, tratamiento con sal caotrópica, tratamiento con solución de recuperación de antígeno y tratamiento con un tampón de glicina ácida. Los métodos para la tinción y decoloración multiplexadas se describen, por ejemplo, en Bolognesi y otros, *J. Histochem. Cytochem.* 2017; 65(8): 431-444, Lin y otros, *Nat Commun.* 2015; 6:8390, Pirici y otros, *J. Histochem. Cytochem.* 2009; 57:567–75, y Glass y otros, *J. Histochem. Cytochem.* 2009; 57:899–905.

En algunas modalidades, los protocolos de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica (técnicas de tinción directa e indirecta) pueden realizarse como parte de, o además de, los flujos de trabajo espaciales ilustrativos presentados en la presente descripción. Por ejemplo, las secciones de tejido pueden fijarse de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. La muestra biológica puede transferirse a una matriz (por ejemplo, matriz de sondas de captura), en donde los analitos (por ejemplo, proteínas) se sondan mediante el

5 uso de protocolos de inmunofluorescencia. Por ejemplo, la muestra puede rehidratarse, bloquearse y permeabilizarse (SSC 3X, BSA 2 %, Tritón X 0,1 %, inhibidor de ARNasa 1 U/μl durante 10 minutos a 4 °C) antes de tefirse con anticuerpos primarios fluorescentes (1:100 en 3XSSC, BSA 2 %, Tritón X 0,1 %, inhibidor de ARNasa 1 U/μl durante 30 minutos a 4 °C). La muestra biológica puede lavarse, cubrirse con cubreobjetos (en glicerol + inhibidor de ARNasa de 1 U/μl), obtener imágenes (por ejemplo, mediante el uso de un microscopio confocal u otro aparato capaz de detección fluorescente), lavarse y procesarse de acuerdo con la captura de analito o flujos de trabajo espaciales descritos en la presente descripción.

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

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

15 En algunas modalidades, la optimización de la permeabilización puede ser útil 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 tisular se discute en otra parte en la presente descripción.

20 En algunas modalidades, bloquear una matriz y/o una muestra biológica en preparación para marcar la muestra biológica disminuye la unión inespecífica de los anticuerpos a la matriz y/o muestra biológica (disminuye el ruido de fondo). Algunas modalidades proporcionan tampones de bloqueo/soluciones de bloqueo que pueden aplicarse antes y/o durante la aplicación de la etiqueta, en donde el tampón de bloqueo puede incluir un agente de bloqueo y opcionalmente un surfactante y/o una solución salina. En algunas modalidades, un agente de bloqueo puede ser albúmina sérica bovina (BSA), suero, gelatina (por ejemplo, gelatina de pescado), leche (por ejemplo, leche seca sin grasa), caseína, polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), o polivinilpirrolidona (PVP), reactivo de bloqueo de biotina, un reactivo de bloqueo de peroxidasa, levamisol, solución de Carnoy, glicina, lisina, borohidruro de sodio, azul cielo de pontamina, negro de Sudán, azul de tripán, agente de bloqueo de FITC y/o ácido acético. La tampón de bloqueo/solución de bloqueo puede aplicarse a la matriz y/o muestra biológica antes y/o durante el etiquetado (por ejemplo, la 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 mediante el uso de 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 varias concentraciones de etanol. En algunos casos, los métodos de desparafinación incluyen el tratamiento de xileno (por ejemplo, tres lavados a 5 minutos cada uno). En algunos casos, los métodos incluyen además tratamiento con etanol (por ejemplo, 100 % de etanol, dos lavados de 10 minutos cada uno; 95 % de etanol, dos lavados de 10 minutos cada uno; 70 % de etanol, dos lavados de 10 minutos cada uno; 50 % de etanol, dos lavados de 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 durante 5 minutos cada uno). Se aprecia que un experto en la técnica puede ajustar estos métodos para optimizar la desparafinación.

35 En algunos casos, la muestra biológica se desentrecruza. En algunos casos, la muestra biológica se desentrecruza en una solución 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, el desentrecruzamiento ocurre a aproximadamente 50 °C a aproximadamente 80 °C. En algunos casos, el desentrecruzamiento se produce a aproximadamente 70 °C. En algunos casos, el desentrecruzamiento ocurre por aproximadamente 1 hora a 70 °C. Justo antes del desentrecruzamiento, la muestra biológica puede tratarse con un ácido (por ejemplo, HCl 0,1 M durante aproximadamente 1 minuto). Después de la etapa de desentrecruzamiento, la muestra biológica puede lavarse (por ejemplo, con PBST 1x).

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

En algunos casos, los métodos para preparar una muestra biológica para la aplicación de la sonda incluyen etapas para equilibrar y bloquear la muestra biológica. En algunos casos, el equilibrio se realiza mediante el uso de un tampón de prehibridación (pre-Hib). En algunos casos, el tampón pre-Hib está libre de ARNasa. En algunos casos, el tampón pre-Hib no contiene albúmina sérica bovina (BSA), soluciones como la de Denhardt u otros materiales biológicos potencialmente contaminados con nucleasas.

5

En algunos casos, la etapa de equilibrio se realiza múltiples veces (por ejemplo, 2 veces a 5 minutos cada una; 3 veces a 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 de levadura de aparato (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.

10

Cualquiera de las etapas anteriores puede optimizarse para el rendimiento. Por ejemplo, uno puede variar 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, al variar los plazos proporcionados en la presente descripción).

(e) Hibridación de las sondas

15

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

20

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 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 (Hib). En algunos casos, los conjuntos de sondas están a una concentración de 5 nM en tampón Hib.

25

En algunos casos, la hibridación de la sonda se produce a aproximadamente 50 °C. En algunos casos, la temperatura de hibridación de la sonda tiene un intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 75 °C, de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, 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 ocurre por 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.

35

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 MgCl<sub>2</sub>, sal de Na por ejemplo NaCl, sal de Mn por ejemplo MnCl<sub>2</sub>. En algunos casos, el tampón de hibridación incluye la solución de Denhardt, sulfato de dextrano, ficol, PEG u otros aceleradores de 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 bloqueantes. En algunos casos, el tampón de hibridación incluye inhibidor(es) de ARNasa. En algunos casos, el tampón de hibridación puede incluir BSA, bloqueantes específicos de secuencia, bloqueantes inespecíficos, EDTA, inhibidor(es) de ARNasa, betaína, TMAC o DMSO.

40

En algunos casos, un tampón de hibridación puede incluir además detergentes tales como Tween, Tritón-X 100, sarkosyl y SDS. En algunos casos, el tampón de hibridación incluye agua libre de nucleasas, agua DEPC.

En algunas modalidades, las secuencias complementarias a las que se unen el primer oligonucleótido de sonda y el segundo oligonucleótido de sonda son 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 alejados entre sí. Los espacios entre los oligonucleótidos de sonda pueden llenarse primero antes de la ligazón, mediante el uso de, por ejemplo, Mu polimerasa, ADN polimerasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa, VENT polimerasa, Taq polimerasa y/o cualquiera de sus combinaciones, derivados y variantes (por ejemplo, mutantes modificados genéticamente). En algunas modalidades, cuando el primer y segundo oligonucleótidos de sonda se separan entre sí por uno o más nucleótidos, los nucleótidos se ligan entre el primer y segundo oligonucleótidos de sonda. En algunas modalidades, cuando el primer y segundo oligonucleótidos de sonda se separan entre sí por uno o más nucleótidos, los desoxirribonucleótidos se ligan entre el primer y segundo oligonucleótidos de sonda.

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.

Se proporcionan modalidades adicionales con respecto a la hibridación de la sonda.

(i) Temperaturas de hibridación

En algunas modalidades, el método descrito utiliza oligonucleótidos que incluyen ácidos desoxirribonucleicos (en lugar de utilizar estrictamente ribonucleótidos) en el sitio de la ligazón. El uso de ácidos desoxirribonucleicos en los métodos descritos en la presente descripción crea una eficiencia más uniforme que puede controlarse fácilmente y ser flexible para diversas aplicaciones.

En un ejemplo no limitante, los métodos descritos en la presente descripción 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 complementarias 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) al analito a una primera temperatura; hibridar el primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) y el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda) a un tercer oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido de 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) colindan entre sí; ligar el primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) al segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda) para crear un producto de ligazón; poner en contacto la muestra biológica con un sustrato, en donde una sonda de captura se inmoviliza en el sustrato, en donde la sonda de captura incluye un código de barras espacial y un dominio de captura; permitir que el producto de ligazón se una específicamente al dominio de captura; y determinar (i) toda o parte de la secuencia del producto de ligazón unido específicamente al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) toda o 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.

Un ejemplo no limitante de este método se muestra en la Figura 11. 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 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. Como se muestra en la Figura 11, la primera y segunda secuencias diana no son directamente adyacentes en el analito. Después de la hibridación, las primera y segunda sondas no unidas se lavan. 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 ligazón que incluye la primera secuencia de la sonda y la segunda secuencia de la sonda. Alternativamente, en lugar de extender la primera sonda, el tercer oligonucleótido se usa para "unir" la primera sonda y la segunda sonda juntas. En tales casos, la primera sonda y la segunda sonda unidas entre sí por el tercer oligonucleótido pueden denominarse producto de ligazón. El producto de ligazón entonces se pone en contacto con un sustrato 1111, y el producto de ligazón se une a una sonda de captura 1113 del sustrato 1111 en la matriz en distintas posiciones espaciales. En algunas modalidades, la muestra biológica se pone en contacto con el sustrato 1111 antes de entrar en contacto con la primera sonda y la segunda sonda.

En algunas modalidades, 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 modalidades, la primera temperatura tiene un intervalo de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 75 °C, de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, la primera temperatura es 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 modalidades, después de la etapa de hibridación del 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 eliminar los oligonucleótidos no unidos (por ejemplo, sondas). La etapa de lavado puede realizarse mediante el uso de cualquiera de los métodos y soluciones de lavado descritos en la presente descripción.

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

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

En algunas modalidades, 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 modalidades, la segunda temperatura es menor que la primera temperatura a la que el primer y segundo oligonucleótidos (por ejemplo, la primera y segunda sondas) se unen al analito. En algunas modalidades, la segunda temperatura tiene un intervalo de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 35 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, o de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C. En algunas modalidades, la primera temperatura es 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. Los métodos que incluyen un tercer oligonucleótido, o férula, se han descrito en la patente de Estados Unidos Pub. núm. 2019/0055594A1.

En algunas modalidades, después de la etapa de hibridar el tercer oligonucleótido con el analito, se realiza una etapa de lavado para eliminar los terceros oligonucleótidos no unidos. La etapa de lavado puede realizarse mediante el uso de cualquiera de los métodos y soluciones de lavado descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, después de la etapa de lavado, el primer y segundo oligonucleótidos (por ejemplo, la primera y segunda sondas) se unen a (por ejemplo, se hibridan a) el analito, y el tercer oligonucleótido se une a (por ejemplo, se hibrida a) el primer y segundo oligonucleótidos (por ejemplo, en porciones de la primera y segunda sondas que no se unen al analito).

En algunas modalidades, 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 modalidades, 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 modalidades donde un tercer oligonucleótido se hibrida con una primera sonda y una segunda sonda que se hibridan con secuencias diana que no son directamente adyacentes en el analito, el tercer oligonucleótido se extiende para llenar el espacio entre la primera sonda 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 ligazón. Por ejemplo, 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 modalidades, se realiza una etapa de ligazón. La ligazón puede realizarse mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, la etapa incluye la ligazón del primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) y el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda), que forma un producto de ligazón. En algunas modalidades, el tercer oligonucleótido sirve como una férula de oligonucleótidos para facilitar la unión del primer oligonucleótido (por ejemplo, la primera sonda) y el segundo oligonucleótido (por ejemplo, la segunda sonda). En algunas modalidades, la ligazón es una ligazón química. En algunas modalidades, la ligazón es la ligazón enzimática. En algunas modalidades, la ligasa es una ligasa de ARN de T4 (Rnl2), una ligasa SplintR, una ligasa de ADN de una sola hebra o una ligasa de ADN de T4.

#### 25 (ii) Tampón de hibridación

En algunas modalidades, 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 humana y es un peligro conocido para la salud. Químicamente, puede oxidarse con el tiempo, afectar de esta manera la vida útil del reactivo y, lo que es más importante, la eficacia del reactivo. Como tal, los métodos descritos en la presente descripción pueden incluir tampones libres de formamida, que incluyen tampón de hibridación libre de formamida.

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

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

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

En algunas modalidades, el tampón de hibridación SSC está a una temperatura de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C (por ejemplo, aproximadamente 40 °C a aproximadamente 55 °C, aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C, aproximadamente 40 °C a aproximadamente 45 °C, aproximadamente 45 °C a aproximadamente 60 °C, aproximadamente 45 °C a aproximadamente 55 °C, aproximadamente 45 °C a aproximadamente 50 °C, aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C, aproximadamente 50 °C a aproximadamente 55 °C, o aproximadamente 55 °C a aproximadamente 60 °C). En algunas modalidades, el tampón de hibridación SSC está a una temperatura de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 55 °C, o cualquiera de los subintervalos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, el tampón de hibridación SSC está a una temperatura de 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 modalidades, el tampón de hibridación SSC está a una temperatura de aproximadamente 50 °C.

En algunas modalidades, el tampón de hibridación SSC comprende además uno o más de un portador, un aglomerante o un aditivo. Los ejemplos no limitantes 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 limitantes de un aglomerante molecular que puede incluirse en el tampón de hibridación incluyen: Ficoll, dextrano, solución de Denhardt y PEG. Los ejemplos no limitantes de aditivos que pueden incluirse en el tampón de hibridación incluyen: bloqueantes de unión, inhibidores de ARNasa, ajustadores de Tm y adyuvantes para estructuras de ácidos nucleicos secundarias relajadas (por ejemplo, betaina, TMAC y DMSO). Además, un tampón de hibridación puede incluir detergentes tales como SDS, Tween, Tritón-X 100 y sarkosyl (por ejemplo, sal de N-lauroilsarcosina sódica). Un experto en la técnica comprendería que un tampón para la hibridación de ácidos nucleicos podría incluir muchos compuestos diferentes que podrían mejorar la reacción de hibridación.

(f) Lavado

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción también incluyen una etapa de lavado. La etapa de lavado elimina cualquier sonda no unida. Las etapas de lavado podrían realizarse entre cualquiera de las etapas en los métodos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, puede realizarse una etapa de lavado después de añadir sondas a la muestra biológica. Como tal, las sondas libres/no unidas se lavan, lo que deja solo las sondas que se han hibridado con un analito. En algunos casos, se producen múltiples (es decir, al menos 2, 3, 4, 5 o más) etapas de lavado entre los métodos descritos en la presente descripción. Las etapas de lavado pueden realizarse en momentos (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 mediante el uso de 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 la presente descripción se proporcionan modalidades adicionales con respecto a las etapas de lavado.

(i) Tampón de lavado libre de formamida

En algunas modalidades, después de ligar una primera sonda y una segunda sonda, la una o más primeras sondas no hibridadas, una o más segundas sondas no hibridadas, o ambas, se eliminan de la matriz. En algunas modalidades, después de ligar una primera sonda, una o más sondas de extensión, y una segunda sonda, la

una o más primera, segunda y/o sondas de extensión no híbridadas, se eliminan de la matriz. En algunas modalidades, después de ligar una primera sonda, una segunda sonda y un tercer oligonucleótido, la una o más primeras sondas no híbridadas, una o más segundas sondas no híbridadas, o uno o más terceros oligonucleótidos, o todos los anteriores, se eliminan de la matriz.

<sup>5</sup> En algunas modalidades, se usa un tampón de prehibridación para lavar la muestra. En algunas modalidades, se usa un tampón fosfato. En algunas modalidades, se realizan múltiples etapas de lavado para eliminar oligonucleótidos no unidos.

En algunas modalidades, eliminar incluye lavar la una o más sondas no híbridadas (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.

En algunas modalidades, el tampón de lavado libre de formamida es un tampón de lavado SSC. En algunas modalidades, el SSC está presente en el tampón de lavado SSC de aproximadamente SSC 0,01x a aproximadamente SSC 1x (por ejemplo, aproximadamente SSC 0,01x a aproximadamente SSC 0,5x, SSC 0,01x a aproximadamente SSC 0,1x, aproximadamente SSC 0,01x a aproximadamente SSC 0,05x, aproximadamente SSC 0,05x a aproximadamente SSC 1x, aproximadamente SSC 0,05x a aproximadamente SSC 0,5x, aproximadamente SSC 0,05x a aproximadamente SSC 0,1x, aproximadamente SSC 0,1x a aproximadamente SSC 1x, aproximadamente SSC 0,1x a aproximadamente SSC 0,5x, o aproximadamente SSC 0,5x a aproximadamente SSC 1x). En algunas modalidades, el SSC está presente en el tampón de lavado SSC a 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 modalidades, el SSC está presente en el tampón de lavado SSC a aproximadamente SSC 0,1x.

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

En algunas modalidades, el tampón de lavado SSC comprende un solvente. En algunas modalidades, el solvente comprende carbonato de etileno. En algunas modalidades, el carbonato de etileno está presente en el tampón de lavado SSC de aproximadamente 10 % (p/v) a aproximadamente 25 % (p/v), o cualquiera de los subintervalos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, el carbonato de etileno está presente en el tampón de lavado SSC de aproximadamente 15 % (p/v) a aproximadamente 20 % (p/v). En algunas modalidades, el carbonato de etileno está presente en el tampón de lavado SSC a aproximadamente 16 % (p/v).

En algunas modalidades, el tampón de lavado SSC está a una temperatura de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C (por ejemplo, aproximadamente 50 °C a aproximadamente 65 °C, aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C, aproximadamente 50 °C a aproximadamente 55 °C, aproximadamente 55 °C

a aproximadamente 70 °C, aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C, aproximadamente 55 °C a aproximadamente 60 °C, aproximadamente 60 °C a aproximadamente 70 °C, aproximadamente 60 °C a aproximadamente 65 °C, o aproximadamente 65 °C a aproximadamente 70 °C). En algunas modalidades, el tampón de lavado SSC está a una temperatura de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el tampón de lavado 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 modalidades, el tampón de lavado SSC está a una temperatura de aproximadamente 60 °C.

<sup>5</sup> En algunas modalidades, el método incluye liberar el producto de ligazón, donde la liberación se realiza después de que se lava la matriz para eliminar la una o más sondas primera y segunda no híbridadas.

(g) ligazón

En algunas modalidades, después de la hibridación de los oligonucleótidos de la 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) puede ligarse entre sí, lo que crea un único producto de ligazón que incluye una o más secuencias complementarias al analito. La ligazón puede realizarse enzimática o químicamente, como se describe en la presente descripción.

En algunos casos, la ligazón es una reacción de ligazón enzimática, mediante el uso de una ligasa (por ejemplo, ligasa de ARN de T4 (Rnl2), una ligasa SplintR, una ligasa de ADN de una sola hebra o una ligasa de ADN de T4). Véase, por ejemplo, Zhang y otros; *RNA Biol.* 2017; 14(1): 36–44, para una descripción de la ligasa KOD. Después de la reacción de ligazón 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.

En algunas modalidades, una polimerasa cataliza la síntesis de una hebra complementaria del producto de ligazón, lo que crea un producto de ligazón de doble hebra. En algunos casos, la polimerasa es ADN polimerasa. En algunas modalidades, la polimerasa tiene actividad polimerasa 5' a 3'. En algunas modalidades, la polimerasa tiene actividad exonucleasa 3' a 5' para la lectura. En algunas modalidades, la polimerasa tiene actividad polimerasa 5' a 3' y actividad exonucleasa 3' a 5' para la lectura.

En algunas modalidades, 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 de manera que, tras la hibridación con el diana y la exposición a condiciones de ligazón apropiadas, los oligonucleótidos de la sonda pueden ligarse entre sí. En algunas modalidades, los oligonucleótidos de sonda que incluyen un resto reactivo se ligan químicamente. Por ejemplo, una primera sonda capaz de hibridarse 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 de sonda capaz de hibridarse con una segunda región diana (por ejemplo, una segunda secuencia diana o una segunda porción) de la molécula de ácido nucleico puede comprender un segundo resto reactivo. Cuando la primera y segunda sondas se hibridan con la primera y segunda regiones diana (por ejemplo, primera y segunda secuencias diana) de la molécula de ácido nucleico, el primero y segundo restos reactivos pueden ser adyacentes entre sí. Un resto reactivo de una sonda puede seleccionarse del grupo no limitante que consiste en azidas, alquilos, nitrones (por ejemplo, 1,3-nitrones), alquenos deformados (por ejemplo, cicloalquenos tales como ciclooctenos u oxanorbornadieno), tetrazinas, tetrazoles, yoduros, tioatos (por ejemplo, fosfortioato), ácidos, aminas y fosfatos. Por ejemplo, el primer resto reactivo de una primera sonda puede comprender un resto de azida, y un segundo resto reactivo de una segunda sonda puede comprender un resto alquilo. El primer y segundo restos reactivos pueden reaccionar para formar un resto de enlace. Una reacción entre el primer y segundo restos reactivos puede ser, por ejemplo, una reacción de cicloadición tal como una cicloadición de azida-alquileo promovida por cepa, una cicloadición de azida-alquileo catalizada por cobre, una cicloadición de alquilo-nitrone promovida por cepa, 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 subestación nucleófila; u otra reacción. En algunos casos, la reacción entre el primero y segundo restos reactivos puede producir un resto de triazol o un resto de isoxazolina. Una reacción entre el primero y segundo restos reactivos puede implicar someter los restos reactivos a condiciones adecuadas tales como una temperatura, pH o presión adecuados y proporcionar uno o más reactivos o catalizadores para la reacción. Por ejemplo, una reacción entre el primero y segundo restos reactivos puede catalizarse mediante un catalizador de cobre, un catalizador

de rutenio, o una especie desmenuzada tal como un difluorooctino, dibencilciclooctino, o biarilazaciclooctinona. La reacción entre un primer resto reactivo de una primera sonda hibridada a 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 de sonda hibridado a una segunda región diana (por ejemplo, una primera secuencia diana o una primera porción) de la molécula de ácido nucleico puede enlazar la primera sonda y la segunda sonda para proporcionar una sonda ligada. Después del enlace, la primera y segunda sonda pueden considerarse ligadas. En consecuencia, la reacción del primer y segundo restos reactivos puede comprender una reacción de ligazón química tal como una reacción química "clic" de azida 5' catalizada por cobre a alquino 3' para formar un enlace triazol entre dos oligonucleótidos de sonda. En otros ejemplos no limitantes, un resto de yoduro puede ligarse químicamente a un resto de fosforotioato para formar un enlace de fosforotioato, un ácido puede ligarse a una amina para formar un enlace de amida, y/o un fosfato y amina pueden ligarse para formar un enlace de fosforamidato.

10

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

15

En algunos casos, la ligazón se realiza en un tampón de ligazón. En los casos donde la ligazón de sondas se realiza en sondas que contienen dirribo, el tampón de ligazón puede incluir tampón de ligasa de ARN de T4 2, enzima (por ejemplo, ligasa de RNL2) y agua libre de nucleasas. En los casos donde la ligazón de sondas se realiza en sondas de ADN, el tampón de ligazón puede incluir Tris-HCl pH7,5, MnCl<sub>2</sub>, ATP, DTT, fluido sustituto (por ejemplo, glicerol), enzima (por ejemplo, ligasa SplintR) y agua libre de nucleasas.

20

En algunas modalidades, el tampón de ligazón incluye reactivos adicionales. En algunos casos, el tampón de ligazón incluye trifosfato de adenosina (ATP) que se añade durante la reacción de ligazón. El sellado catalizado por la ligasa de ADN de los sustratos de ADN con muescas se activa primero a través de la hidrólisis de ATP, lo que da como resultado la adición covalente de un grupo AMP a la enzima. Después de la unión a un sitio con muesca en un dúplex de ADN, la ligasa transfiere el AMP al extremo 5' fosforilado en la muesca, lo que forma un enlace pirofosfato 5'-5'. Finalmente, la ligasa cataliza un ataque en este enlace de pirofosfato por el grupo OH en el extremo 3' de la muesca, lo sella de esta manera, después de lo cual se liberan la ligasa y el AMP. Si la ligasa se desprende del sustrato antes del ataque 3', por ejemplo, debido a la recarga prematura de AMP de la enzima, entonces el AMP 5' se deja en el extremo 5', que bloquea los intentos de ligazón adicionales. En algunos casos, el ATP se añade a una concentración de aproximadamente 1 µM, aproximadamente 10 µM, aproximadamente 100 µM, aproximadamente 1000 µM o aproximadamente 10 000 µM durante la reacción de ligazón.

25

En algunas modalidades, los cofactores que ayudan a la unión de los oligonucleótidos de sonda se añaden durante el proceso de ligazón. En algunos casos, los cofactores incluyen iones magnesio (Mg<sup>2+</sup>). En algunos casos, los cofactores incluyen iones manganeso (Mn<sup>2+</sup>). En algunos casos, Mg<sup>2+</sup> se añade en forma de MgCl<sub>2</sub>. En algunos casos, Mn<sup>2+</sup> se añade en forma de MnCl<sub>2</sub>. En algunos casos, la concentración de MgCl<sub>2</sub> es de aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 100 mM o de aproximadamente 1000 mM. En algunos casos, la concentración de MnCl<sub>2</sub> es de aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 100 mM o de aproximadamente 1000 mM.

30

En algunas modalidades, el producto de ligazón incluye un dominio de captura de la sonda de captura, que puede unirse a una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura inmovilizada, directa o indirectamente, en un sustrato). En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción 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 modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura de la sonda ligada se une específicamente al dominio de captura.

35

Después de la ligazón, en algunos casos, la muestra biológica se lava con un tampón de lavado posterior a la ligazón. En algunos casos, el tampón de lavado posterior a la ligazón 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 etapa de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. En algunos casos, la muestra biológica se lava a aproximadamente 60 °C.

40

(i) ligazón que incluye fosfato 5' preadenilado en la segunda sonda

En la presente descripción se proporcionan métodos para determinar una 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 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 ligazón mediante la unión de un extremo 3' de la segunda sonda al extremo 5' de la primera sonda mediante el uso de una ligasa que no requiere trifosfato de adenosina para la actividad de la ligasa; (d) liberar el producto de ligazón del ácido nucleico diana y unir el dominio de captura del producto de ligazón específicamente al dominio de captura de la sonda de captura; y (e) determinar (i) toda o parte de una secuencia correspondiente al producto de ligazón, o un complemento del mismo, y (ii) toda o 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 de la ligasa (por ejemplo, 5' AppADN/ARN ligasa termoestable, ligasa de ARN T4 truncada 2 (trRnl2), ligasa de ARN T4 truncada 2 K227Q, ligasa de ARN T4 truncada 2 KQ, ADN ligasa del virus PBCV-1 de la clorella, y sus combinaciones). Véase, por ejemplo, Nichols y otros, "ARN Ligases," *Curr. Protocol. Molec. Biol.* 84(1):3.15.1–4 (2008); Viollet y otros, "T4 RNA Ligase 2 Truncated Active Site Mutants: Improved Tools for RNA Analysis," *BMC Biotechnol.* 11: 72 (2011); y Ho y otros, "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 ligasas de ARN de T4 y ligasas de ARN de T4 truncadas. La 5' AppADN/ARN ligasa termoestable es una enzima que pertenece a la familia de las ligasas que cataliza la ligazón del extremo 3' del ARN<sub>h</sub> o el ADN<sub>h</sub> a un ADN<sub>h</sub> 5' adenilado o un ARN<sub>h</sub> 5' adenilado. La ligasa de ARN T4 truncada 2 es una enzima que pertenece a la familia de las ligasas que cataliza la ligazón de las muescas de ARN<sub>h</sub> y el ARN<sub>h</sub> al ARN<sub>h</sub>. También puede ligar el extremo 3' del ARN o ADN a un ADN<sub>p</sub> 5' cuando se hibrida con un complemento de ARN, y el extremo 3' del ARN a un ARN<sub>p</sub> 5' cuando se hibrida con un complemento de ADN, con eficiencia reducida. La ligasa de ARN T4 truncada 2 K227Q es una enzima que pertenece a la familia de las ligasas que cataliza la ligazón del extremo 3' de ARN<sub>h</sub> al ADN<sub>h</sub> 5' adenilado y al ARN<sub>h</sub> 5' adenilado. Tiene una reducción de los productos secundarios en comparación con la ligasa de ARN T4 truncada 2. La ligasa de ARN T4 truncada 2 KQ es una enzima que pertenece a la familia de las ligasas que cataliza la ligazón del extremo 3' del ARN<sub>h</sub> al ADN<sub>h</sub> 5' adenilado y al ARN<sub>h</sub> 5' adenilado. Es una opción preferida para la ligazón de un ARN<sub>h</sub> a adaptadores preadenilados y tiene una reducción de los productos secundarios en comparación con la ligasa de ARN T4 truncada 2.

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

En algunos casos, se añaden cofactores que ayudan en la ligazón de la primera y segunda sonda durante la ligazón. En algunos casos, los cofactores incluyen iones magnesio (Mg<sup>2+</sup>). En algunos casos, los cofactores incluyen iones manganeso (Mn<sup>2+</sup>). En algunos casos, Mg<sup>2+</sup> se añade en forma de MgCl<sub>2</sub>. En algunos casos, Mn<sup>2+</sup> se añade en forma de MnCl<sub>2</sub>. En algunos casos, la concentración de MgCl<sub>2</sub> es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM. En algunos casos, la concentración de MnCl<sub>2</sub> es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM.

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

En algunas modalidades, el tampón de ligazón incluye un tampón de almacenamiento enzimático. En algunas modalidades, el tampón de almacenamiento de enzimas incluye glicerol. En algunas modalidades, el tampón de ligazón se complementa con glicerol. En algunas modalidades, el glicerol está presente en el tampón de ligazón a un volumen total de 15 % v/v.

(h) Permeabilización y liberación del producto de ligazón

En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción incluyen una etapa de permeabilización. En algunas modalidades, la permeabilización se produce mediante el uso de una proteasa. En algunas modalidades, 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 modalidades, la endopeptidasa es pepsina. En algunas modalidades, después de crear un producto de ligazón (por ejemplo, al ligar una primera sonda y una segunda sonda que se hibridan con secuencias adyacentes en el analito), la muestra biológica se permeabiliza. En algunas modalidades, la muestra biológica se permeabiliza 5 simultáneamente con o antes de poner en contacto la muestra biológica con una primera sonda y una segunda sonda, hibridar la primera sonda y la segunda sonda con el analito, generar un producto de ligazón al ligar la primera sonda y la segunda sonda, y liberar el producto ligado del analito.

En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción incluyen la permeabilización de la muestra biológica de manera que la sonda de captura puede unirse más fácilmente a la sonda ligada capturada (es decir, en comparación con la ausencia de permeabilización). En algunas modalidades, los 10 reactivos de transcripción inversa (RT) pueden añadirse a muestras biológicas permeabilizadas. La incubación con los reactivos de RT puede producir ADNc de longitud completa con código de barras espacial a partir de los analitos capturados (por ejemplo, ARNm poliadenilado). Los reactivos de la segunda hebra (por ejemplo, cebadores de la segunda hebra, enzimas) pueden añadirse a la muestra biológica en el portaobjetos para iniciar la síntesis de la segunda hebra.

En algunos casos, la etapa de permeabilización incluye la aplicación de un tampón de permeabilización a la 15 muestra biológica. En algunos casos, el tampón de permeabilización incluye un tampón (por ejemplo, Tris pH 7,5), MgCl<sub>2</sub>, 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 se realiza a 37 °C. En algunos casos, la etapa de permeabilización se realiza durante 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.

20 En algunas modalidades, después de generar un producto de ligazón, el producto de ligazón se libera del analito. En algunas modalidades, un producto de ligazón se libera del analito mediante el uso de una endorribonucleasa. En algunas modalidades, la endorribonucleasa es ARNasa H, ARNasa A, ARNasa C o ARNasa I. En algunas modalidades, la endorribonucleasa es ARNasa H. La ARNasa H es una endorribonucleasa que hidroliza específicamente los enlaces fosfodiéster del ARN, cuando se hibrida con el ADN. La ARNasa H es parte de una familia conservada de ribonucleasas que están presentes en muchos 25 organismos diferentes. Hay dos clases principales de ARNasa H: ARNasa H1 y ARNasa H2. Las enzimas de la ARNasa H retroviral son similares a las de la ARNasa H1 procariota. Todas estas enzimas comparten la característica de que son capaces de escindir el componente de ARN de un heterodúplex ARN:ADN. En algunas modalidades, la ARNasa H es ARNasa H1, ARNasa H2 o ARNasa H1 o ARNasa H2. En algunas modalidades, la ARNasa H incluye, pero no se limita a, ARNasa HIII de *Pyrococcus furiosus*, ARNasa HIII de *Pyrococcus horikoshi*, ARNasa HI de *Thermococcus litoralis*, ARNasa HI de *Thermus thermophilus*, ARNasa HI de *E. coli*, o ARNasa HIII de *E. coli*.

30 En algunos casos, la etapa de liberación se realiza mediante el uso de 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 nucleasas. En algunos casos, la etapa de liberación se realiza a 37 °C. En algunos casos, la etapa de liberación se realiza durante 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.

35 En algunos casos, la etapa de liberación ocurre antes de la etapa de permeabilización. En algunos casos, la etapa de liberación ocurre 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).

(i) Bloqueo de sondas

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

En algunas modalidades, se usa una sonda de bloqueo para bloquear o modificar el extremo 3' libre del dominio de captura de la sonda de captura. En algunas modalidades, una sonda de bloqueo puede hibridarse con el dominio de captura de la sonda de captura de la segunda sonda para enmascarar el extremo 3' libre del dominio

de captura de la sonda de captura. En algunas modalidades, una sonda de bloqueo puede ser una sonda en horquilla o una sonda parcialmente de doble hebra. En algunas modalidades, el extremo 3' libre del dominio de captura de la sonda de captura de la segunda sonda puede bloquearse mediante modificación química, por ejemplo, la adición de un grupo azidometilo como un resto protector químicamente reversible, de manera que las sondas de captura no incluyen un extremo 3' libre. Bloquear o modificar el dominio de captura de la sonda de captura, particularmente en el extremo 3' libre del dominio de captura de la sonda de captura, antes de poner en contacto la segunda sonda con el sustrato, evita la hibridación de la segunda sonda con el dominio de captura (por ejemplo, evita la captura de un poli(A) de un dominio de captura de la sonda de captura con un dominio de captura poli(T)). En algunas modalidades, una sonda de bloqueo puede denominarse un resto de bloqueo del dominio de captura de la sonda de captura.

En algunas modalidades, las sondas de bloqueo pueden eliminarse reversiblemente. Por ejemplo, las sondas de bloqueo pueden aplicarse para bloquear el extremo 3' libre de cualquiera o ambos de dominio de captura de la sonda de captura y/o las sondas de captura. Bloquear la interacción entre el dominio de captura de la sonda de captura y la sonda de captura en el sustrato puede reducir la captura inespecífica 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 eliminarse del extremo 3' del dominio de captura de la sonda de captura y/o la sonda de captura, y el producto de ligazón puede migrar y unirse a las sondas de captura en el sustrato. En algunas modalidades, la eliminación incluye desnaturalizar la sonda de bloqueo del dominio de captura de la sonda de captura y/o la sonda de captura. En algunas modalidades, la eliminación incluye eliminar un resto de caperuza químicamente reversible. En algunas modalidades, la eliminación incluye digerir la sonda de bloqueo con una ARNasa (por ejemplo, ARNasa H).

En algunas modalidades, las sondas de bloqueo son sondas de bloqueo oligo (dT). En algunas modalidades, las sondas de bloqueo de oligo (dT) pueden tener una longitud de 15-30 nucleótidos. En algunas modalidades, 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 modalidades, los agentes capturadores de analitos pueden bloquearse a diferentes temperaturas (por ejemplo, 4 °C y 37 °C).

(j) Muestras biológicas

Los métodos descritos en la presente descripción pueden realizarse en cualquier tipo de muestra. En algunas modalidades, la muestra es un tejido fresco. En algunas modalidades, la muestra es una muestra congelada. En algunas modalidades, la muestra se congeló previamente. En algunas modalidades, la muestra es una muestra fijada en formalina y embebida en parafina (FFPE).

Los sujetos a partir de los cuales pueden obtenerse muestras biológicas pueden ser individuos sanos o asintomáticos, individuos que tienen o se sospecha que tienen una enfermedad (por ejemplo, cáncer) o una predisposición a una enfermedad, y/o individuos que necesitan tratamiento o se sospecha que necesitan tratamiento. En algunos casos, la muestra biológica puede incluir una o más células enfermas. Una célula enferma puede tener propiedades metabólicas alteradas, expresión génica, expresión proteica y/o características morfológicas. Los ejemplos de enfermedades incluyen trastornos inflamatorios, trastornos metabólicos, trastornos del sistema nervioso y cáncer. En algunos casos, la muestra biológica incluye células tumorales o cancerosas. Las células cancerosas pueden derivarse de tumores sólidos, neoplasias hematológicas, líneas celulares u obtenerse como células tumorales circulantes. En algunos casos, 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 estromales,

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).

En algunos casos, el cáncer es cáncer colorrectal. En algunos casos, el cáncer es cáncer de ovario. En ciertas modalidades, 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 hodgkiniano, 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 las 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 ciertas modalidades, el cáncer tratado es melanoma desmoplásico, cáncer de mama inflamatorio, timoma,

cáncer rectal, cáncer anal, o glioma de tallo cerebral tratable quirúrgicamente o no tratable quirúrgicamente. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano.

5 Las muestras de FFPE generalmente se reticulan y fragmentan en gran medida, y por lo tanto este tipo de muestra permite una recuperación limitada del ARN mediante el uso de técnicas de detección convencionales. En ciertas modalidades, los métodos de captura de ARN dirigido proporcionados en la presente descripción 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 oligo-dT y la transcripción inversa del ARNm). En ciertas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción permiten la medición sensible de genes específicos de interés que de cualquier otra manera podrían omitirse con un enfoque transcriptómico completo.

10 En algunos casos, las muestras de FFPE se tiñen (por ejemplo, mediante el uso de H&E). Los métodos descritos en la presente descripción son compatibles con H&E y permitirán el contexto morfológico superpuesto con el análisis transcriptómico. Sin embargo, en dependencia de la necesidad, algunas muestras pueden teñirse solo con una tinción nuclear, tal como teñir una muestra solo con hematoxilina y no eosina, cuando se necesita la ubicación de un núcleo celular.

15 En algunas modalidades, una muestra biológica (por ejemplo, sección de tejido) puede fijarse con metanol, teñirse con hematoxilina y eosina, y obtener imágenes. En algunas modalidades, la fijación, la tinción y la obtención de imágenes ocurren antes de que una o más sondas se hibriden con la muestra. Algunas modalidades de cualquiera de los flujos de trabajo descritos en la presente descripción pueden incluir además una etapa de decoloración (por ejemplo, una etapa de decoloración con hematoxilina y eosina), después de la obtención de imágenes de la muestra y antes de permeabilizar la muestra. Por ejemplo, la decoloración puede realizarse al realizar una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o cinco) etapas de lavado (por ejemplo, una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o cinco) etapas de lavado realizadas mediante el uso de un tampón que incluye HCl). Las imágenes pueden usarse para mapear patrones de expresión génica espacial de regreso  
20 a la muestra biológica. Una enzima de permeabilización puede usarse para permeabilizar la muestra biológica directamente en el portaobjetos.

En algunas modalidades, la muestra de FFPE se desparafina, permeabiliza, equilibra y bloquea antes de añadir los oligonucleótidos de la sonda diana. En algunas modalidades, la desparafinación es mediante el uso de xilenos. En algunas modalidades, la desparafinación incluye múltiples lavados con xilenos. En algunas modalidades, la desparafinación incluye múltiples lavados con xilenos seguidos de la eliminación de xilenos  
25 mediante el uso de múltiples rondas de alcohol graduado seguido de lavado de la muestra con agua. En algunos aspectos, el agua es agua desionizada. En algunas modalidades, equilibrar y bloquear incluye incubar la muestra en un tampón pre-Hib. En algunas modalidades, el tampón pre-Hib incluye ARNt de levadura. En algunas modalidades, la permeabilización de una muestra incluye lavar la muestra con un tampón fosfato. En algunas modalidades, el tampón es PBS. En algunas modalidades, el tampón es PBST.

(k) Determinar la secuencia del producto de ligazón

30 Después de que un producto de ligazón de la muestra se ha hibridado o asociado de cualquier otra manera con una sonda de captura de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente en relación con la metodología analítica general basada en células espaciales, se analizan los constructos con código de barras que resultan de la hibridación/asociación.

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

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

detectar espacialmente de esta manera el analito biológico; en donde la muestra biológica se elimina total o parcialmente del sustrato.

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

10 En algunas modalidades, la muestra biológica permanece en el sustrato durante la eliminación (por ejemplo, mediante desnaturalización) de una copia de la sonda de captura (por ejemplo, complemento). En algunas modalidades, el análisis de un analito unido a la sonda de captura del sustrato puede realizarse sin someter la muestra biológica a degradación enzimática y/o química de las células (por ejemplo, células permeabilizadas) o ablación del tejido (por ejemplo, ablación láser).

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

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

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

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

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

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

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

<sup>5</sup> En algunas modalidades, la sonda de captura se extiende mediante el uso de una o más ADN polimerasas.

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

<sup>10</sup>

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

<sup>25</sup>

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

<sup>30</sup>

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

<sup>35</sup>

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

<sup>40</sup>

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

En algunas modalidades, se libera la sonda de captura extendida o complemento o amplicón de la misma. La etapa de liberación de la sonda de captura extendida o complemento o amplicón de la misma de la superficie

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

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

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

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

- 25 En algunas modalidades, las sondas complementarias a una sonda de captura extendida pueden tener aproximadamente 4 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, las sondas (por ejemplo, sondas detectables) complementarias a una sonda de captura extendida pueden ser de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 90 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, las sondas (por ejemplo, sondas detectables) complementarias a una sonda de captura extendida pueden ser de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, las sondas (por ejemplo, sondas detectables) complementarias a una sonda de captura extendida pueden ser de  
30 aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, las sondas (por ejemplo, sondas detectables) complementarias a una sonda de captura extendida pueden ser de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, las sondas (por ejemplo, sondas detectables) complementarias a una sonda de captura extendida pueden ser 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,  
35 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,  
40 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 de longitud.

5 En algunas modalidades, aproximadamente 1 a aproximadamente 100 sondas pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridar) a una sonda de captura extendida. En algunas modalidades, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 sondas pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridar) a una sonda de captura extendida. En algunas modalidades, aproximadamente 10 a aproximadamente 100 sondas pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridar) a una sonda de captura extendida. En algunas modalidades, aproximadamente 20 a aproximadamente 90 sondas pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridar) a una sonda de captura extendida. En algunas modalidades, aproximadamente 30 a aproximadamente 80 sondas (por ejemplo, sondas detectables) pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridar) a una sonda de captura extendida. En algunas modalidades, aproximadamente 40 a aproximadamente 70 sondas pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridar) a una sonda de captura extendida. En algunas modalidades, aproximadamente 50 a aproximadamente 60 sondas pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridar) a una sonda de captura extendida. En algunas modalidades, 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, 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 sondas pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridar) a una sonda de captura extendida.

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

35 En algunos casos, la sonda ligada y la sonda de captura pueden amplificarse o copiarse, al crear una pluralidad de moléculas de ADNc. En algunas modalidades, el ADNc puede desnaturalizarse de la plantilla de la sonda de captura y transferirse (por ejemplo, a un tubo limpio) para la amplificación, y/o construcción de biblioteca. El ADNc con código de barras espacial puede amplificarse mediante PCR antes de la construcción de la biblioteca. El ADNc puede entonces fragmentarse enzimáticamente y seleccionarse por tamaño para optimizar el tamaño del amplicón del ADNc. Las secuencias P5 y P7 dirigidas a capturar los amplicones en una celda de flujo de secuenciación (instrumentos de secuenciación Illumina) pueden añadirse a los amplicones, i7 e i5 pueden usarse como índices de muestra, y TruSeq Lectura 2 puede añadirse a través de reparación final, cola A, ligazón adaptadora y PCR. Los fragmentos de ADNc pueden secuenciarse entonces mediante el uso de secuenciación de extremo emparejado mediante el uso de TruSeq Lectura 1 y TruSeq Lectura 2 como sitios de cebadores de secuenciación. Las secuencias adicionales se dirigen a instrumentos de secuenciación Illumina o instrumentos de secuenciación que utilizan esas secuencias; sin embargo, un experto en la técnica comprenderá que las secuencias adicionales o alternativas usadas por otros instrumentos o tecnologías de secuenciación también son igualmente aplicables para su uso en los métodos mencionados anteriormente.

En algunas modalidades, donde una muestra se codifica directamente mediante hibridación con sondas de captura o agentes capturadores de analitos hibridados, unidos o asociados con ya sea la superficie celular, o introducidos en la célula, como se describió anteriormente, la secuenciación puede realizarse en la muestra intacta.

5 Puede usarse una amplia variedad de diferentes métodos de secuenciación para analizar analitos con código de barras (por ejemplo, el producto de ligazón). En general, los polinucleótidos secuenciados pueden ser, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), que incluyen variantes o derivados de estos (por ejemplo, ADN de una sola hebra o híbridos ADN/ARN, y moléculas de ácido nucleico con un análogo de nucleótido).

10 La secuenciación de polinucleótidos puede realizarse mediante varios sistemas. Más generalmente, la secuenciación puede realizarse mediante el uso de amplificación de ácido nucleico, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (por ejemplo, PCR digital y PCR digital de gotas (ddPCR), PCR cuantitativa, PCR en tiempo real, PCR múltiple, métodos de plexo único basados en PCR, PCR de emulsión) y/o amplificación isotérmica. Los ejemplos no limitantes de métodos para la secuenciación de material genético incluyen, pero no se limitan a, métodos de hibridación de ADN (por ejemplo, transferencia Southern), métodos de digestión de enzimas de restricción, métodos de secuenciación Sanger, métodos de secuenciación de próxima generación (por ejemplo, secuenciación en tiempo real de molécula única, secuenciación de nanoporos y secuenciación de Polony),  
15 métodos de ligazón y métodos de micromatriz.

(l) Kits

En algunas modalidades, también se proporcionan en la presente descripción kits que incluyen uno o más reactivos para detectar uno o más analitos descritos en la presente descripción. 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 más sondas de extensión y/o un tercer oligonucleótido).  
20

Un ejemplo no limitante de un kit usado para realizar cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción 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 una  
25 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 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

Otro ejemplo no limitante de un kit usado para realizar cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción 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, en donde la primera sonda y la segunda sonda  
30 son sustancialmente complementarias a las secuencias adyacentes de un analito, en donde la segunda sonda comprende (i) un dominio de unión de la sonda de captura que es capaz de unirse a un dominio de captura de la sonda de captura y (ii) una secuencia enlazadora; (c) una pluralidad de enzimas que comprenden una ribonucleasa y una ligasa; y (d) instrucciones para realizar el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

Otro ejemplo no limitante de un kit usado para realizar cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción 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 las secuencias adyacentes de un analito, en donde la primera sonda incluye una secuencia enlazadora, en donde la segunda sonda comprende un dominio de unión de la sonda de captura que es capaz de 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 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.  
35

40 En algunas modalidades de cualquiera de los kits descritos en la presente descripción, 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**

**Ejemplo 1. Análisis de la expresión génica espacial de muestras fijadas en FFPE mediante el uso de ligazón con plantilla de ARN**

Otros han demostrado ligazón in situ. Véase Credle y otros, *Nucleic Acids Research*, Volumen 45, Número 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 mediante el uso de colas poli(A) que condujeron a la unión fuera de la diana. Aquí, la cola de poli(A) en un oligonucleótido de sonda se cambió a otra secuencia.

Como descripción general, se realizó un ejemplo no limitante de ligazón con plantilla de ARN en una muestra fijada con FFPE como se describe en la Figura 13. Las muestras fijadas con FFPE se desparafinaron, se tiñeron (por ejemplo, tinción con H&E) y se obtuvieron imágenes 1301. Las muestras se decoloraron (por ejemplo, mediante el uso de HCl) y se desconectaron 1302. Después del desentrecruzamiento, las muestras tratadas con tampón de prehibridación (por ejemplo, tampón de hibridación sin la primera y segunda sondas), las sondas se añadieron a la muestra, las sondas se hibridaron y las muestras se lavaron 1303. Se añadió ligasa a las muestras para ligar sondas hibridadas para generar un producto de ligazón y luego las muestras se lavaron 1304. Las sondas se liberaron del analito al poner en contacto la muestra biológica con la ARNasa H 1305. Luego, las muestras se permeabilizaron para facilitar la captura del producto de ligazón mediante las sondas de captura en el sustrato 1306. Los productos de ligazón que se hibridaron con las sondas de captura se extendieron entonces 1307. Las sondas de captura extendida se desnaturalizaron 1308. Se indexaron sondas de captura desnaturalizadas y extendidas y las bibliotecas amplificadas se sometieron al control de calidad 1309 antes de secuenciarse.

Los portaobjetos de tejido cerebral de ratón seccionados en FFPE se desparafinaron, permeabilizaron con PBST y se equilibraron con un tampón pre-Hib dos veces durante 5 minutos cada uno. El desentrecruzamiento de la muestra se realizó mediante el uso de un reactivo de desentrecruzamiento TE o un reactivo de desentrecruzamiento PBS-tween. Para el desentrecruzamiento de 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 ciclador térmico de acuerdo con la tabla 1.

Tabla 1. Protocolo de desentrecruzamiento del ciclador térmico

| Desentrecruzamiento: Temperatura de la tapa: 70C volumen: 100 ul |             |            |
|--|-------------|------------|
| Etapa  | Temperatura | Hora       |
| Pre calentamiento  | 70 °C       | ∞          |
| Desentrecruzamiento  | 70 °C       | 60 minutos |
| Contener   | 22 °C       | ∞          |

De acuerdo con el protocolo del ciclador térmico, los portaobjetos se colocaron en un casete metálico y se sometieron a los métodos descritos en la tabla 2.

Tabla 2. Desentrecruzamiento con HCl\*

| Etapa   | Tiempo     |
|---|------------|
| 1. Lavado 1: Se añadió 100 µl de HCl 0,1 N  | 1 minuto   |
| 2. Lavado 2: Se eliminó el HCl y se añade 100 µl de HCl                             | 1 minuto   |
| 3. Lavado 3: Se eliminó el HCl y se añade 100 µl de HCl                             | 1 minuto   |
| 4. Intercambio de tampón: Se eliminó el HCl y se añade 100 µl de tampón TE (pH 9,0) |            |
| 5. Se eliminó el TE y se añade 100 µl de TE (pH 9,0).                               |            |
| 6. Se incubó a 70 °C  | 1 hora     |
| 7. Se eliminó el TE y se añadió 100 µl de PBS-Tween 1x (0,05 %)                     |            |
| 8. Se incubó a temperatura ambiente   | 15 minutos |

\* Nota: Se eliminó todo el líquido en cada etapa.

Las sondas RTL se diseñaron para hibridarse con secuencias adyacentes de cada analito (por ejemplo, secuencia de ARNm) de interés en el genoma, que incluye receptor de estrógeno, receptor de progesterona y ERBB2, también conocido como HER2. Aquí, se añadieron 20 056 pares de sondas (por ejemplo, sondas RHS y LHS) a cada muestra de tejido para capturar 19 490 genes diferentes. Dos sondas RTL (una sonda del lado izquierdo (LHS) y una sonda del lado derecho (RHS) (véase por ejemplo, la Figura 6)) para cada analito se añadieron simultáneamente e hibridaron en secuencias adyacentes del ARNm diana, al formar estructuras dúplex de ARN:ADN. Después del desentrecruzamiento, se eliminó 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 a sus respectivas dianas de ARNm. El tampón de hibridación incluyó SSC, formamida o un ARNt de levadura equivalente como portador y las sondas de ADN RHS y LHS.

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

Tabla 3. Protocolo de hibridación

| Protocolo de hibridación del ciclador térmico    |             |                      |
|--|-------------|----------------------|
| Hib: Temperatura de la tapa: 50C volumen: 100 ul |             |                      |
| Etapa  | Temperatura | Hora                 |
| Pre calentamiento                                | 50 °C       | ∞                    |
| Hib  | 50 °C       | 2 horas y 30 minutos |
| Contener para lavados posteriores a la hib       | 50 °C       | ∞                    |
| Contener   | 22 °C       | ∞                    |

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

Para ligar dos oligonucleótidos de sonda dirribo que se hibridaron adyacentemente en el ARNm diana como se describió anteriormente, cada muestra se incubó con una mezcla de reacción de ligasa de ADN de T4 RNL2 (mezcla de ligazón). La mezcla de reacción de ligasa incluyó: El tampón de ligasa de ARN de T4 (NEB B0293S), RNL2 ligasa y agua libre de nucleasas.

Para ligar dos oligonucleótidos de sonda de ADN que se hibridaron adyacentemente en los ARNm diana como se describió anteriormente, se añadió SplintR (NEB) en un tampón de ligazón a cada muestra. La mezcla de reacción de ligasa incluyó: Tris-HCl (pH 7,5) MnCl<sub>2</sub> ATP, DTT, fluido sustituto, ligasa SplintR (NEB) y agua libre de nucleasas por muestra. Las etapas de ligazón y lavado se realizaron como se describe en la tabla 4.

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

Tabla 4. Protocolo de ligazón

| Ligazón de la sonda  |           |
|--|-----------|
| Etapa  | Hora      |
| Se eliminó TODO el tampón posterior a la Hib antes de añadir la mezcla de ligasa<br>Se añadió la mezcla de ligasa e incubó a 37 °C | 1 h       |
| Lavado 1: Se eliminó la mezcla de ligasa, se añadió tampón de lavado posterior a la ligazón* y se incubó a 60 °C durante 5 minutos | 5 minutos |

|   |  |           |
|---|--|-----------|
| 5 | <p>Tampón de lavado restante calentado a 60 °C</p> <p>Lavado 2: Se eliminó el tampón de lavado posterior a la ligazón, se añadió tampón posterior a la ligazón precalentado y se incubó a 60 °C durante 5 minutos.</p> <p>Se eliminó el tampón de lavado posterior a la ligazón y se añadió SSC 2X**. Lavado repetido SSC 2X.</p> <p>El casete se enfrió a temperatura ambiente antes de añadir ARNasa</p> | 5 minutos |
|---|--|-----------|

10 \* Tampón de lavado posterior a la ligazón incluido (por muestra): SSC, formamida o un equivalente, y agua libre de nucleasas.

Se añadió ARNasa H para digerir la hebra de ARN del dúplex ARN:ADN hibridado. Brevemente, el ARN de los híbridos ADN:ARN se digirió mediante la incubación de las muestras con la mezcla de ARNasa H durante 30 minutos a 37 °C, donde la mezcla de ARNasa H incluyó: Tampón de ARNasa H y ARNasa H. Después de la incubación y aunque la misma permaneció a 37 °C, la muestra biológica se permeabilizó para liberar las sondas de RTL ligadas mediante el uso de proteinasa K a 1,25 mg/ml. En particular, la solución de proteinasa K incluyó (por muestra): Tris (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub>, 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 solución de proteinasa K. A continuación, las muestras se lavaron tres veces con SSC 2X.

A las sondas de ADN ligadas liberadas que sirvieron como un proxy para el ARNm diana se les permitió hibridar con el dominio de captura en la sonda de captura inmovilizada en la matriz espacial a través de la cola poliA en el extremo 3' de la sonda RHS. Las sondas ligadas capturadas se copiaron, mediante el uso de la sonda de captura como plantilla y el producto de extensión se liberó de la matriz espacial. Brevemente, los tejidos se incubaron con una mezcla de extensión de la segunda hebra que comprende ADN polimerasa Kapa Hifi durante 25 minutos a 53 °C. Después de la incubación, la mezcla de extensión de la segunda hebra se eliminó de los tejidos y los tejidos se lavaron con SSC 2X. Se añadió una solución de KOH a cada uno de los pocillos de tejido, los tejidos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para liberar el producto de extensión de la matriz espacial y el sobrenadante de cada pocillo de tejido se transfirió para la cuantificación y la preparación de la biblioteca. La cuantificación de muestras se realizó mediante el uso de qPCR y la mezcla maestra de qPCR KAPA SYBR FAST de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, la mezcla maestra KAPA SYBR se preparó mediante la adición del cebador de qPCR cDNA\_F y el cebador de qPCR sRNA\_R2. El protocolo del ciclor térmico 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 mediante el uso de una mezcla Amp que incluía cebadores de indexado dobles y una mezcla Amp. Los ácidos nucleicos se secuenciaron y analizaron después.

30 Como controles, se ejecutaron 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.

35 Como se muestra en las Figuras 14-19, la expresión espacial de pares de sondas ligadas destaca la fisiología subyacente del tejido cerebral de ratón. La Figura 14 muestra los resultados de la PCR que demuestran que se capturó un producto de ligazón y que puede amplificarse si la permeabilización ocurrió antes o después del tratamiento con ARNasa H (control positivo=estándar, control negativo=menos ligasa). La flecha 1 apunta a una banda de PCR que representa los productos de ligazón deseados, mientras que las flechas 2, 3 y 4 representan productos sin ligazón. La Figura 15 muestra la sonda inespecífica detectada como un resto del total de lecturas para cada condición. Las Figuras 16A-B muestran que la mayoría de las combinaciones de sondas son específicas. Las flechas indican sondas RHS que tenían un fondo aumentado y, por lo tanto, incluyen alguna hibridación inespecífica. Al observar los recuentos totales en la Figura 17, las sondas LHS+RHS específicos de genes se superponen a la huella tisular (véase las Figuras 17A-C con círculo negro que indica la huella tisular).

40 Además, se añadieron sondas específicas para varios 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 (véase, por ejemplo, la Figura 18 y la Figura 19). Cuando se contaron los UMI específicos de la diana, se observó un patrón de expresión más detallado. Véase, por ejemplo, las Figuras 19B-19F. Este análisis reveló que una hibridación más larga condujo a una mayor sensibilidad. Con referencia a las Figuras 18A-18E, los círculos blancos indican manchas que informan de la expresión para el gen indicado.

Se realizó una hibridación durante la noche en comparación con una hibridación de 2 horas como se discutió. El análisis en muestras de cerebro de ratón mediante el uso de 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, por lo tanto, una hibridación más larga, dio lugar a una mayor sensibilidad en comparación con un control positivo (véase, Figuras 20A-20B). Las sondas de ratón se diseñaron a partir de dianas derivadas de Appris (véase Rodríguez y otros, *Nucleic Acids Research*, 46: D213-217, doi: 10.1093/nar/gkx997 (2018)) y GENCODE. Todos los pares de sondas no se solaparon e incluyen generalmente aproximadamente 1 par de sondas por gen.

**Ejemplo 2. Análisis de la expresión génica espacial del cáncer de mama triple positivo (TPBC) mediante el uso de ligazón con plantilla de ARN (RTL)**

10 Este ejemplo demuestra que la RTL puede realizarse en una muestra para identificar la abundancia de analito y la ubicación espacial de manera imparcial.

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 consultaron con sondas de ADN mediante métodos de ligazón con plantilla de ARN. Antes de la etapa de ligazón, las muestras de tejido de TPBC se desparafinaron y se tiñeron según protocolos establecidos. Por ejemplo, las muestras de tejido de FFPE TPBC se precalentaron en un baño de agua (40 °C), se cortaron en secciones (10 µm), se secaron a 42 °C durante varias horas y se colocaron en un secador a temperatura ambiente durante toda la noche. Los tejidos secos, cortados en secciones se desparafinaron mediante horneado a 60 °C, se movieron a través de una serie de lavados de xileno y EtOH, se enjuagaron en agua varias veces. Después del enjuague, los tejidos desparafinados se tiñeron con hematoxilina según protocolos establecidos. Se obtuvieron imágenes de los tejidos teñidos, se identificaron regiones de tumor y estroma. Véase Figura 21A.

20 Los tejidos se desconectaron para eliminar los entrecruzamientos del formaldehído dentro de la muestra, al liberar de esta manera los analitos para la ligazón con plantilla de ARN. Brevemente, las muestras de tejido se incubaron con una solución de HCl durante 1 minuto, se repitieron dos veces durante un total de 3 minutos. Después de las incubaciones de HCl, las secciones de tejido se incubaron a 70 °C durante 1 hora en TE pH 9,0. Se eliminó el TE y los tejidos se incubaron en PBS-Tween 1x durante 15 minutos.

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

Las sondas se diseñaron a partir de dianas derivadas de Appris (véase, Rodríguez y otros, *Nucleic Acids Research*, 46: D213-217, doi: 10.1093/nar/gkx997 (2018)) y GENCODE. Todos los pares de sondas no se solaparon e incluyen generalmente aproximadamente 1 par de sondas por gen.

30 Aquí, se añadieron 20 056 pares de sondas (por ejemplo, sondas RHS y LHS) a cada muestra de tejido para capturar 19 490 genes diferentes, que incluyen ESR1, PGR y HER2, en el genoma humano. Dos sondas RTL (una sonda del lado izquierdo (LHS) y una sonda del lado derecho (RHS) (véase, por ejemplo, la Figura 6)) para cada analito se añadieron simultáneamente e hibridaron en secuencias adyacentes del ARNm diana, que forman estructuras dúplex de ARN:ADN.

35 Después del desentrecruzamiento, las sondas de ADN (1 nm de cada sonda) se añadieron a las muestras de tejido en un tampón de hibridación para hibridar las sondas de ADN a sus respectivas dianas de ARNm. Un oligonucleótido de sonda (por ejemplo, la sonda RHS o la sonda 3') comprende una secuencia funcional no diana en su extremo 5' mientras que el otro oligonucleótido de sonda (por ejemplo, la sonda LHS o la sonda 5') comprende una secuencia poliA no diana en sus extremos 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 de aproximadamente 2 ½ horas. El tampón de hibridación/sonda de ADN se eliminó y los tejidos se lavaron 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 40 3 lavados posteriores a la hibridación.

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

A continuación, se añadió ARNasa H para digerir la hebra de ARN del dúplex ARN:ADN hibridado. Brevemente, el ARN de los híbridos ADN:ARN se digirió mediante la incubación de los tejidos con ARNasa H durante 30 minutos a 37 °C. Luego, la muestra biológica se permeabilizó para liberar las sondas 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 mediante la adición de proteinasa K a 1,25 mg/ml, se  
 5 incubaron a 37 °C durante al menos 5 minutos y luego se lavaron para eliminar la proteasa.

Las sondas de ADN ligadas liberadas que sirvieron como un proxy para el ARNm diana se dejaron hibridar con el dominio de captura en la sonda de captura (sondas de captura inmovilizadas en la matriz espacial) a través de la cola poliA en el extremo 3' de la sonda RHS. Las sondas ligadas capturadas se copiaron, mediante el uso de la sonda de captura como plantilla y el producto de extensión se liberó de la matriz espacial. Brevemente, los tejidos se incubaron con una mezcla de extensión de la segunda hebra que comprende ADN polimerasa  
 10 Kapa Hifi (Roche) durante 25 minutos a 53 °C. Después de la incubación, la mezcla de extensión se eliminó de los tejidos y los tejidos se lavaron con SSC. Se añadió una solución de KOH a cada uno de los pocillos de tejido, los tejidos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para liberar el producto de extensión de la matriz espacial y el sobrenadante de cada pocillo de tejido se transfirió para la cuantificación, preparación de bibliotecas y secuenciación en el instrumento de secuenciación Illumina NextSeq.

La evaluación del transcriptoma completo ayudó a comprender mejor la heterogeneidad de la TPBC. Por  
 15 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 los 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) grupos de expresión diferentes, lo que demuestra que la expresión génica diferencial y la ubicación de los genes expresados pueden determinarse mediante el uso de sondas RTL. Véase las Figuras 21C-21D. Con referencia a la Figura 21C, cada punto del gráfico es un punto de la matriz. Cada punto se asigna a un conglomerado, que se indica con círculos negros.  
 20 En algunos casos, los puntos asignados a un conglomerado están fuera del círculo indicado en el gráfico. Con referencia a la Figura 21D, cada punto de la matriz se asigna a un conglomerado y cada conglomerado se indica, en parte, mediante círculos. En algunos casos, los puntos se asignan a un conglomerado pero no están dentro de los círculos indicados en la matriz. Finalmente, se determinó la expresión de analito individual. Una muestra de TPBC mostró rutinariamente niveles elevados de receptor de estrógeno, receptor de progesterona y ERBB2 (HER2). Como se muestra en las Figuras 21E-21GA.

REIVINDICACIONES

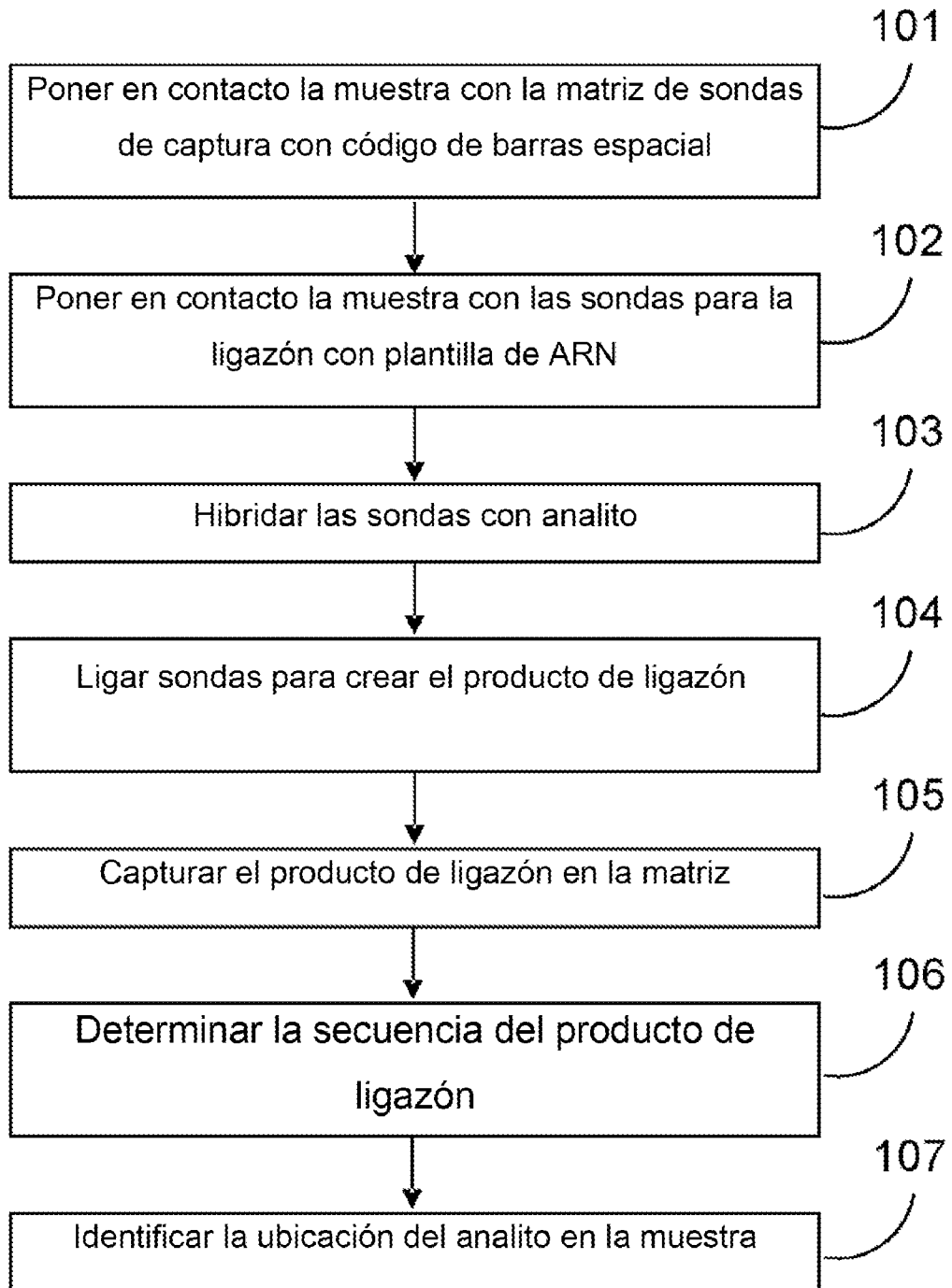
1. Un método para determinar una ubicación de un ácido nucleico diana en una muestra biológica, el método comprende:
  - 5 (a) proporcionar la muestra biológica colocada sobre un primer sustrato;
  - (b) poner en contacto una pluralidad de primeras sondas y segundas sondas con la muestra biológica, en donde la pluralidad de primeras sondas y segundas sondas se dirigen a una pluralidad de ácidos nucleicos en la muestra biológica y en donde una primera sonda y una segunda sonda de la pluralidad comprenden secuencias que son sustancialmente complementarias a secuencias que no son adyacentes entre  
10 sí en el ácido nucleico diana, y en donde la segunda sonda comprende una secuencia del dominio de captura de la sonda de captura que es complementaria a la totalidad o una porción de un dominio de captura de una sonda de captura;
  - (c) hibridar la primera sonda y la segunda sonda con el ácido nucleico diana;
  - (d) generar un producto de ligazón al ligar la primera sonda y la segunda sonda;  
15 (e) liberar el producto de ligazón del ácido nucleico diana;
  - (f) hibridar el producto de la ligazón al dominio de captura de la sonda de captura fija en una matriz, en donde la sonda de captura comprende además un código de barras espacial; y
  - 20 (g) determinar (i) toda o parte de la secuencia del producto de ligazón unido al dominio de captura, o un complemento del mismo, y (ii) 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 ácido nucleico diana en la muestra biológica.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa (d) comprende además extender la primera sonda, de esta manera (i) llenar un espacio entre la primera sonda y la segunda sonda.
- 25 3. El método de la reivindicación 2, en donde se liga la primera sonda a la segunda sonda mediante el uso de ligazón química.
4. El método de la reivindicación 2 o 3, en donde generar el producto de ligazón comprende ligar la primera sonda a la segunda sonda mediante el uso de una ligasa seleccionada de una ligasa de ARN de T4 (Rnl2), una ligasa de PBCV-1, una ligasa de ADN de una sola hebra o una ligasa de ADN de T4.
- 30 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la primera sonda y la segunda sonda se hibridan con secuencias que tienen al menos 5, al menos 10, al menos 15 o al menos 20 nucleótidos de separación.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la determinación comprende secuenciar (i) toda o parte de la secuencia del producto de ligazón, o un complemento del mismo, y (ii) la secuencia del  
35 código de barras espacial, o un complemento del mismo, de esta manera se identifica la presencia o ausencia de una o más de una variante de corte y empalme, una unión intrón/exón, una inserción o eliminación, o un polimorfismo de un único nucleótido.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la matriz está sobre el primer sustrato.
- 40 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la matriz está sobre un segundo sustrato, en donde el primer sustrato se alinea con el segundo sustrato, de manera que al menos una porción de la muestra biológica se alinea con al menos una porción de la matriz.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8,

en donde la primera sonda, la segunda sonda, o tanto la primera sonda como la segunda sonda comprenden una secuencia de cebador,

5 en donde la segunda sonda comprende el dominio de captura de la sonda de captura y la primera sonda comprende una secuencia de cebador, y/o

en donde la primera sonda y/o la segunda sonda es una sonda de ADN.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el contacto de la primera sonda y la segunda sonda con la muestra biológica comprende poner en contacto la muestra biológica con 100 o más pares de sondas que comprenden la primera sonda y la segunda sonda.
- 10 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la liberación del producto de ligazón comprende poner en contacto la muestra biológica con una endorribonucleasa, en donde la endorribonucleasa es una enzima ARNasa H.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la muestra biológica es una muestra de tejido fijada en formalina y embebida en parafina, una muestra de tejido fresco o una muestra de tejido congelado.
- 15 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la muestra biológica se tiñó previamente mediante el uso de inmunofluorescencia, inmunohistoquímica o hematoxilina y eosina.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende además poner en contacto la muestra biológica con un agente de permeabilización, en donde el agente de permeabilización comprende 20 proteinasa K o pepsina.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el ácido nucleico diana comprende ARNm.



**Figura 1**

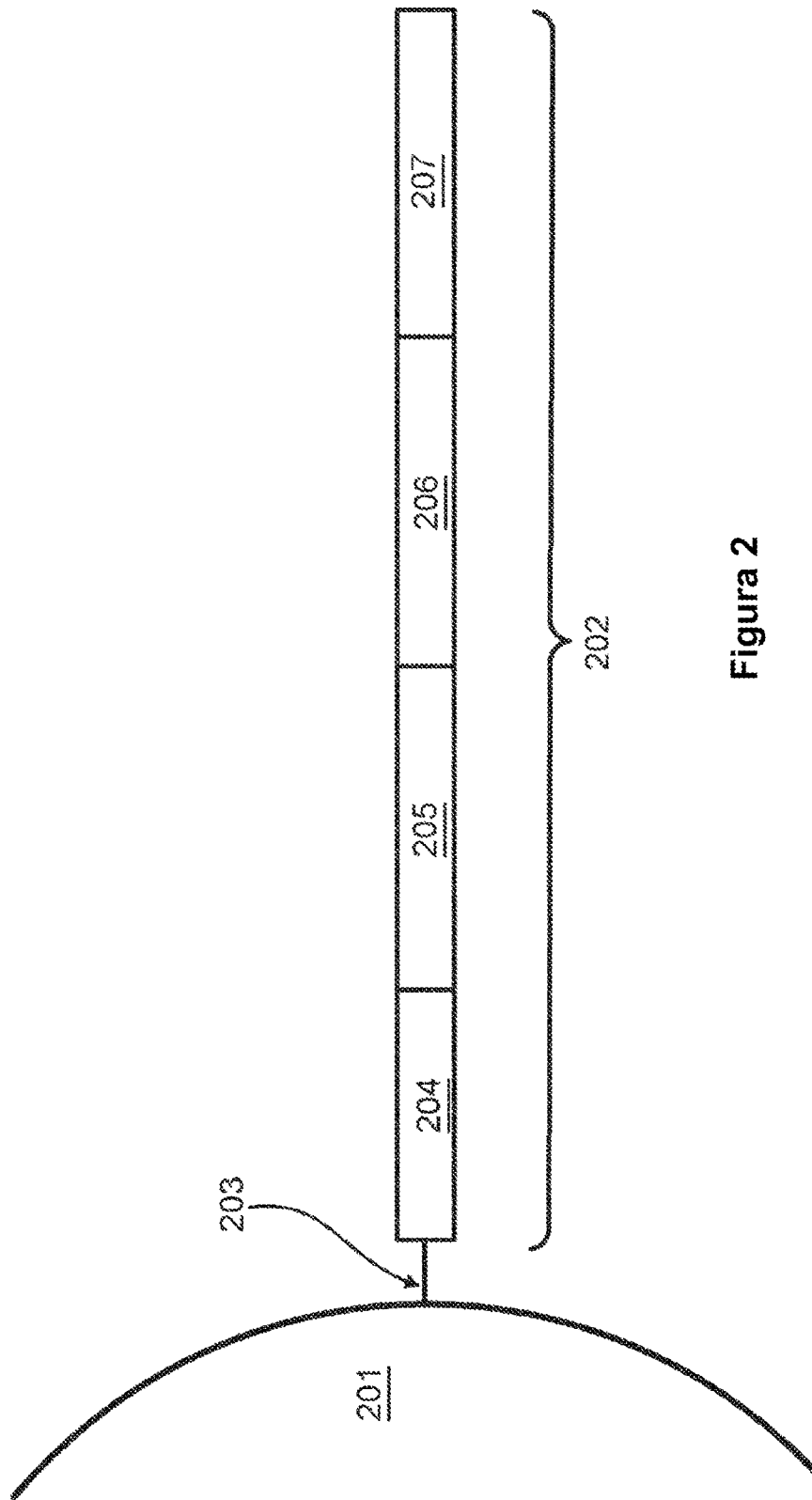


Figura 2

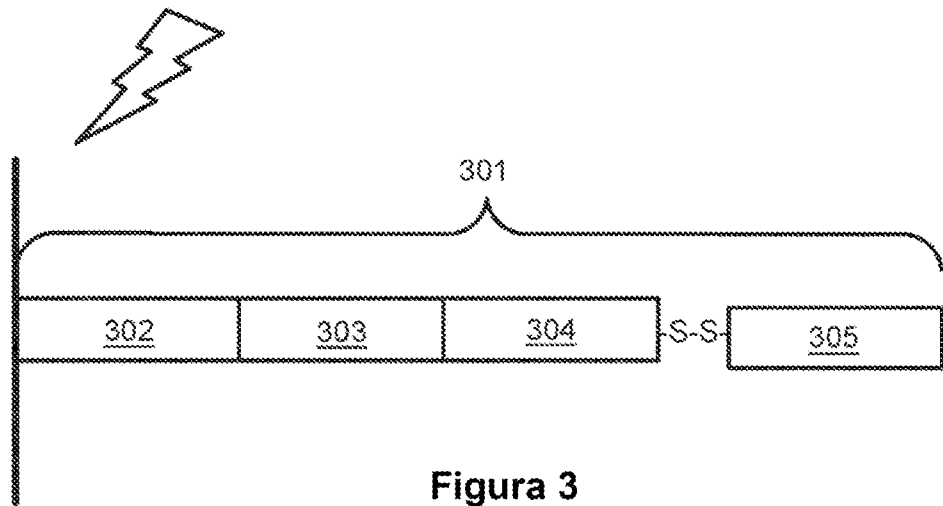


Figura 3

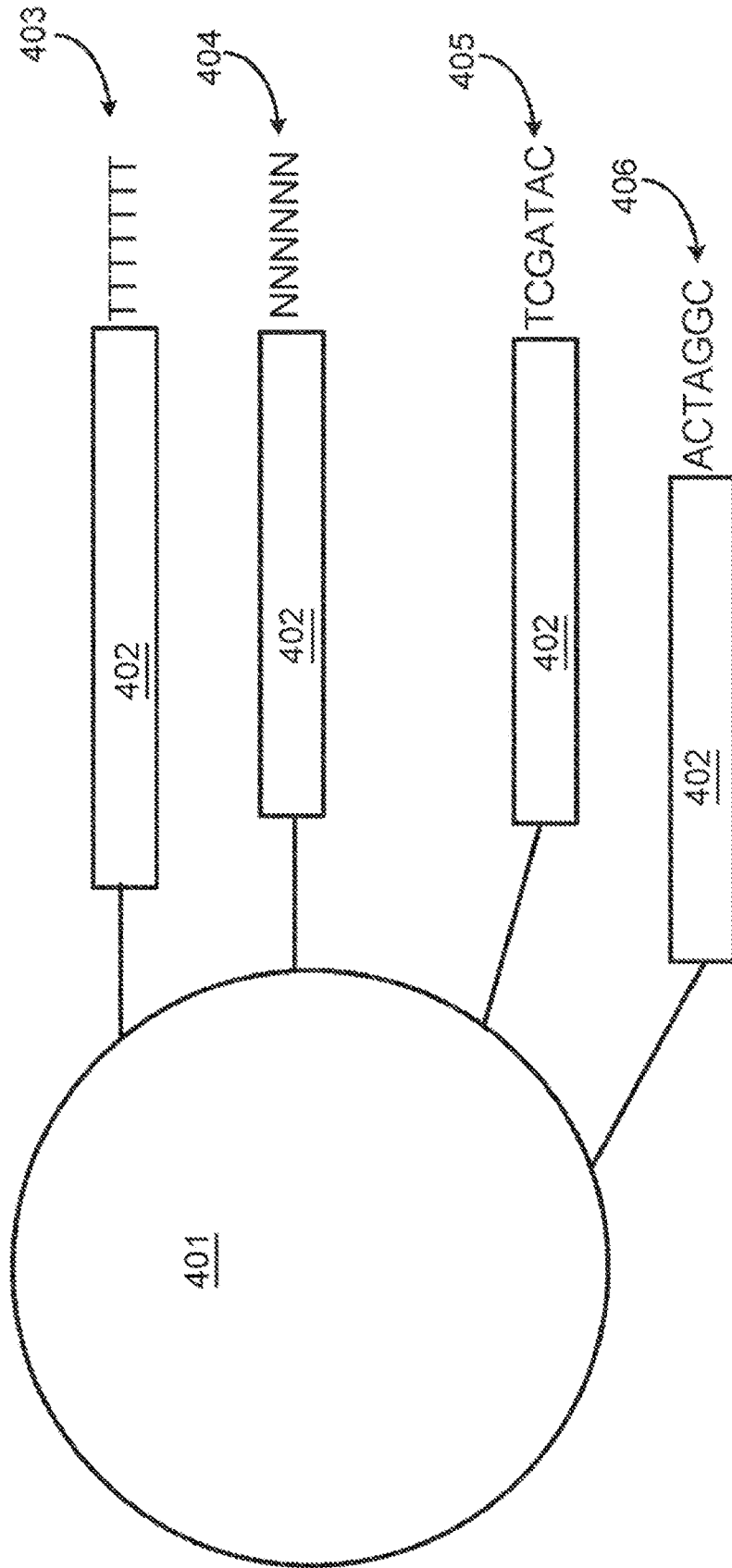


Figure 4

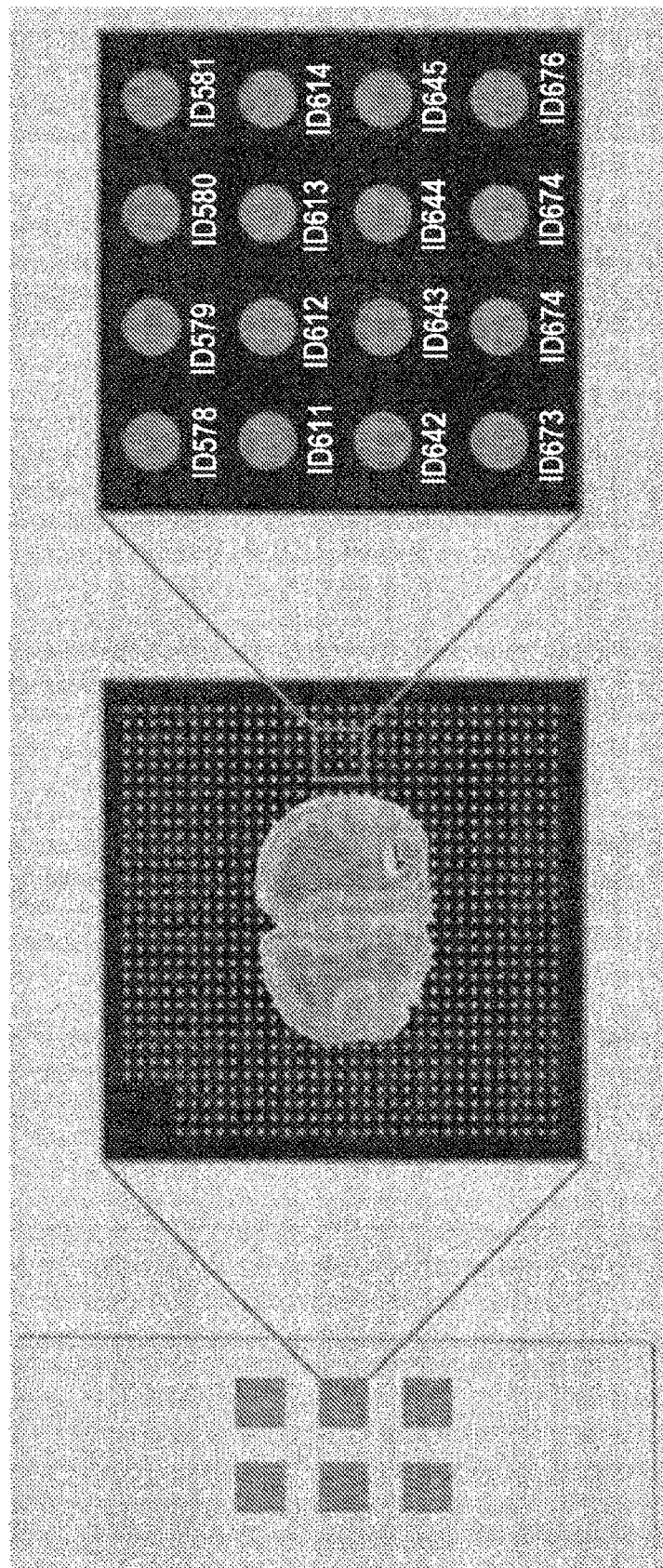


Figura 5

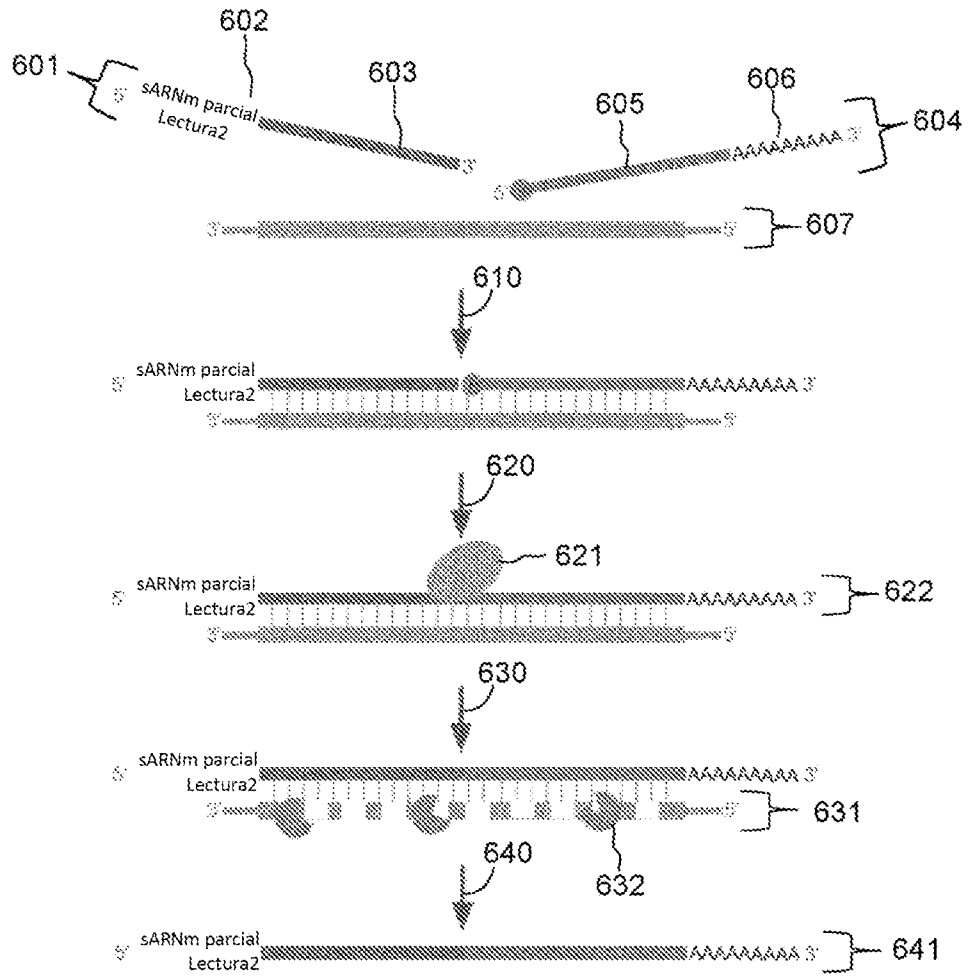


Figura 6

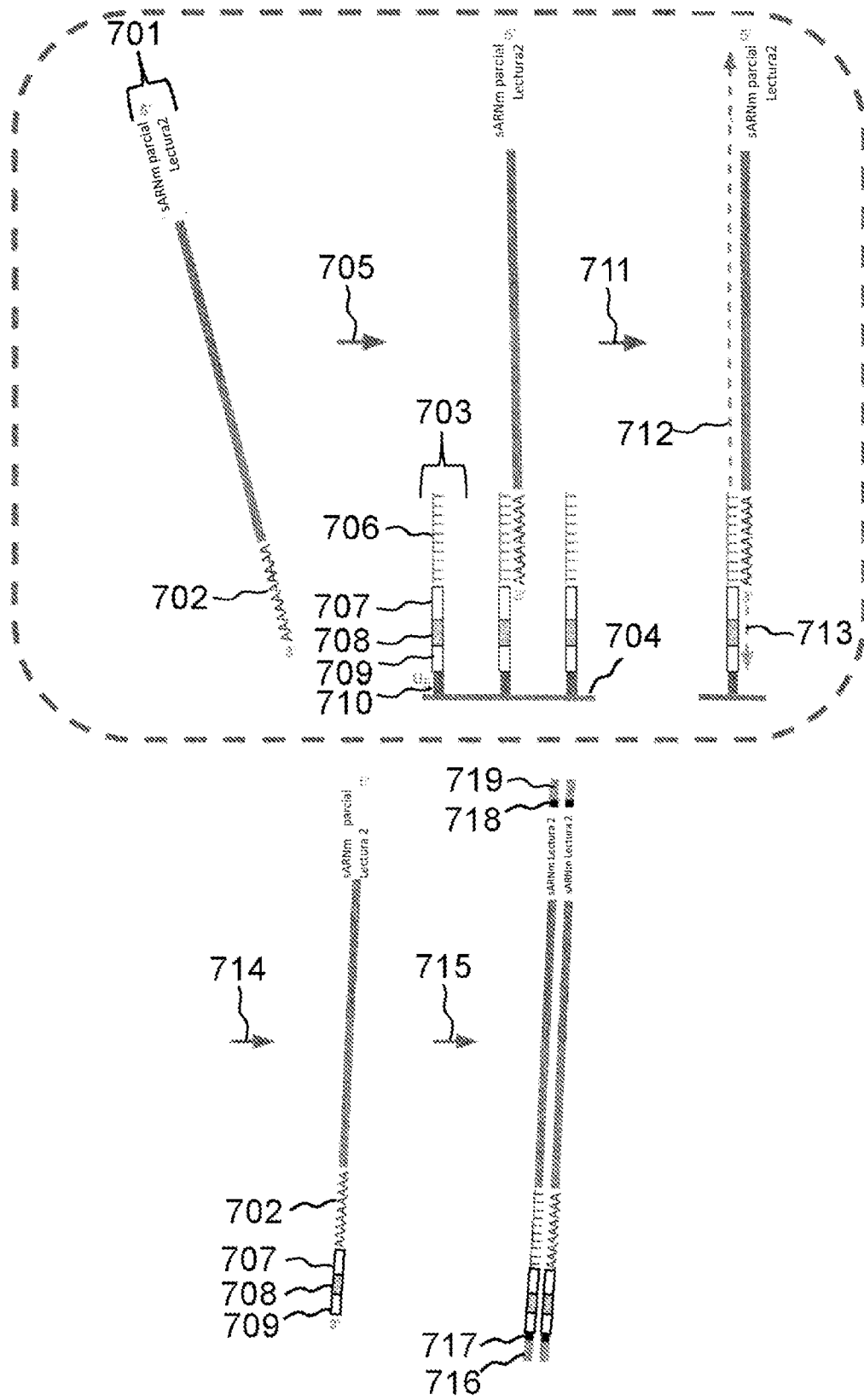


Figura 7

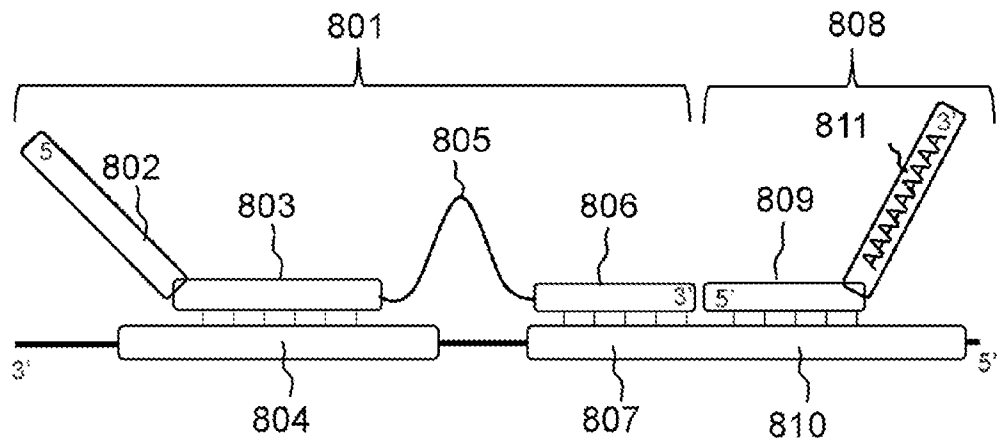


Figura 8

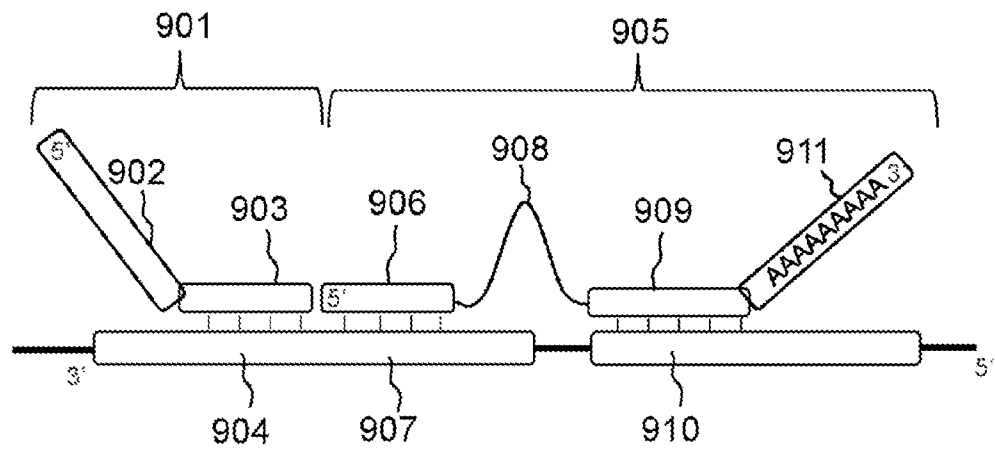


Figura 9

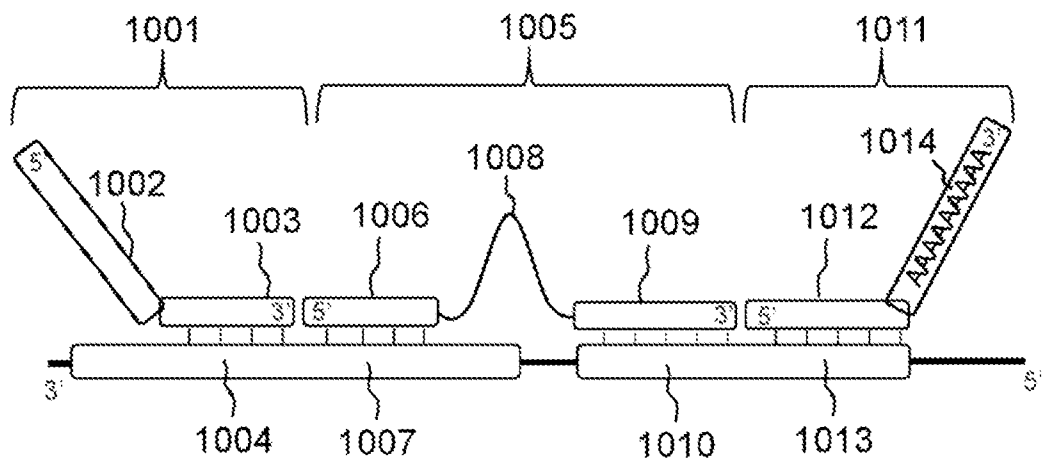


Figura 10

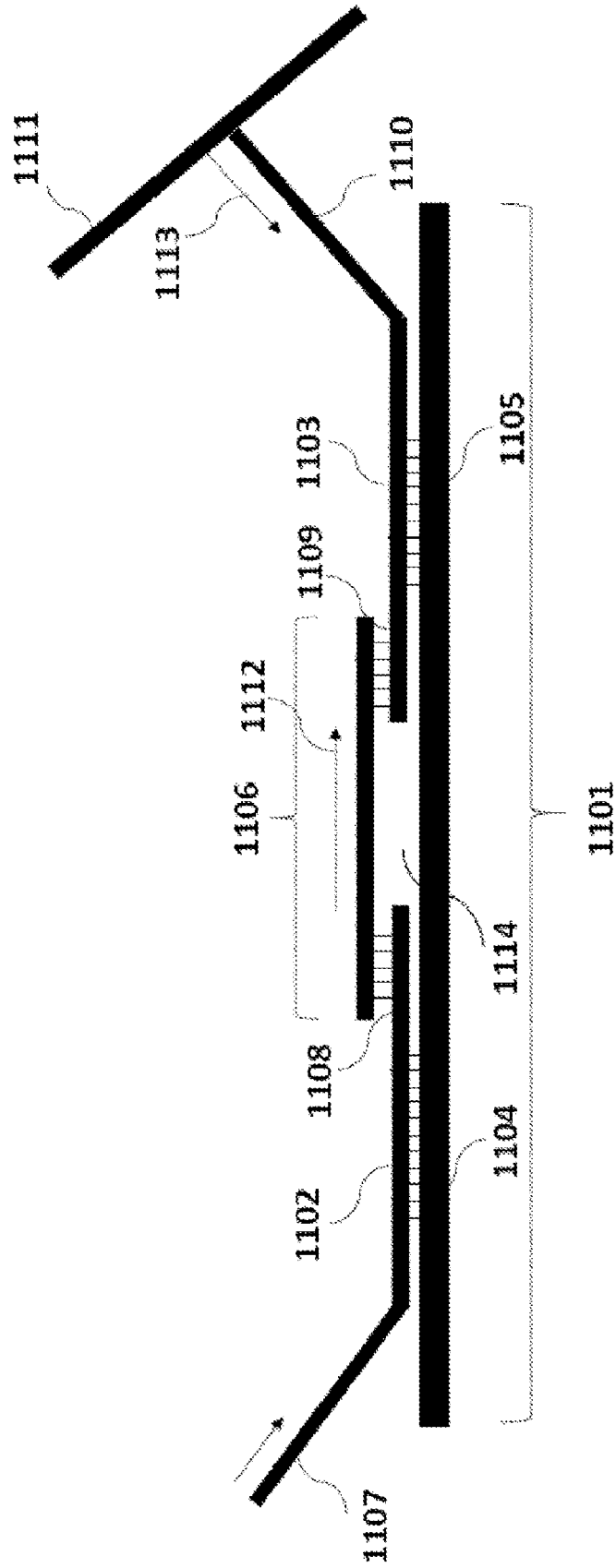


Figure 11

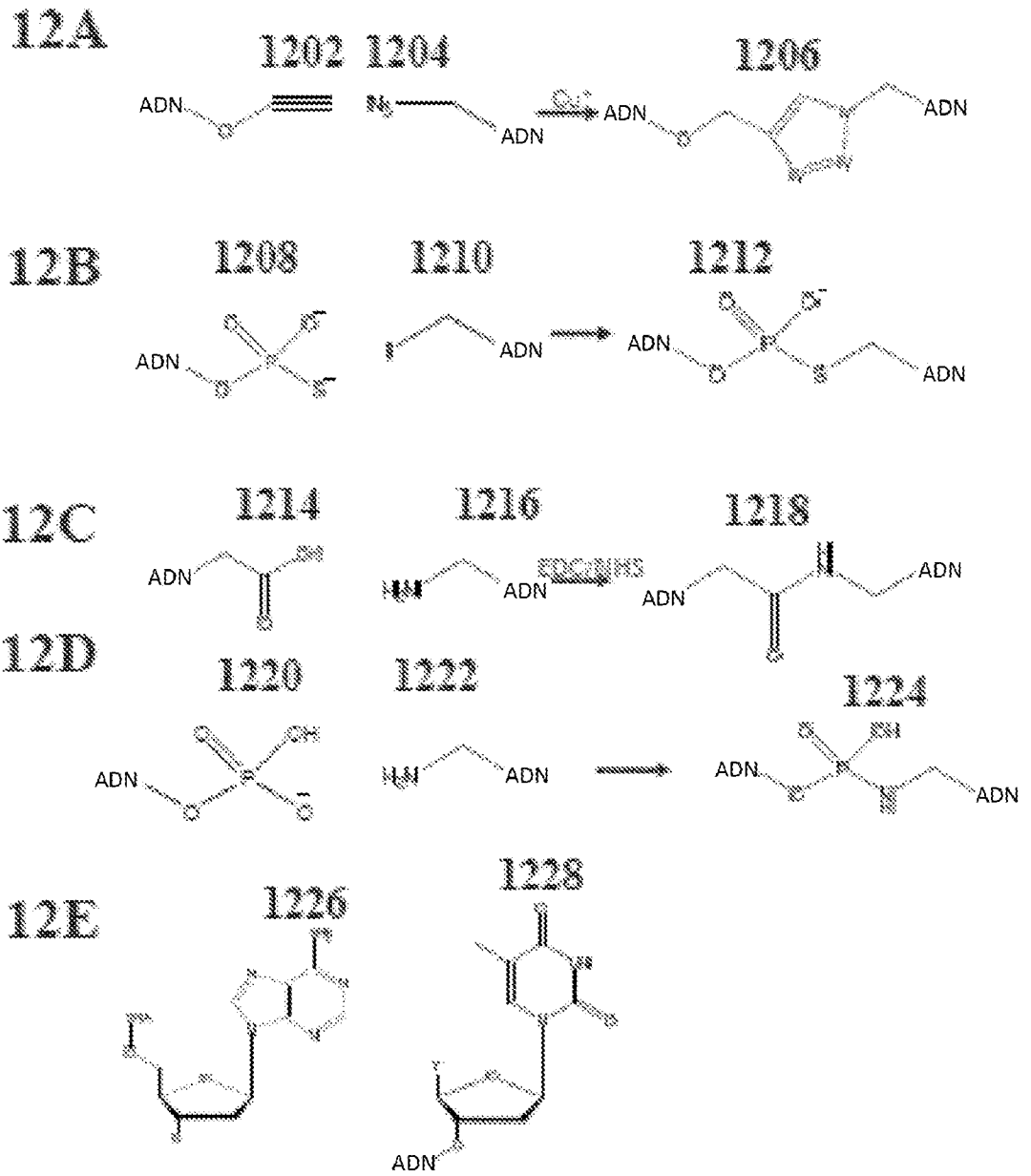
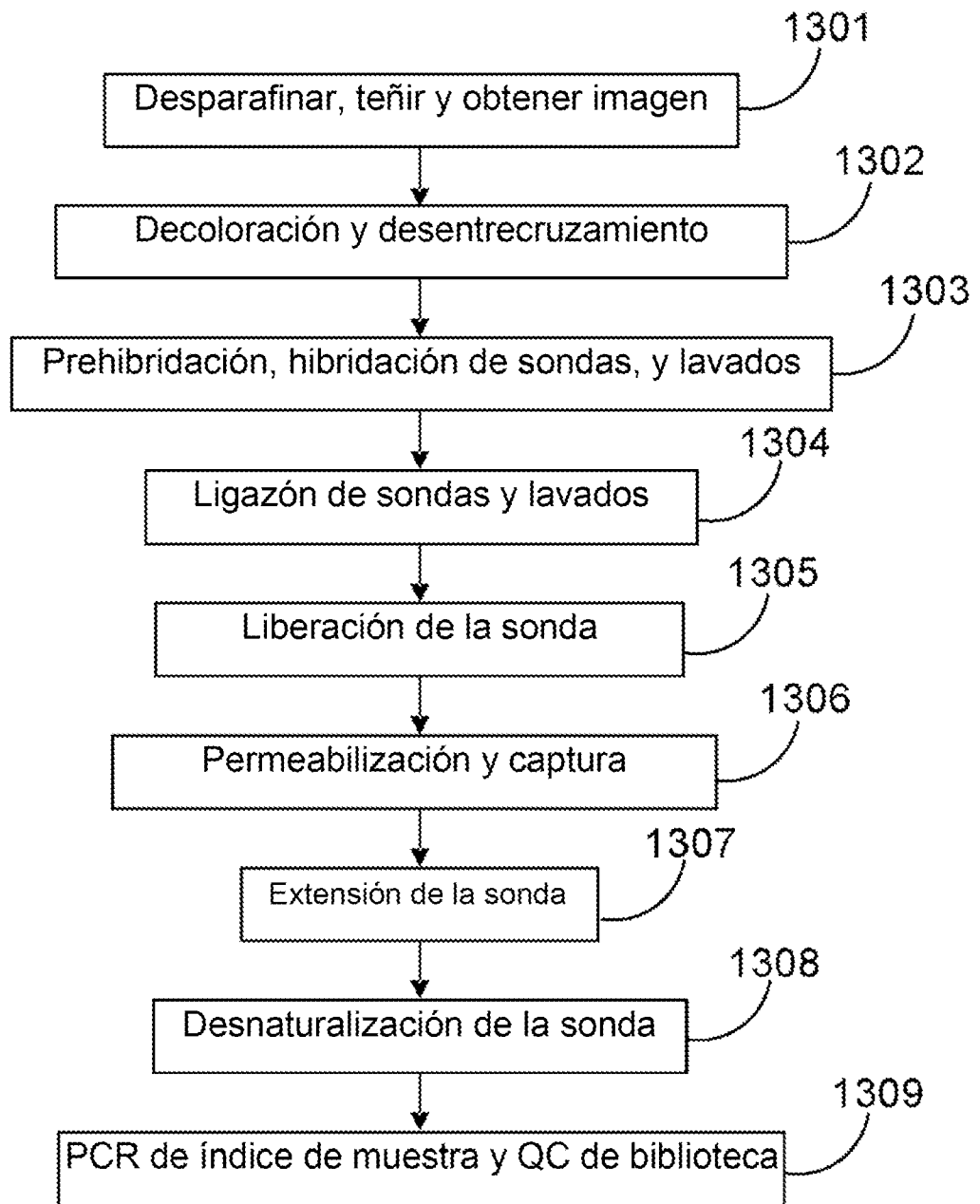
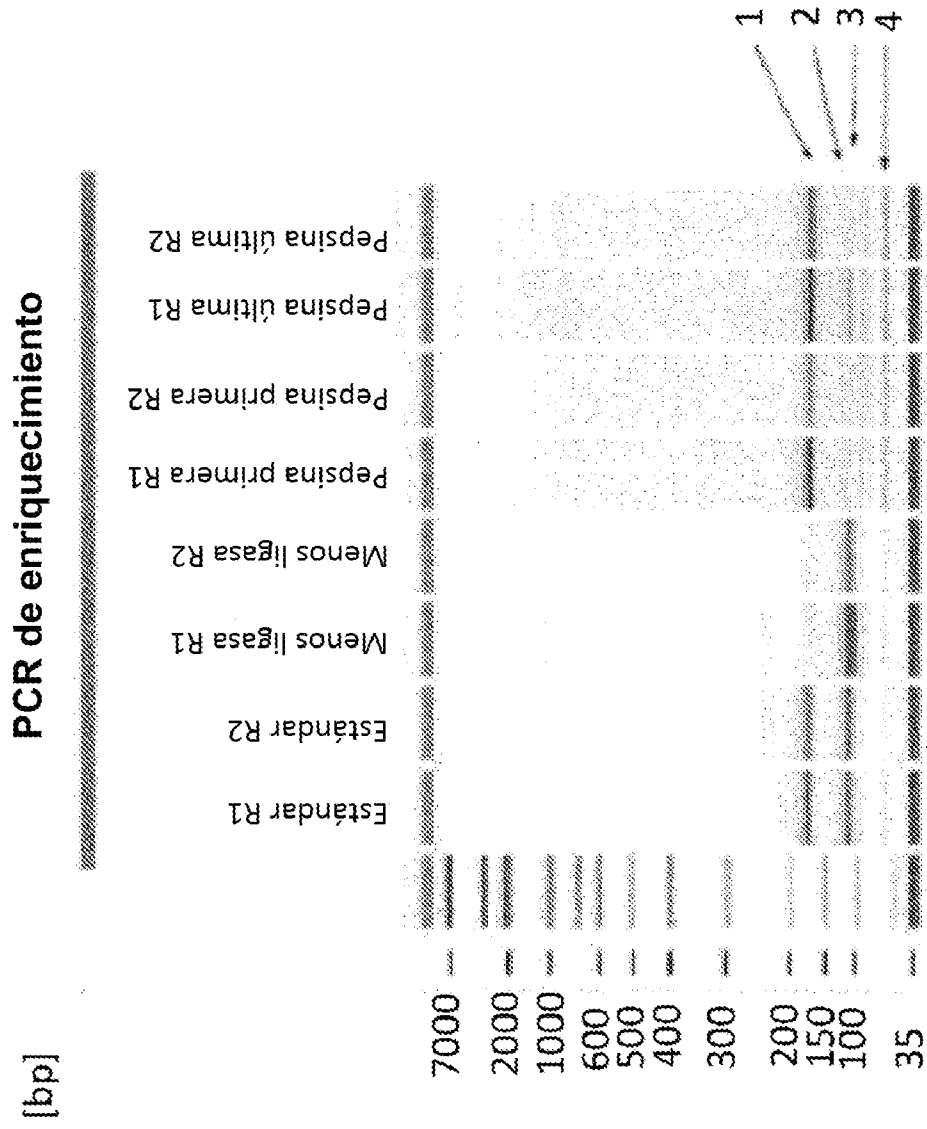


Figura 12



**Figura 13**



**Figura 14**

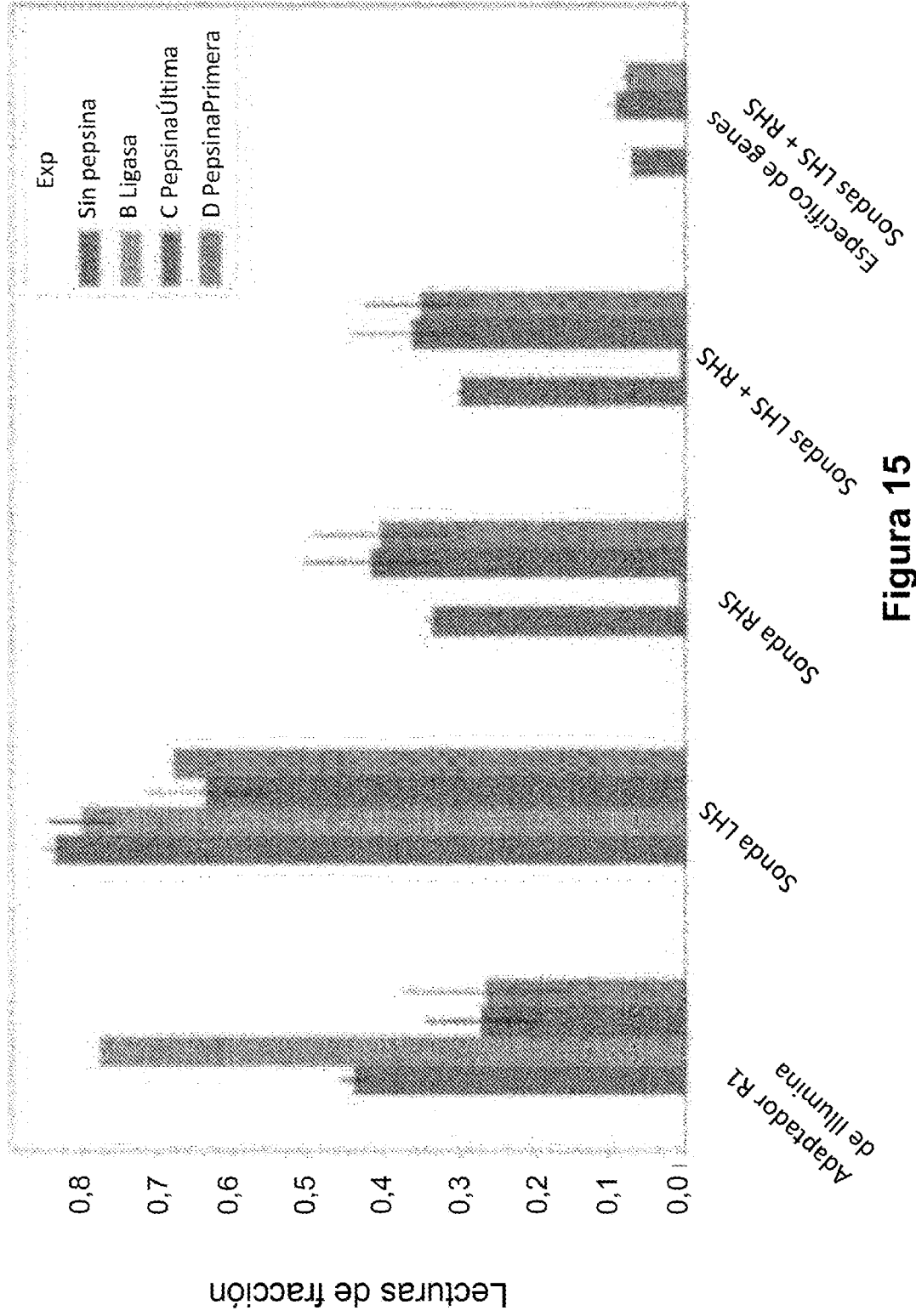
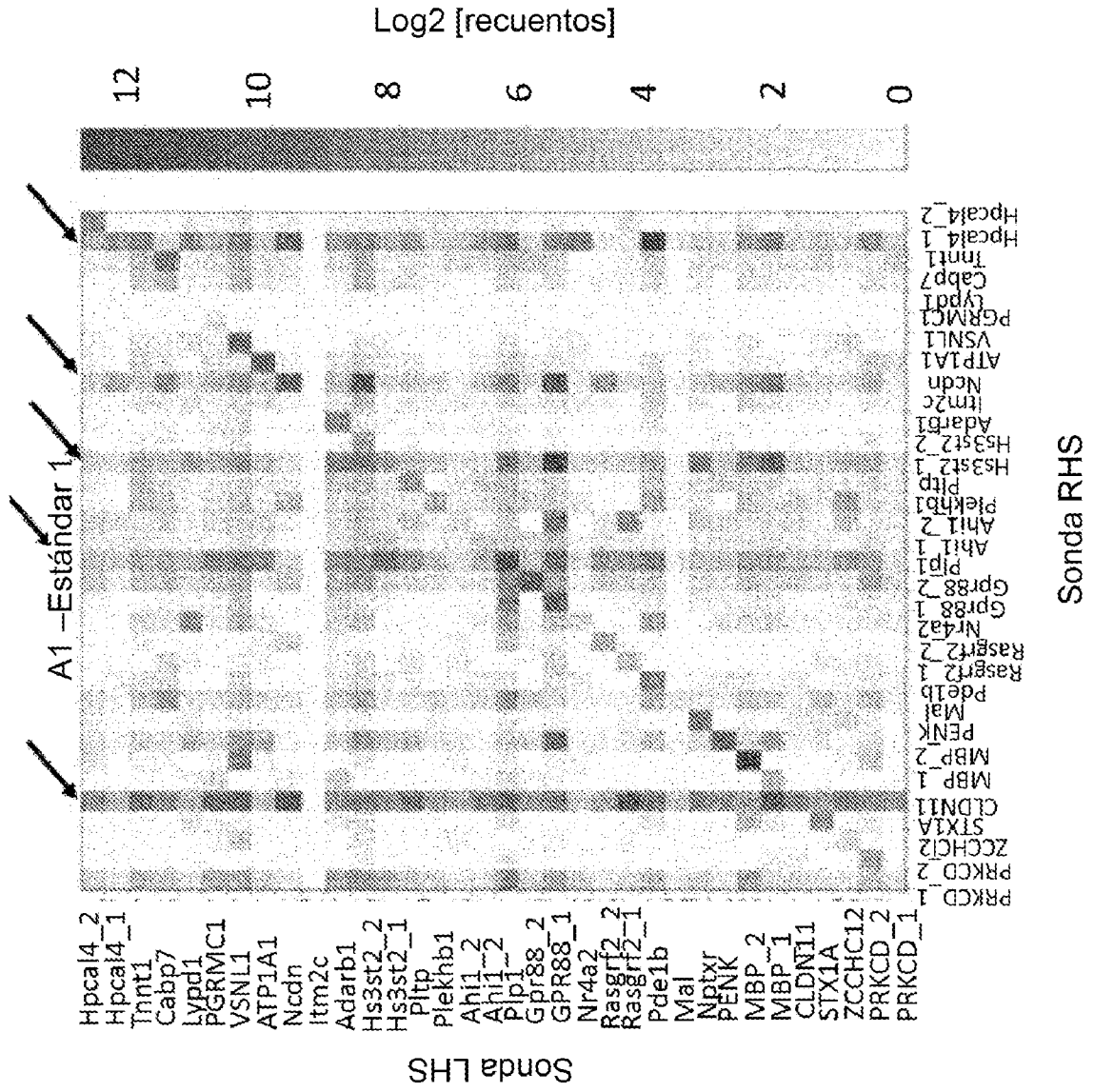
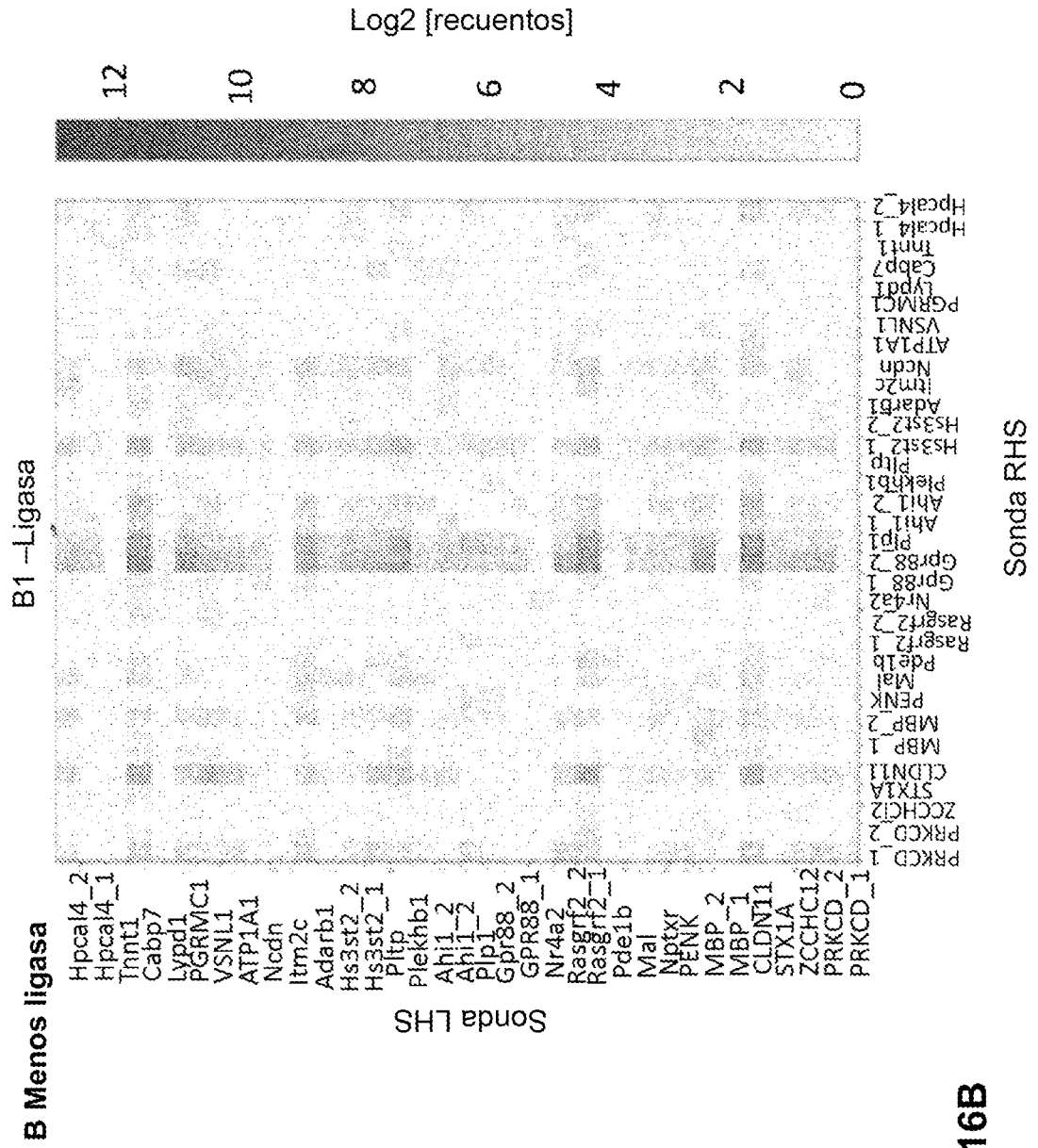


Figura 15



A estándar

Figura 16A

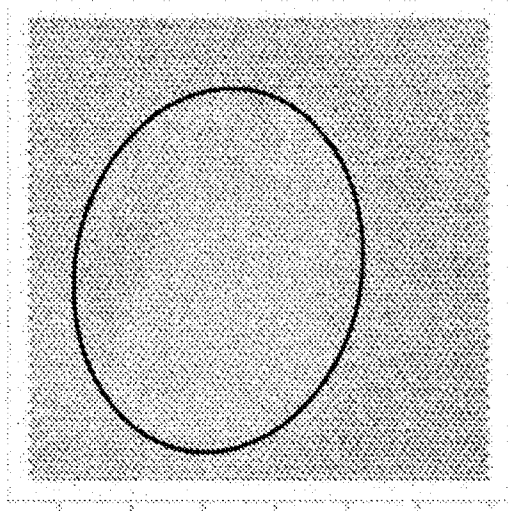


**Figura 16B**

Bajo Alto

Nivel de expresión

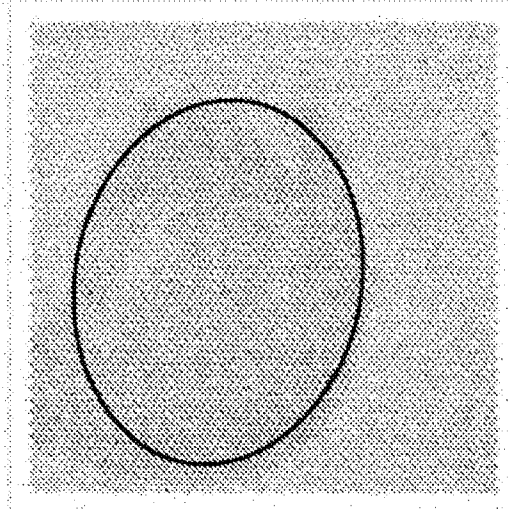
Recuentos de LHS+RHS



Bajo Alto

Nivel de expresión

recuentos de LHS+RHS



Bajo Alto

Nivel de expresión

recuentos de LHS+RHS

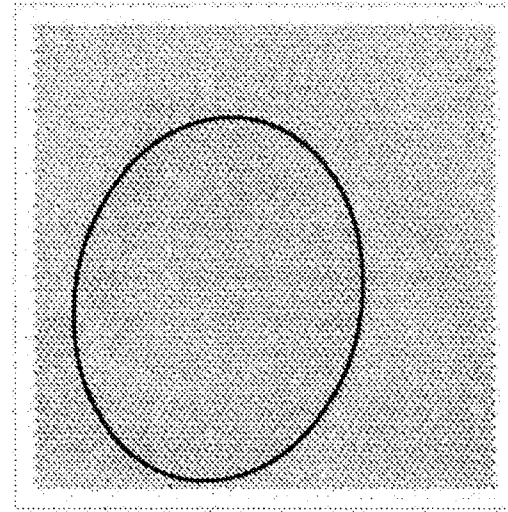
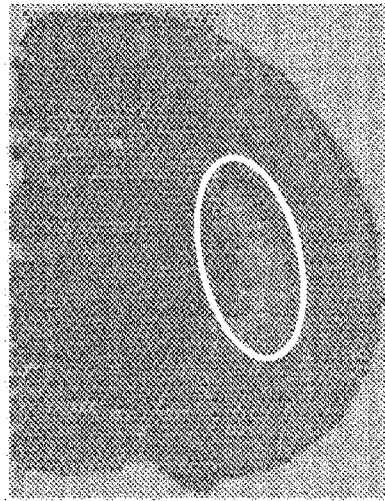


Figura 17C

Figura 17B

Figura 17A

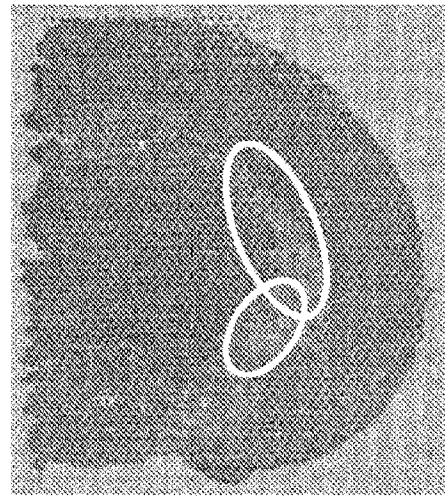


**Grp88**

Bajo Alto

Nivel de expresión

**Figura 18A**



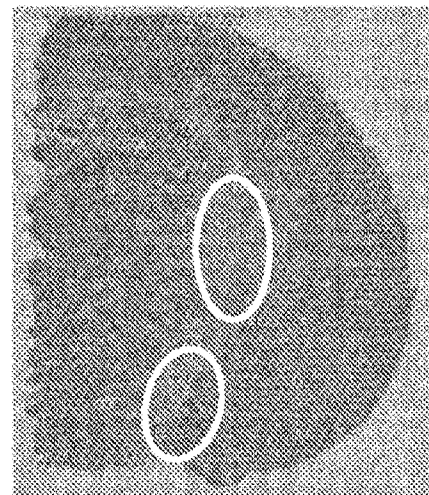
**Penk**

Bajo Alto

Nivel de expresión

**Figura 18B**

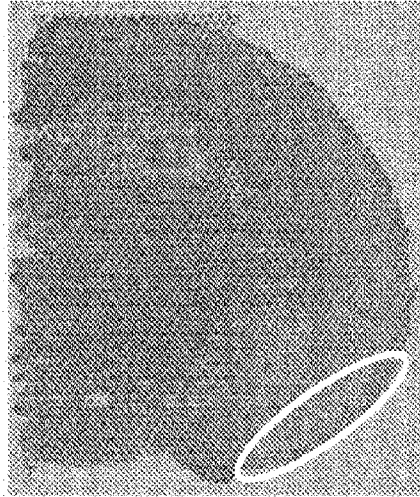
**Figura 18C**



**Pip1**

Bajo Alto

Nivel de expresión



**Nptrx**

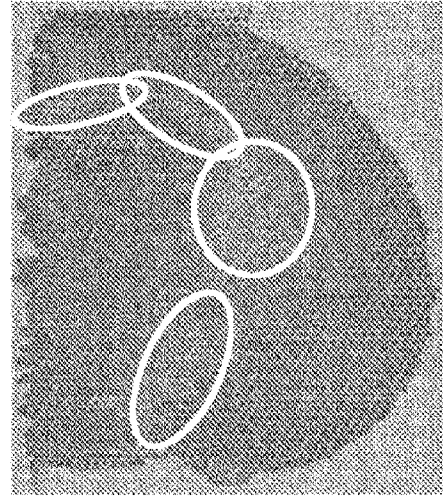
Bajo

Alto



Nivel de expresión

**Figura 18D**



**Mbp2**

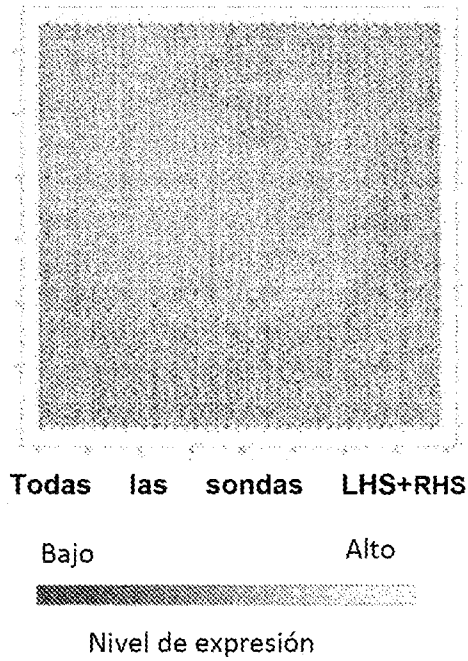
Bajo

Alto

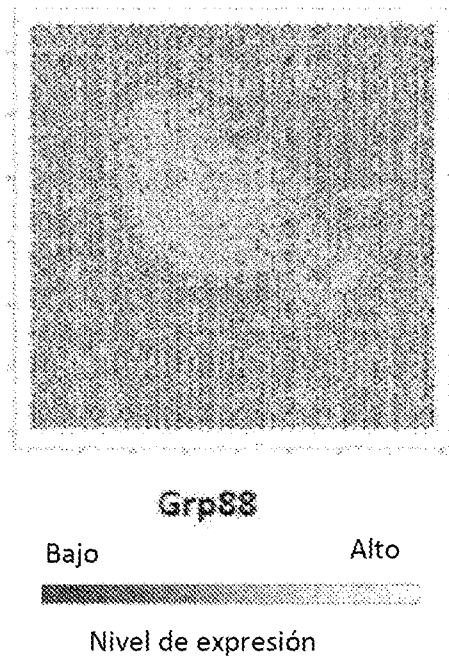


Nivel de expresión

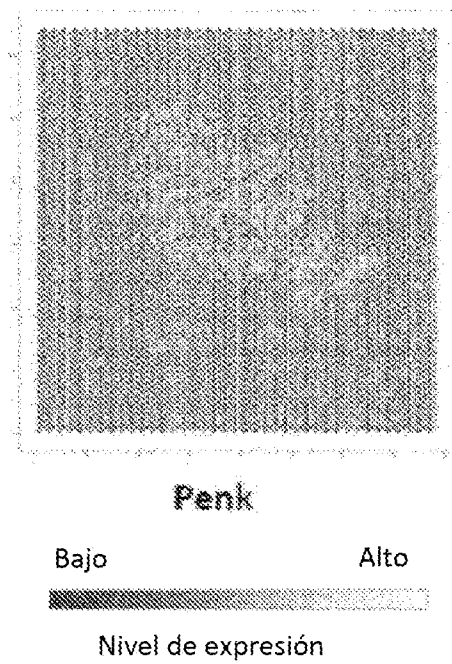
**Figura 18E**



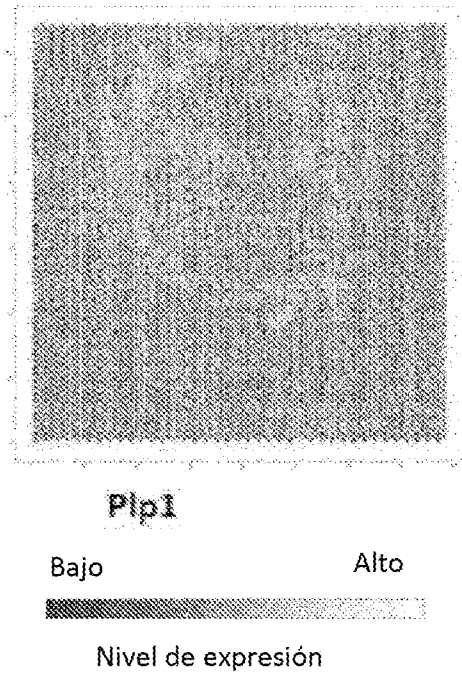
**Figura 19A**



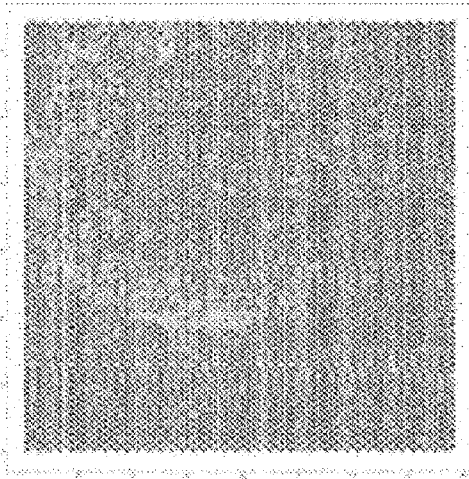
**Figura 19B**



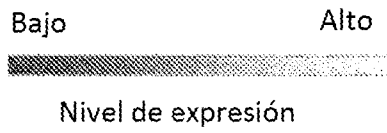
**Figura 19C**



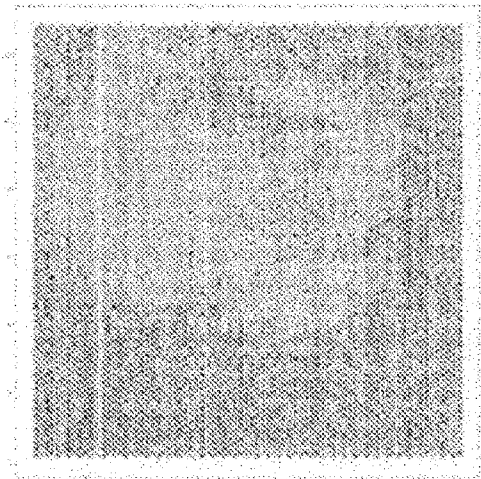
**Figura 19D**



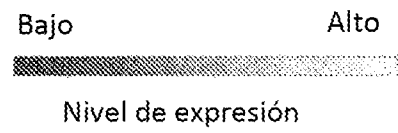
**Nptrx**



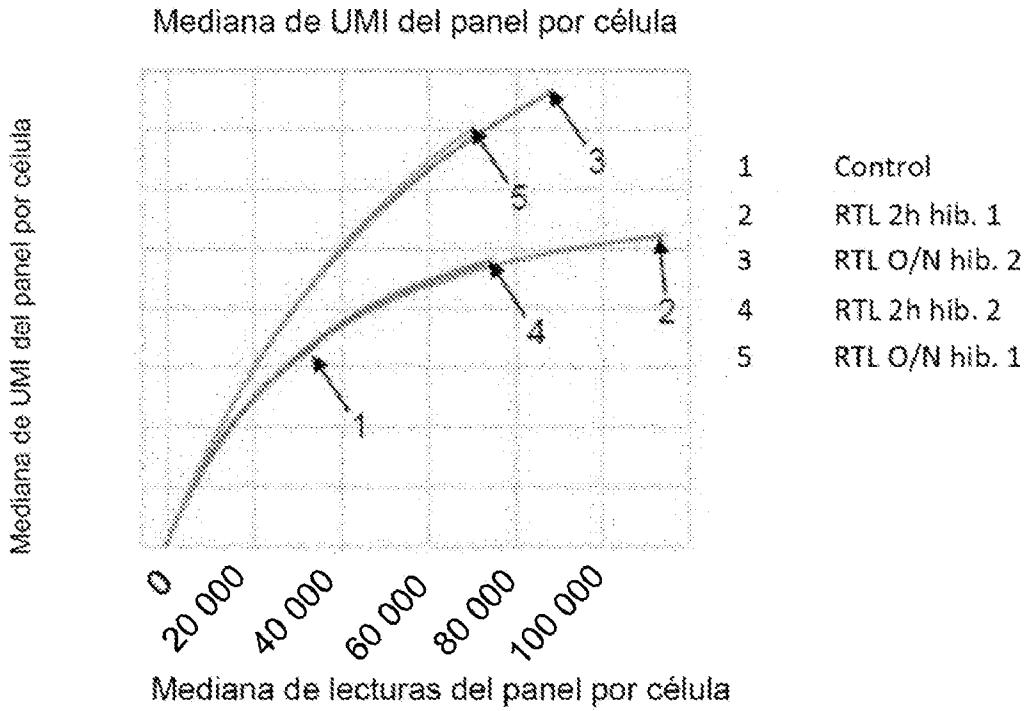
**Figura 19E**



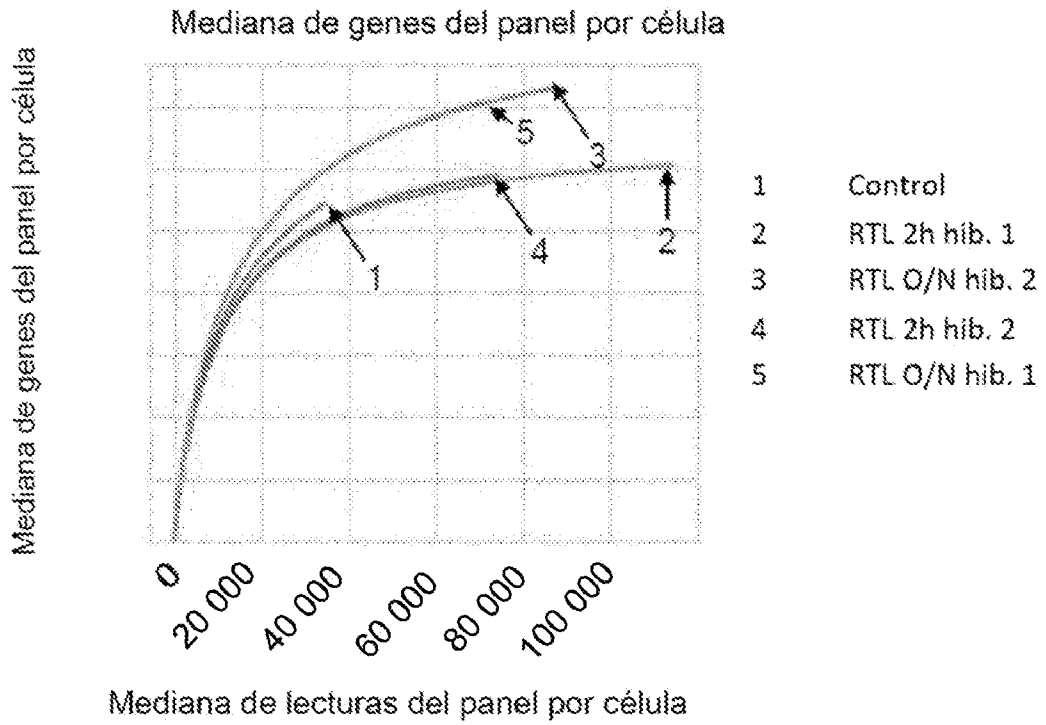
**Mbp2**



**Figura 19F**



**Figura 20A**



**Figura 20B**

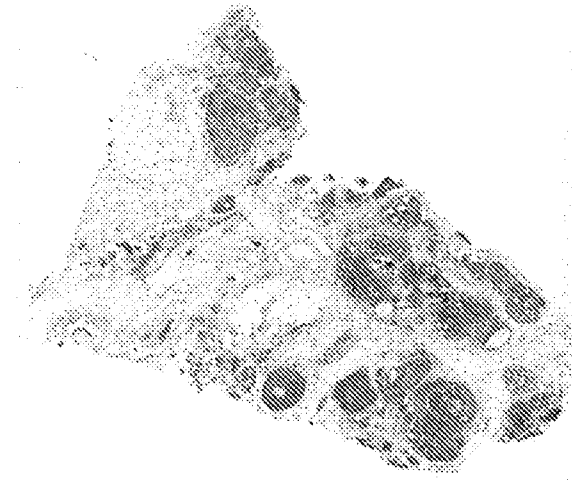


Figura 21A

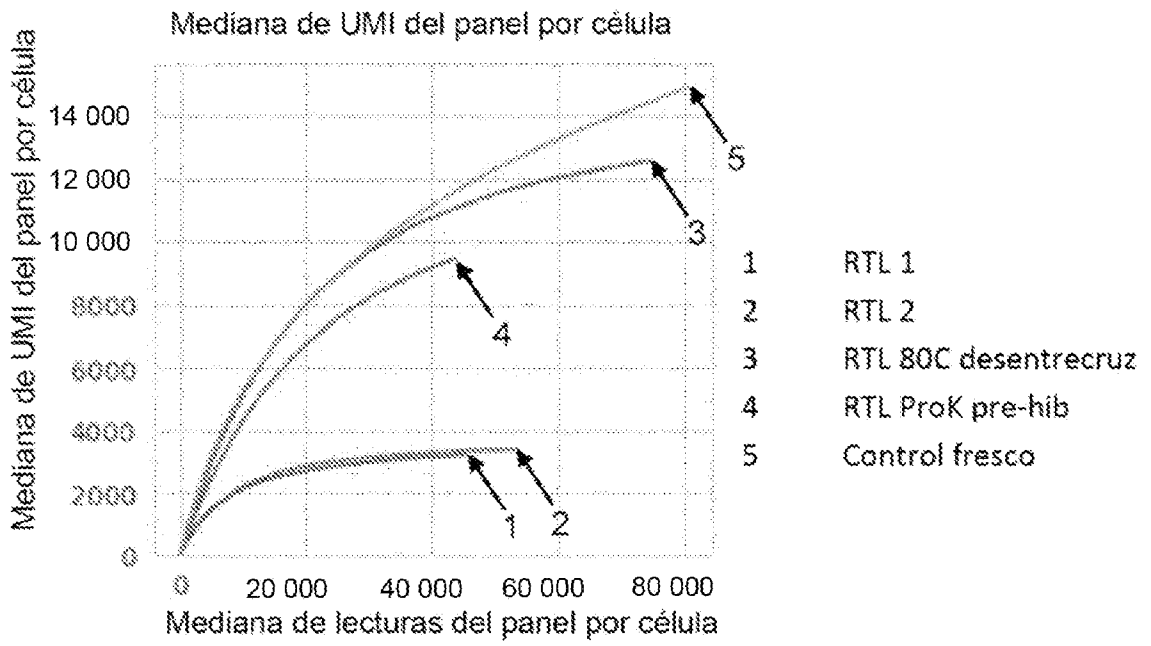


Figura 21B

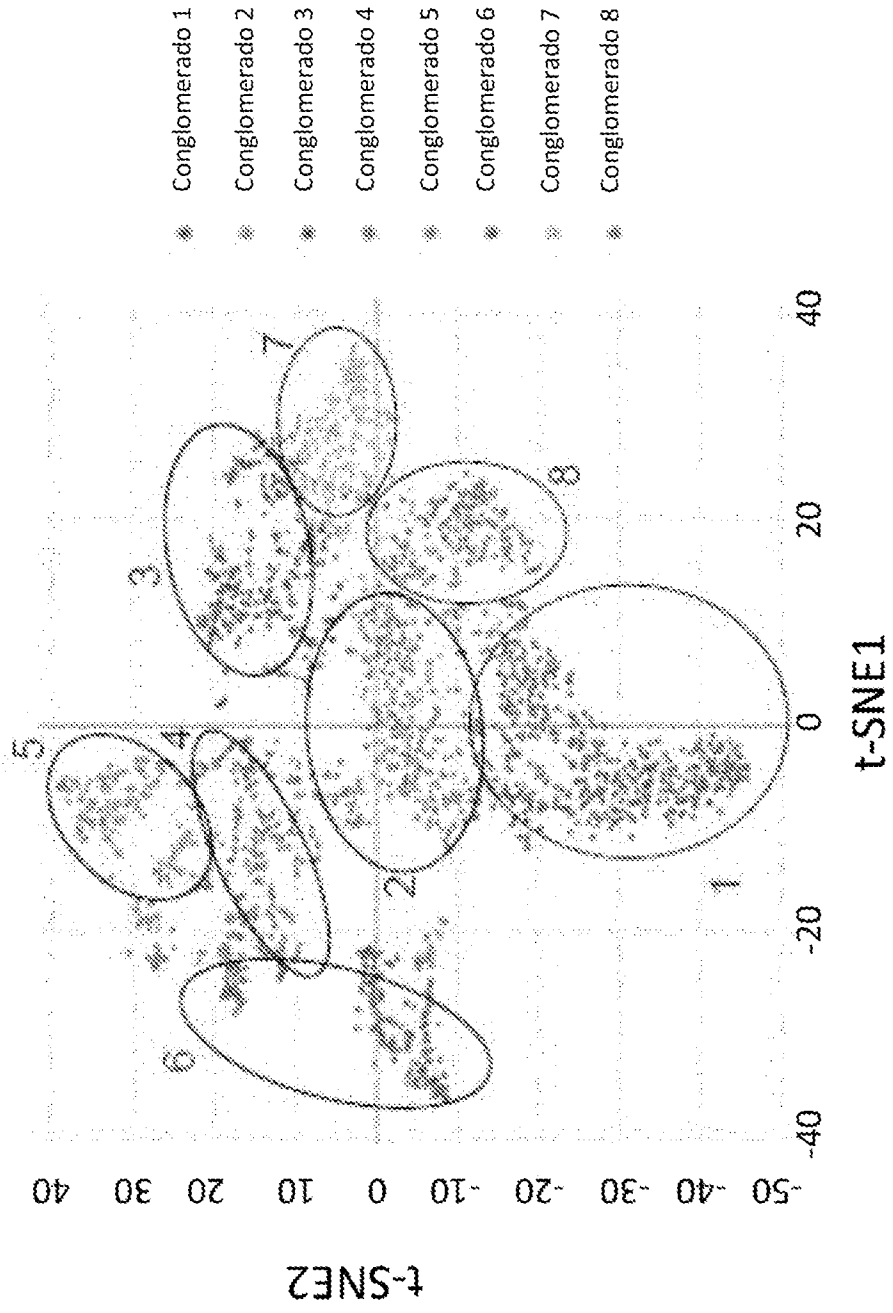
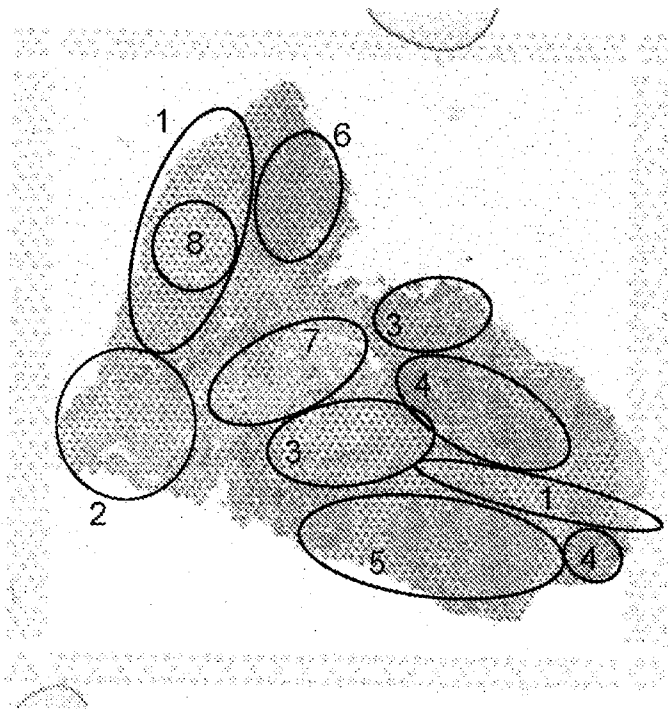


Figura 21C



- ✦ Conglomerado 1
- ✦ Conglomerado 2
- ✦ Conglomerado 3
- ✦ Conglomerado 4
- ✦ Conglomerado 5
- ✦ Conglomerado 6
- ✦ Conglomerado 7
- ✦ Conglomerado 8

**Figura 21D**

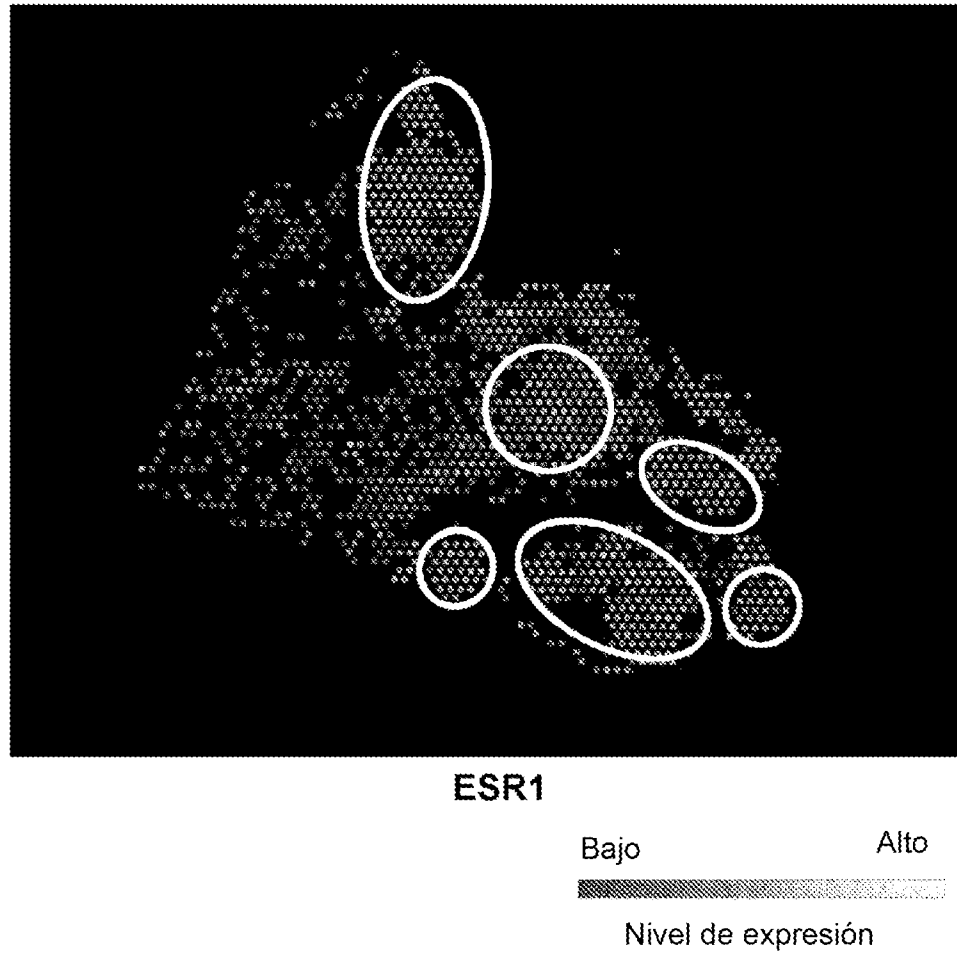
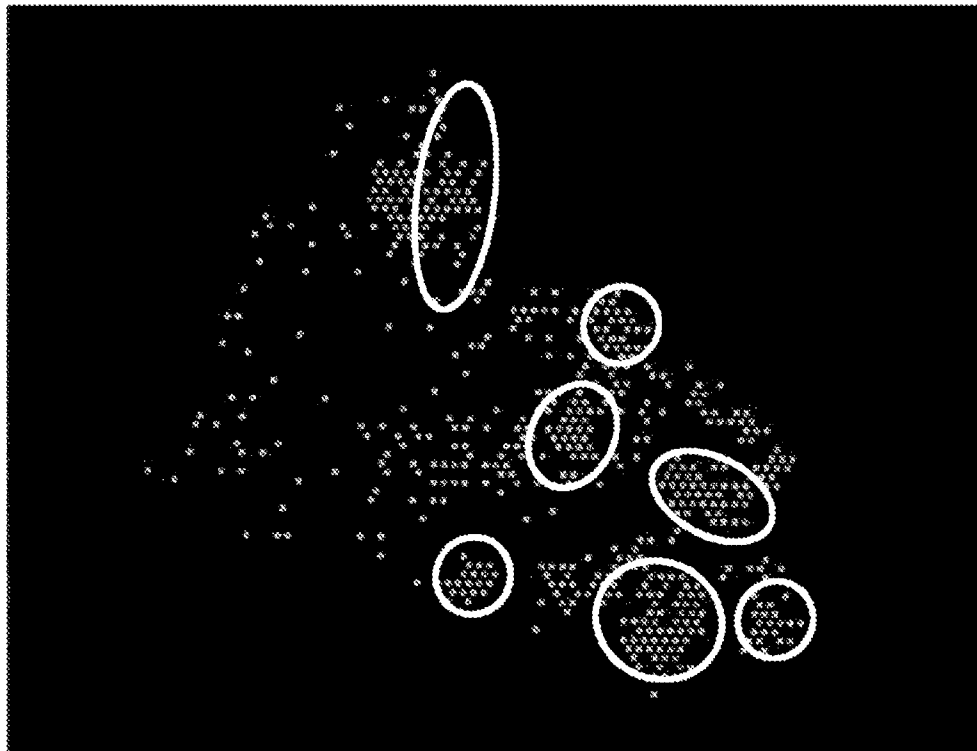


Figura 21E



PGR

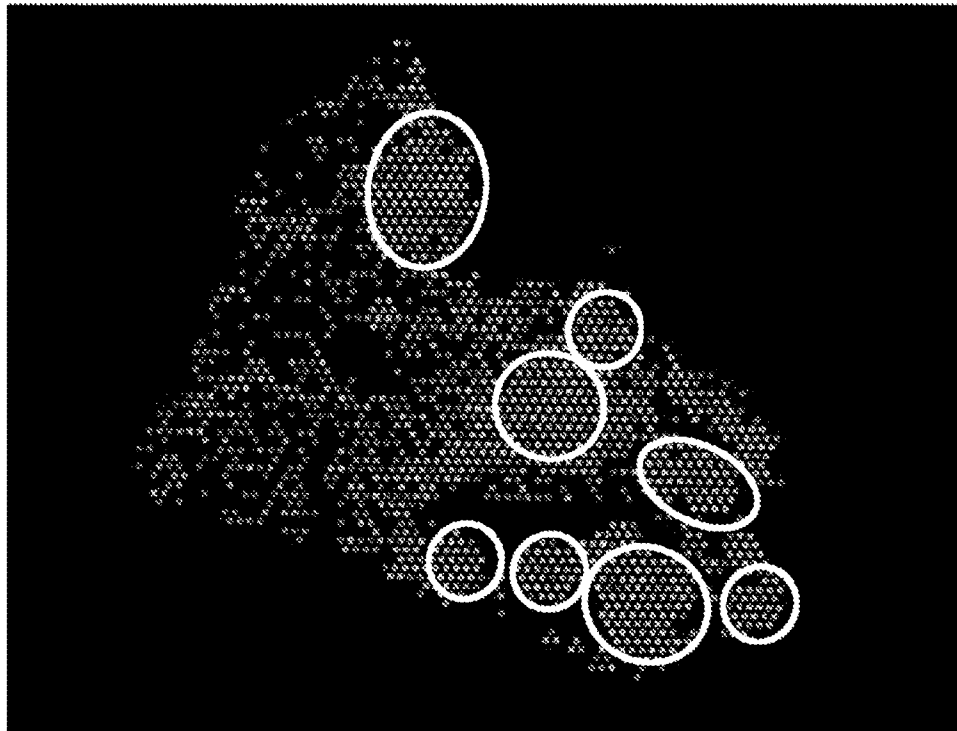
Bajo

Alto



Nivel de expresión

Figura 21F



ERBB2 / HER2

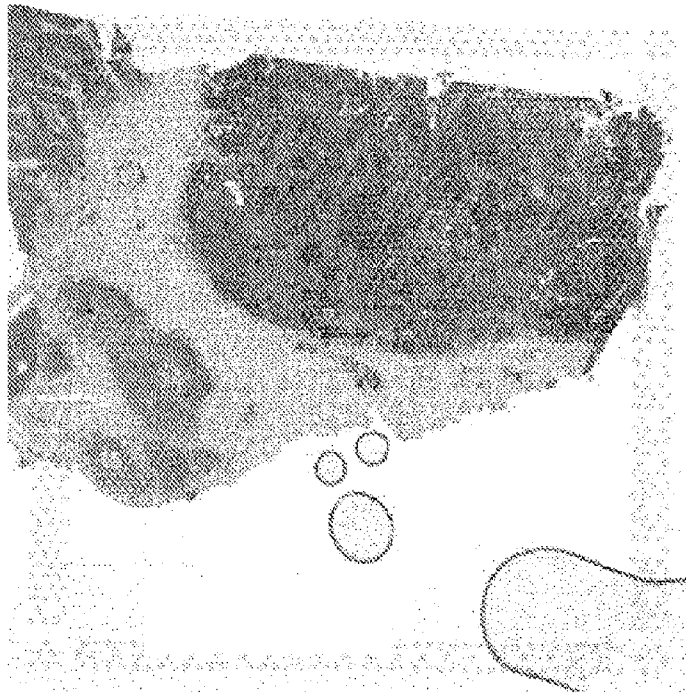
Bajo

Alto



Nivel de expresión

Figura 21G



**Figura 22A**

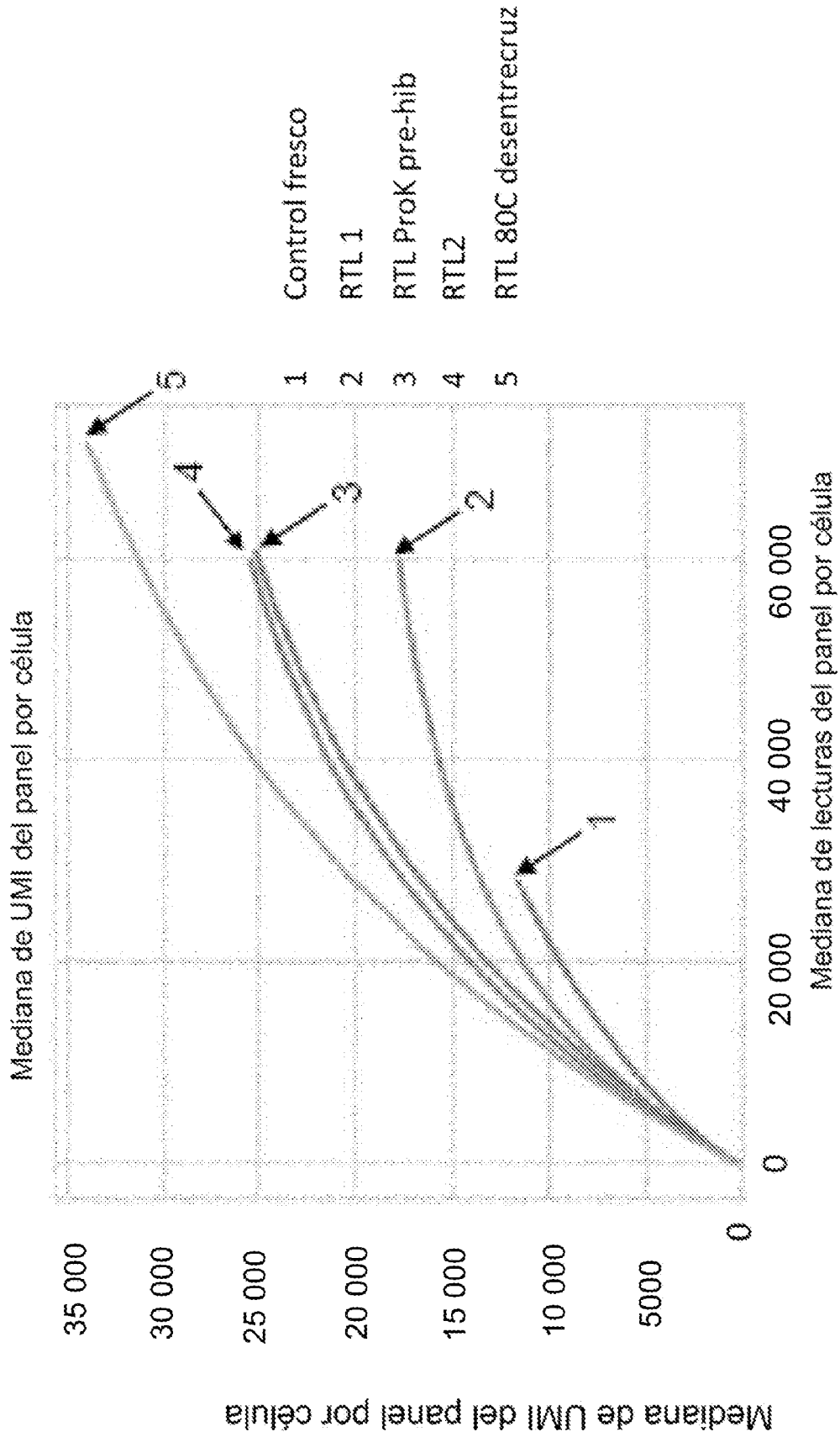
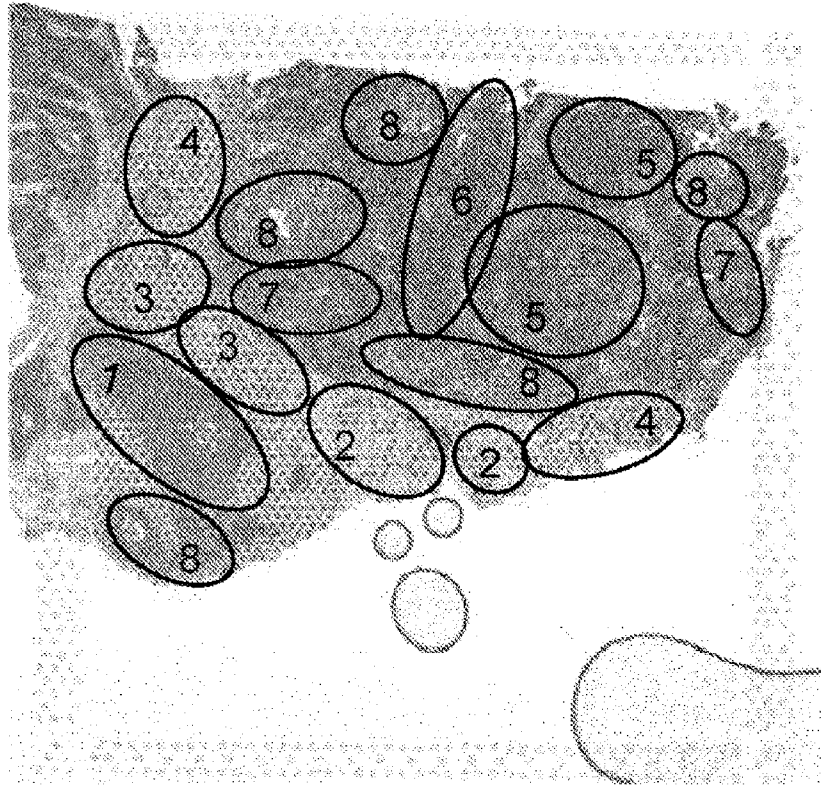


Figura 22B



**Figura 22C**

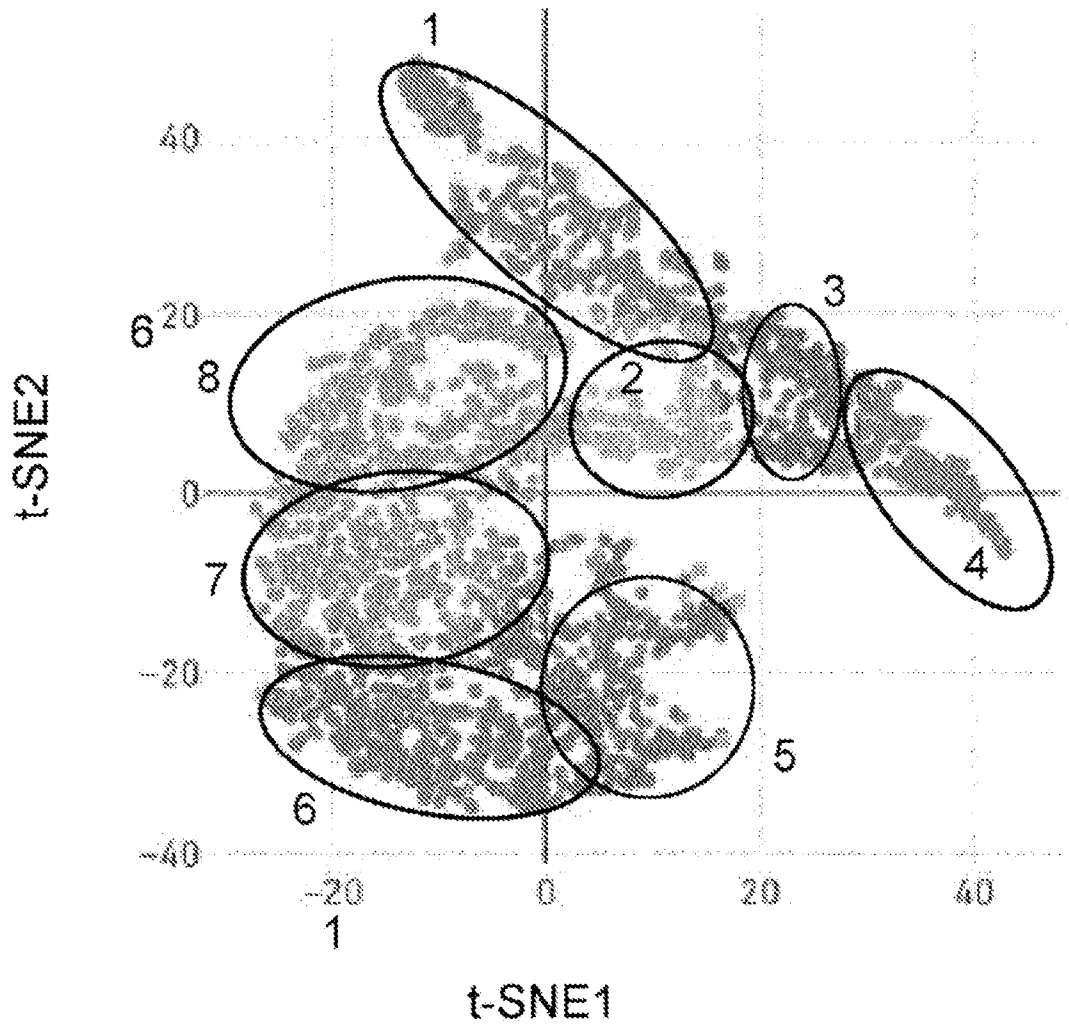


Figura 22D

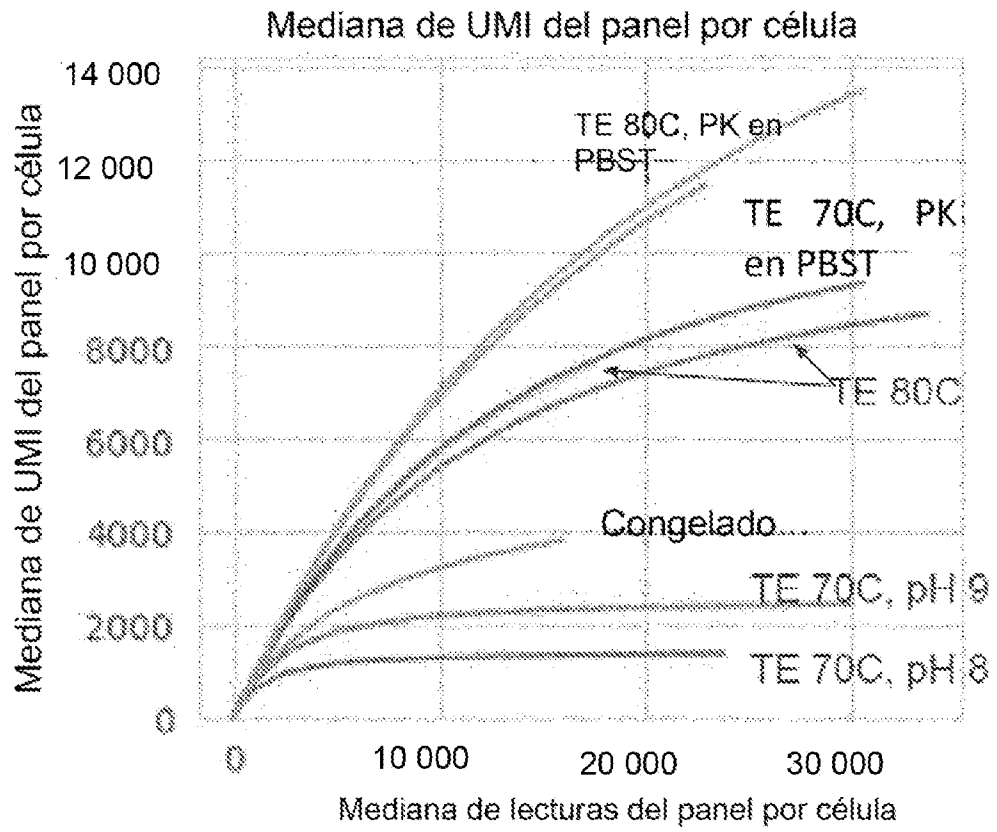
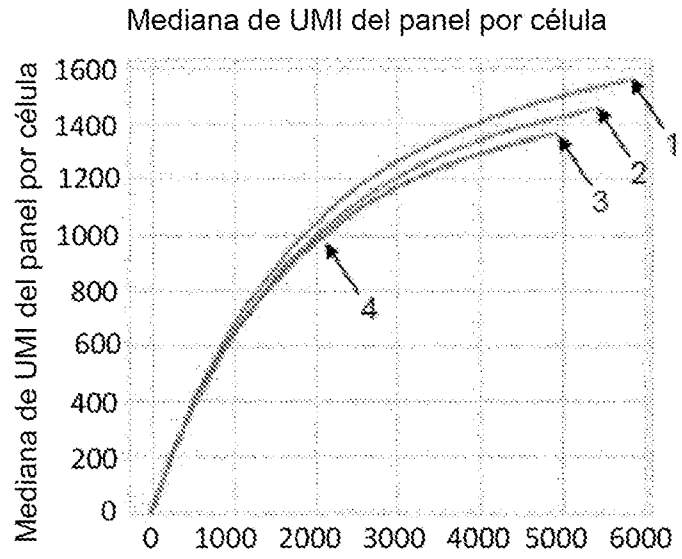
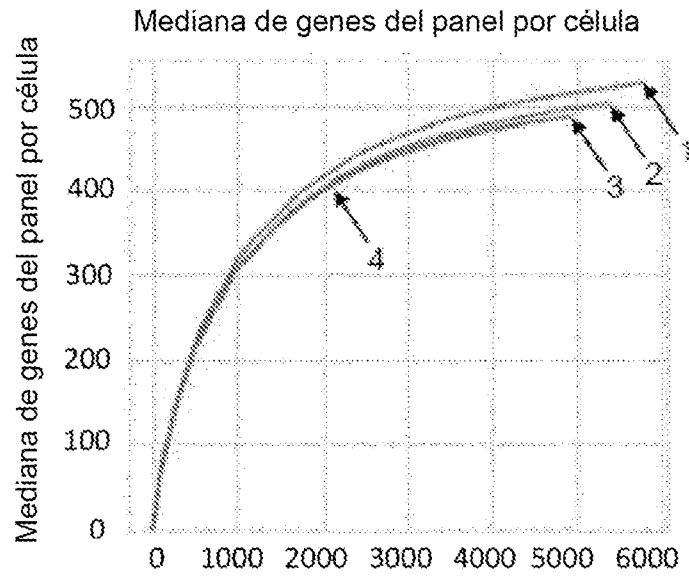


Figura 23



Mediana de lecturas del panel por célula



Mediana de lecturas del panel por célula

**Figura 24**

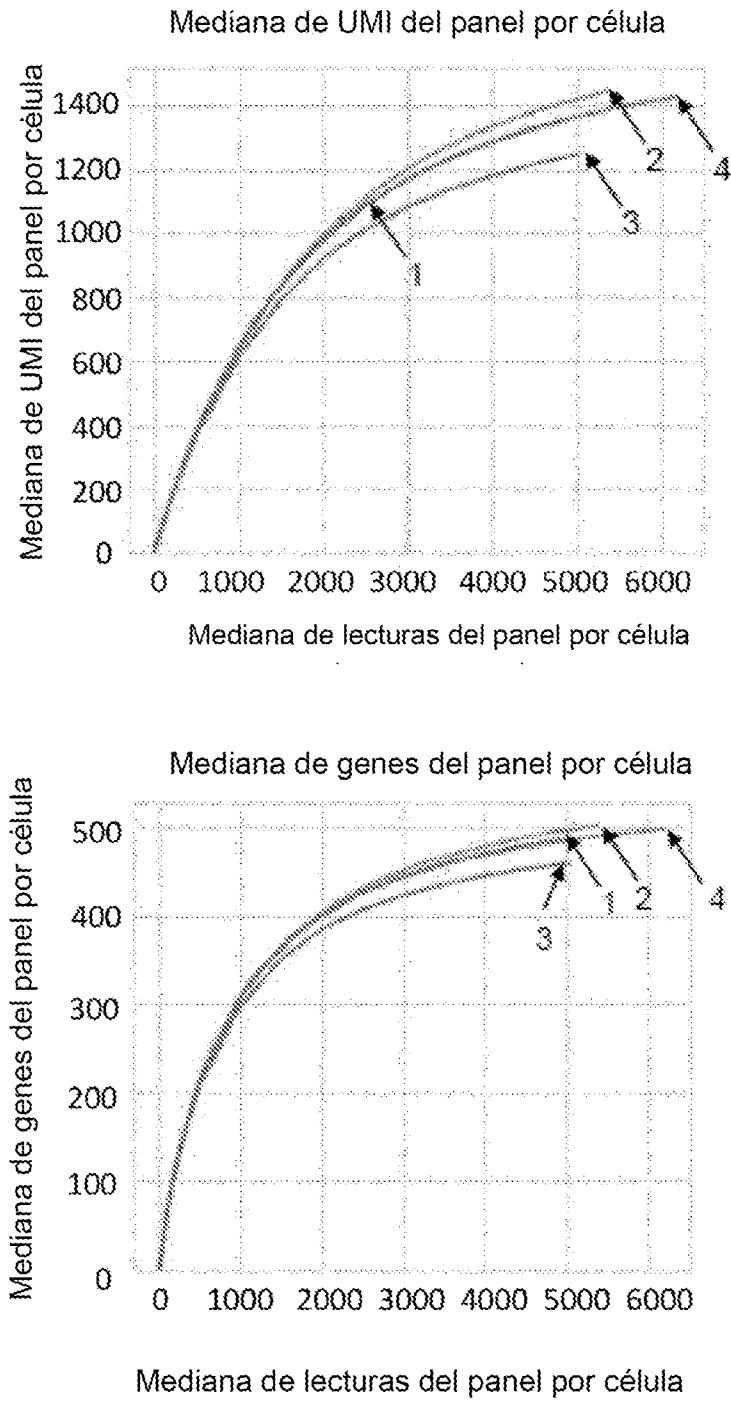


Figura 25