

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 269**

51 Int. Cl.:

G06T 7/33 (2007.01)

C12Q 1/6841 (2008.01)

C12Q 1/6837 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2021 PCT/US2021/050929**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2022 WO22061150**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2021 E 21791150 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024 EP 4214678**

54 Título: **Aparato de manipulación de muestras y métodos de registro de imágenes**

30 Prioridad:

18.09.2020 US 202063080547 P
01.03.2021 US 202163155173 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TENTORI, AUGUSTO MANUEL;
KIM, HANYOUP;
XING, SIYUAN;
BAVA, FELICE ALESSIO;
BHARADWAJ, RAJIV;
UYTINGCO, CEDRIC y
GRAZIOSA, ERICA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 993 269 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

Aparato de manipulación de muestras y métodos de registro de imágenes

5 Antecedentes

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

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

20 Los analitos de una muestra biológica pueden capturarse en una matriz de reactivos mientras se preserva el contexto espacial de los analitos. Los analitos capturados pueden usarse para generar datos de secuencia que pueden mapearse a una imagen de muestra biológica. En el campo de la transcriptómica se usan varios métodos para la alineación de imágenes, que incluyen, por ejemplo, el enfoque de Kim Wong y otros: "ST Spot Detector: a web-based application for automatic spot and tissue detection for spatial Transcriptomics image datasets." (DOI:10.1093/bioinformatics/bty030). Existe la necesidad de métodos y sistemas mejorados para registrar los datos de imagen con los datos de secuencia.

30 Los datos de imagen pueden utilizarse para evaluar la heterogeneidad espacial de los niveles de analito para células y tejidos. Para determinar con precisión el grado de heterogeneidad espacial y actividad transcriptómica dentro de una célula o tejido, los datos de imagen asociados con una muestra de una célula o un tejido pueden alinearse con los datos de imagen asociados con una matriz de reactivos configurado para capturar analitos de la muestra de célula o tejido. La alineación puede determinarse mediante el uso del registro de imagen para proporcionar un mapeo espacial preciso de la actividad transcriptómica dentro de una muestra. En la presente descripción se describen varios métodos para realizar el registro de imágenes en muestras biológicas.

35 Resumen

40 Los análisis dentro de una muestra biológica se liberan generalmente mediante la disrupción (por ejemplo, permeabilización) de la muestra biológica. Se conocen varios métodos de disrupción de una muestra biológica, que incluyen la permeabilización de la membrana celular de la muestra biológica. En la presente descripción se describen métodos para suministrar un fluido a la muestra biológica, sistemas para el análisis de muestras y métodos de alineación de muestras.

45 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. En términos generales, se proporciona, en un aspecto, un método para alinear una muestra a una matriz. El método incluye recibir, por un procesador de datos, datos de imagen de muestra que comprenden una imagen de muestra de la muestra. La imagen de muestra puede tener una primera resolución. El método incluye además recibir, por el procesador de datos, datos de imagen de la matriz que incluyen una imagen de la matriz que incluye una superposición de una matriz con la muestra y un fiducial de la matriz. La imagen de la matriz puede tener una segunda resolución menor que la primera resolución de la imagen de muestra. El método también incluye registrar, por el procesador de datos, la imagen de muestra con la imagen de la matriz alineando la imagen de muestra y la imagen de la matriz. El método incluye además generar, por el procesador de datos, una imagen alineada en base al registro. La imagen alineada puede incluir una superposición de la imagen de muestra con la matriz. El método también incluye proporcionar, por el procesador de datos, la imagen alineada.

55 Los datos de imagen de muestra pueden recibirse de un usuario o de un dispositivo informático remoto del procesador de datos. La imagen alineada puede incluir el fiducial de la matriz alineada con la muestra. La imagen de muestra puede incluir un fiducial de la muestra y el registro puede incluir además alinear el fiducial de la matriz con el fiducial de la muestra. La imagen de muestra puede ser de la muestra en un primer sustrato que incluye un borde, y el fiducial de la muestra puede incluir el borde. El fiducial de la muestra puede incluir un sello o una etiqueta adhesiva aplicada por un usuario al primer sustrato en el que se coloca la muestra. El fiducial de la muestra puede delinear un área de muestra en la que la muestra se coloca sobre el sustrato de muestra. El fiducial de la muestra puede configurarse en base a uno o más tamaños de muestra. La muestra puede localizarse en el primer sustrato y la matriz puede localizarse en un segundo sustrato. El fiducial de la muestra puede localizarse en un primer lado del primer sustrato. El primer lado del primer sustrato puede ser opuesto a un segundo lado del primer sustrato en el que se localiza la muestra. La imagen de la matriz puede adquirirse a una profundidad de campo adecuada para adquirir la muestra y el fiducial de la muestra en el mismo plano focal.

El fiducial de la matriz puede localizarse en un primer lado del segundo sustrato. El primer lado del segundo sustrato puede ser opuesto a un segundo lado del segundo sustrato en el que puede localizarse la matriz. El fiducial de la muestra puede localizarse en el primer sustrato adyacente a, dentro de, o distante de la muestra. El fiducial de la matriz puede localizarse en el segundo sustrato adyacente a, dentro de, o distante de un reactivo configurado en el segundo sustrato. El primer sustrato puede incluir uno o más fiduciales de la muestra y/o el segundo sustrato puede incluir uno o más fiduciales de la matriz. La imagen de la matriz puede adquirirse de manera que una porción de la matriz se superponga sobre una porción de la muestra en base a una localización del fiducial de la matriz y/o el fiducial de la muestra.

En otro aspecto, un método para alinear una muestra incluye recibir, por un procesador de datos, datos de imagen de muestra que comprenden una imagen de muestra de la muestra y un fiducial de la muestra. La imagen de muestra puede tener una primera resolución. El método también puede incluir recibir, por el procesador de datos, datos fiduciales del instrumento que incluyen una imagen fiducial del instrumento de un primer fiducial del instrumento y un segundo fiducial del instrumento. El método puede incluir además recibir, por el procesador de datos, datos de imagen de la matriz que incluyen una imagen de la matriz que tiene una segunda resolución menor que la primera resolución de la imagen de muestra. La imagen de la matriz puede incluir la matriz y un fiducial de la matriz superpuesto sobre la muestra y el fiducial de la muestra. El método también puede incluir registrar, por el procesador de datos, la imagen fiducial del instrumento con la imagen de la matriz alineando el primer fiducial del instrumento y el fiducial de la matriz. El método puede incluir además registrar, por el procesador de datos, la imagen fiducial del instrumento con la imagen de muestra alineando el segundo fiducial del instrumento con la imagen de muestra. El método también puede incluir, generar, por el procesador de datos, una imagen alineada en base al registro de la imagen fiducial del instrumento a la imagen de muestra y en base al registro de la imagen fiducial del instrumento a la imagen de la matriz. La imagen alineada puede incluir la muestra alineada con la matriz. El método puede incluir además, proporcionar, por el procesador de datos, la imagen alineada.

La imagen de muestra puede incluir una pluralidad de imágenes de la porción de muestra. Cada imagen de la porción de muestra puede asociarse con una porción de la muestra. Un tamaño de cada imagen de la porción de muestra puede ser menor que un tamaño de un campo de visión único de la imagen de muestra. Registrar la imagen de muestra en la imagen de la matriz puede incluir además recortar, por el procesador de datos, la imagen de muestra para determinar la pluralidad de imágenes de la porción de muestra. Registrar la imagen de muestra en la imagen de la matriz también puede incluir registrar una o más de las imágenes de la porción de muestra en la imagen de muestra en una porción correspondiente de la muestra en la imagen de la matriz. Registrar la una o más imágenes de la porción de muestra en la imagen de muestra a la porción correspondiente de la muestra en la imagen de la matriz puede realizarse después de registrar la imagen de muestra en la imagen de la matriz.

Los métodos pueden incluir además alinear, por el procesador de datos, la muestra y la matriz dentro de un portamuestras configurado para recibir el primer sustrato que incluye la muestra y el segundo sustrato que incluye la matriz. La imagen de la matriz puede incluir una pluralidad de imágenes de la porción de matriz. Cada imagen de la porción de matriz puede asociarse con una porción de la matriz. El tamaño de cada imagen de la porción de matriz puede ser menor que el tamaño de un campo de visión único de la imagen de la matriz. El registro también puede incluir determinar, por el procesador de datos, la pluralidad de imágenes de la porción de matriz en la imagen de la matriz y registrar, por el procesador de datos, una o más imágenes de la porción de matriz en la imagen de la matriz a una porción correspondiente de la muestra en la imagen de muestra. La imagen de muestra puede incluir una superposición de la matriz con la muestra y el fiducial de la matriz. La muestra y la matriz pueden estar en un solo sustrato.

En otro aspecto, se proporciona un método para procesar datos de imagen de muestra. El método incluye recibir, por un procesador de datos, un primer conjunto de datos de imágenes de muestra que incluye una primera pluralidad de imágenes de la porción de muestra correspondientes a porciones de una muestra. Cada imagen de la porción de muestra puede tener una primera resolución. El método puede incluir además recibir, por el procesador de datos, un segundo conjunto de datos de imágenes de muestra que incluye una imagen de muestra de la muestra. La imagen de muestra que tiene una segunda resolución menor que la primera resolución de cada una de las imágenes de la porción de muestra. El método también puede incluir registrar, por el procesador de datos, una o más imágenes de la porción de muestra en una porción correspondiente de la muestra en la imagen de muestra.

La imagen de muestra puede incluir una pluralidad de imágenes de la porción de muestra. Cada imagen de la porción de muestra puede asociarse con una porción de la muestra. El método para procesar los datos de imagen de muestra puede incluir además recibir, por el procesador de datos, un conjunto de datos de imágenes de la matriz que incluye una imagen de la matriz que incluye un campo de visión único de una matriz y un fiducial de la matriz. El método para procesar los datos de imagen de muestra puede incluir además determinar, por el procesador de datos, el fiducial de la matriz y la muestra están dentro del campo de visión único de la imagen de la matriz. El método para procesar los datos de imagen de muestra puede incluir además determinar, por el procesador de datos, una o más localizaciones de reactivos de la matriz mediante el uso de la imagen de la matriz. La imagen alineada generada puede incluir la una o más localizaciones de reactivos.

El método para procesar datos de imagen de muestra también puede realizarse de manera que la imagen de muestra incluya una pluralidad de imágenes de la porción de muestra. Cada imagen de la porción de muestra puede asociarse con una porción de la muestra. La imagen de la matriz puede incluir una pluralidad de imágenes de la porción de matriz. Cada imagen de la porción de matriz puede asociarse con una porción de la matriz y puede incluir un único campo de visión. El método para procesar los datos de imagen de muestra puede incluir además determinar, por el procesador de datos, la pluralidad de imágenes de la porción de muestra en la imagen de muestra. El método para procesar los datos de imagen de muestra también puede incluir registrar, por el procesador de datos, una o más imágenes de la porción de muestra en la imagen de muestra a una porción correspondiente de la muestra en la imagen de la matriz. El método para procesar los datos de imagen de muestra puede incluir además determinar, por el procesador de datos, la pluralidad de imágenes de la porción de matriz en la imagen de la matriz. El método para procesar los datos de imagen de muestra también puede incluir registrar, por el procesador de datos, una o más imágenes de la porción de matriz en la imagen de la matriz a una porción correspondiente de la muestra en la imagen de muestra.

En otro aspecto, se proporciona un sistema para alinear una muestra a una matriz. El sistema puede incluir un portamuestras que incluye un primer mecanismo de retención configurado para retener un primer sustrato dentro del primer mecanismo de retención. El primer sustrato puede incluir una muestra. El portamuestras también puede incluir un segundo mecanismo de retención configurado para retener un segundo sustrato recibido dentro del segundo mecanismo de retención. El segundo sustrato puede incluir una matriz. El portamuestras puede configurarse para ajustar una localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato para hacer además que toda o una porción de la muestra se alinee con la matriz. El sistema puede incluir además un microscopio acoplado operativamente al portamuestras. El microscopio puede configurarse para ver el primer sustrato y el segundo sustrato dentro del portamuestras; y puede adquirir datos de imagen asociados con la muestra y/o la matriz. El sistema también puede incluir un primer dispositivo informático que se acopla comunicativamente al microscopio y al portamuestras. El dispositivo informático puede incluir una pantalla, un procesador de datos y un medio de almacenamiento legible por ordenador no transitorio que almacena instrucciones legibles y ejecutables por ordenador, que cuando se ejecutan puede hacer que el procesador de datos realice operaciones que incluyen recibir datos de imagen de muestra que comprenden una imagen de muestra de la muestra. La imagen de muestra puede tener una primera resolución. Las operaciones también pueden incluir recibir datos de imagen de la matriz que incluyen una imagen de la matriz que tiene una segunda resolución menor que la primera resolución de la imagen de muestra. La imagen de la matriz puede incluir la matriz y un fiducial de la matriz superpuesto sobre la muestra. Las operaciones pueden incluir además registrar la imagen de muestra con la imagen de la matriz alineando la imagen de muestra y la imagen de la matriz. Las operaciones también pueden incluir generar una imagen alineada en base al registro. La imagen alineada puede incluir la muestra alineada con la matriz y proporcionar la imagen alineada.

Los datos de imagen de muestra pueden recibirse de un usuario o de un dispositivo informático remoto del procesador de datos. La imagen alineada puede incluir además el fiducial de la matriz alineada con la muestra. La imagen de muestra puede incluir además un fiducial de la muestra y el registro puede incluir además alinear el fiducial de la matriz con el fiducial de la muestra. La imagen de muestra puede ser de la muestra en el primer sustrato que incluye un borde, y el fiducial de la muestra puede incluir el borde. El fiducial de la muestra puede incluir un sello o una etiqueta adhesiva aplicada por un usuario al primer sustrato en el que puede colocarse la muestra. El fiducial de la muestra puede delinear un área de muestra en la que la muestra puede colocarse sobre el primer sustrato. El fiducial de la muestra puede configurarse en base a uno o más tamaños de muestra. La muestra puede localizarse en el primer sustrato y la matriz puede localizarse en el segundo sustrato.

El fiducial de la muestra puede localizarse en un primer lado del primer sustrato. El primer lado del primer sustrato puede ser opuesto a un segundo lado del primer sustrato en el que puede localizarse la muestra. La imagen de la matriz puede adquirirse a una profundidad de campo adecuada para adquirir la muestra y el fiducial de la muestra en el mismo plano focal. El fiducial de la matriz puede localizarse en un primer lado de un segundo sustrato. El primer lado del segundo sustrato puede ser opuesto a un segundo lado del segundo sustrato en el que puede localizarse la matriz. El fiducial de la muestra puede localizarse en el primer sustrato adyacente a, dentro de, o distante de la muestra. El fiducial de la matriz puede localizarse en el segundo sustrato adyacente a, dentro de, o distante de un reactivo configurado en el segundo sustrato. El primer sustrato puede incluir uno o más fiduciales de la muestra y/o el segundo sustrato puede incluir uno o más fiduciales de la matriz. La imagen de la matriz puede adquirirse de manera que una porción de la matriz se superponga sobre una porción de la muestra en base a una localización del fiducial de la matriz y/o el fiducial de la muestra.

En otro aspecto, se proporciona un sistema para alinear una muestra a una matriz. El sistema puede incluir un portamuestras que incluye un primer mecanismo de retención configurado para retener un primer sustrato dentro del primer mecanismo de retención. El primer sustrato puede incluir una muestra. El portamuestras también puede incluir un segundo mecanismo de retención configurado para retener un segundo sustrato recibido dentro del segundo mecanismo de retención. El segundo sustrato puede incluir una matriz. El portamuestras puede configurarse para ajustar una localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato para hacer además que toda o una porción de la muestra se alinee con la matriz. El sistema puede incluir además un microscopio acoplado operativamente al portamuestras. El microscopio puede configurarse para ver el primer sustrato y el segundo sustrato dentro del portamuestras; y puede adquirir datos de imagen asociados con la muestra y/o la matriz. El sistema también puede

5 incluir un primer dispositivo informático que se acopla comunicativamente al microscopio y al portamuestras. El dispositivo informático puede incluir una pantalla, un procesador de datos y un medio de almacenamiento legible por ordenador no transitorio que almacena instrucciones legibles y ejecutables por ordenador, que cuando se ejecutan puede hacer que el procesador de datos realice operaciones que incluyen recibir datos de imagen de muestra que incluyen una imagen de muestra de la muestra y un fiducial de la muestra, la imagen de muestra que tiene una primera resolución. Las operaciones también pueden incluir recibir datos fiduciales del instrumento que incluyen una imagen fiducial del instrumento de un primer fiducial del instrumento y un segundo fiducial del instrumento. Las operaciones pueden incluir además recibir datos de imagen de la matriz que incluyen una imagen de la matriz que tiene una segunda resolución menor que la primera resolución de la imagen de muestra. La imagen de la matriz puede incluir la matriz y un fiducial de la matriz superpuesto sobre la muestra y el fiducial de la muestra. Las operaciones también pueden incluir registrar la imagen fiducial del instrumento con la imagen de la matriz alineando el primer fiducial del instrumento y el fiducial de la matriz. Las operaciones pueden incluir además registrar la imagen fiducial del instrumento con la imagen de muestra alineando el segundo fiducial del instrumento y el fiducial de la muestra. Las operaciones también pueden incluir generar una imagen alineada en base al registro de la imagen fiducial del instrumento a la imagen de la matriz de muestras y en base al registro de la imagen fiducial del instrumento a la imagen de la matriz. La imagen alineada puede incluir la muestra alineada con la matriz. Las operaciones pueden incluir además proporcionar la imagen alineada.

20 En otro aspecto, un sistema para alinear una muestra a una matriz incluye un portamuestras que incluye un primer mecanismo de retención configurado para retener un primer sustrato dentro del primer mecanismo de retención. El primer sustrato puede incluir una muestra. El portamuestras también puede incluir un segundo mecanismo de retención configurado para retener un segundo sustrato recibido dentro del segundo mecanismo de retención. El segundo sustrato puede incluir una matriz. El portamuestras puede configurarse para ajustar una localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato para hacer además que toda o una porción de la muestra se alinee con la matriz. El sistema puede incluir además un microscopio acoplado operativamente al portamuestras. El microscopio puede configurarse para ver el primer sustrato y el segundo sustrato dentro del portamuestras; y puede adquirir datos de imagen asociados con la muestra y/o la matriz. El sistema también puede incluir un primer dispositivo informático que se acopla comunicativamente al microscopio y al portamuestras. El dispositivo informático puede incluir una pantalla, un procesador de datos y un medio de almacenamiento legible por ordenador no transitorio que almacena instrucciones legibles y ejecutables por ordenador, que cuando se ejecutan puede hacer que el procesador de datos realice operaciones que incluyen recibir datos de imagen de muestra que incluyen una imagen de muestra de la muestra y un fiducial de la muestra. La imagen de muestra puede tener una primera resolución. Las operaciones también pueden incluir recibir datos fiduciales del instrumento que incluyen una imagen fiducial del instrumento de un primer fiducial del instrumento y un segundo fiducial del instrumento. Las operaciones pueden incluir además recibir datos de imagen de la matriz que incluyen una imagen de la matriz que tiene una segunda resolución menor que la primera resolución de la imagen de muestra. La imagen de la matriz que comprende la matriz y un fiducial de la matriz superpuesto sobre la muestra y el fiducial de la muestra. Las operaciones también pueden incluir registrar la imagen fiducial del instrumento con la imagen de la matriz alineando el primer fiducial del instrumento y el fiducial de la matriz. Las operaciones pueden incluir además registrar la imagen fiducial del instrumento con la imagen de muestra alineando el segundo fiducial del instrumento y el fiducial de la muestra. Las operaciones también pueden incluir generar una imagen alineada en base al registro de la imagen fiducial del instrumento a la imagen de la matriz de muestras y en base al registro de la imagen fiducial del instrumento a la imagen de la matriz. La imagen alineada puede incluir la muestra alineada con la matriz. Las operaciones pueden incluir además proporcionar la imagen alineada.

45 En otro aspecto, se proporciona un medio legible por ordenador no transitorio que almacena instrucciones. Las instrucciones, cuando se ejecutan por al menos un procesador de datos hacen que el al menos un procesador de datos realice operaciones que incluyen recibir datos de imagen de muestra que incluyen una imagen de muestra de una muestra. Los datos de imagen de muestra pueden recibirse desde un microscopio acoplado operativamente al menos a un procesador de datos y a un portamuestras. La imagen de muestra puede incluir una primera resolución. El microscopio puede configurarse para ver un primer sustrato que comprende la muestra dentro del portamuestras. Las operaciones pueden incluir además recibir, desde el microscopio, datos de imagen de la matriz que incluyen una imagen de la matriz que tiene una segunda resolución menor que la primera resolución de la imagen de muestra del microscopio. La imagen de la matriz puede incluir una matriz y un fiducial de la matriz superpuesto sobre la muestra. El microscopio puede configurarse para ver un segundo sustrato que comprende la matriz y el fiducial de la matriz superpuesto sobre la muestra. Las operaciones también pueden incluir registrar la imagen de muestra con la imagen de la matriz alineando la imagen de muestra y la imagen de la matriz. Las operaciones pueden incluir además generar una imagen alineada en base al registro, la imagen alineada que incluye la muestra alineada con la matriz y proporcionar la imagen alineada.

60 En un aspecto, se proporciona un método para detectar fiduciales asociados a una matriz. El método incluye recibir, por un procesador de datos, los primeros datos de imagen de la matriz que incluyen una primera imagen de la matriz que comprende una matriz y un fiducial de la matriz. El método incluye además recibir, por el procesador de datos, los datos de la segunda imagen de la matriz que comprenden una segunda imagen de la matriz que incluye una superposición de la matriz con una muestra, y el fiducial de la matriz. La muestra puede oscurecer el fiducial de la matriz en la superposición. El método también puede incluir determinar, por el procesador de datos, la localización del

fiducial de la matriz en la primera imagen de la matriz en base a un primer sistema de coordenadas. El método puede incluir además determinar, por el procesador de datos, una localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz en base al primer sistema de coordenadas. El método también puede incluir comparar, por el procesador de datos, la localización del fiducial de la matriz en la primera imagen de la matriz y la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz. El método puede incluir además proporcionar, por el procesador de datos, la localización del fiducial de la matriz con relación a la localización de la muestra en base a la comparación.

En algunas variaciones, una o más características descritas en la presente descripción que incluyen las siguientes características pueden incluirse opcionalmente en el método en cualquier combinación factible. Por ejemplo, la primera imagen de la matriz puede tomarse cuando la muestra no está en contacto con la matriz y la segunda imagen de la matriz puede tomarse cuando la muestra está en contacto con la matriz. La primera imagen de la matriz y la segunda imagen de la matriz pueden tomarse cuando la muestra está en contacto con la matriz. La primera imagen de la matriz puede adquirirse a una primera profundidad focal para excluir la muestra de la primera imagen de la matriz, y la segunda imagen de la matriz puede adquirirse a una segunda profundidad focal para incluir la muestra superpuesta con la matriz. La primera imagen de la matriz puede adquirirse en una primera iluminación que hace que un contraste de la muestra sea menor que un contraste del fiducial de la matriz, y la segunda imagen de la matriz puede adquirirse en una segunda iluminación que hace que un contraste de la muestra sea mayor que un contraste del fiducial de la matriz. La primera iluminación puede incluir una longitud de onda entre 564 nm y 580 nm o una longitud de onda entre 700 nm y 1 mm. La segunda iluminación puede incluir una longitud de onda entre 534 nm y 545 nm.

La primera imagen de la matriz puede incluir además un primer fiducial del instrumento. El método incluye además recibir, por el procesador de datos, los datos de la segunda imagen de la matriz que incluyen además el primer fiducial del instrumento en la segunda imagen de la matriz. La muestra puede oscurecer el fiducial de la matriz y el primer fiducial del instrumento en la superposición. El método también puede incluir determinar, por el procesador de datos, la localización del fiducial de la matriz con relación al primer fiducial del instrumento en la primera imagen de la matriz en base al primer sistema de coordenadas. El método puede incluir además determinar, por el procesador de datos, la localización de la muestra con relación al primer fiducial del instrumento en la segunda imagen de la matriz en base a un segundo sistema de coordenadas. El método también puede incluir comparar, por el procesador de datos, la localización del fiducial de la matriz en la primera imagen de la matriz y la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz.

La primera imagen de la matriz puede incluir además un primer fiducial aplicado. El método que incluye además recibir, por el procesador de datos, los segundos datos de imagen de la matriz que comprenden además el primer fiducial aplicado en la segunda imagen de la matriz. La muestra puede oscurecer el fiducial de la matriz y el primer fiducial aplicado en la superposición. El método también puede incluir determinar, por el procesador de datos, la localización del fiducial de la matriz con relación al primer fiducial aplicado en la primera imagen de la matriz en base al primer sistema de coordenadas. El método puede incluir además determinar, por el procesador de datos, la localización de la muestra con relación al primer fiducial aplicado en la segunda imagen de la matriz en base al segundo sistema de coordenadas. El método también puede incluir comparar, por el procesador de datos, la localización del fiducial de la matriz en la primera imagen de la matriz y la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz.

El primer fiducial aplicado puede ser uno de un sello, una etiqueta adhesiva, un dibujo o un grabado láser localizado en un sustrato en el que se localizan la matriz y el fiducial de la matriz. El primer fiducial de la matriz puede formarse a partir de un material que incluye un colorante, un químico, un agente de contraste o una nanopartícula. El material que forma el primer fiducial de la matriz puede mejorar un contraste visible del primer fiducial de la matriz.

La segunda imagen de la matriz puede adquirirse después de que se haya producido un período de permeabilización de la muestra. El método puede incluir además recibir, por el procesador de datos, los datos de la segunda imagen de la matriz. El período de permeabilización hace que el fiducial de la matriz sea visible en la superposición.

La primera imagen de la matriz puede adquirirse de un sustrato que comprende la matriz, el fiducial de la matriz, y al menos un separador. El método puede incluir además recibir, por el procesador de datos, los segundos datos de imagen de la matriz que incluyen además al menos un separador en la superposición en la segunda imagen de la matriz. Una localización de la muestra puede asociarse con el segundo sistema de coordenadas. El método también puede incluir registrar, por el procesador de datos, la primera imagen de la matriz con la segunda imagen de la matriz alineando la localización del fiducial de la matriz y la localización de la muestra en un sistema de coordenadas común que incluye el primer sistema de coordenadas y el segundo sistema de coordenadas. El sistema de coordenadas común puede incluir además la localización del fiducial de la matriz y la localización de la muestra. El método puede incluir además determinar, por el procesador de datos, la localización del fiducial de la matriz en la primera imagen de la matriz en base al sistema de coordenadas común. El método también puede incluir determinar, por el procesador de datos, la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz en base al sistema de coordenadas común. El método puede incluir además comparar, por el procesador de datos, la localización del fiducial de la matriz en la primera imagen de la matriz y la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz mediante el uso del sistema de coordenadas común.

La segunda imagen de la matriz puede adquirirse en la primera iluminación y puede incluir la muestra superpuesta sobre el sustrato que comprende la matriz, el fiducial de la matriz y al menos un separador visible en la segunda imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación. El método puede incluir además recibir, por el procesador de datos, datos de la segunda imagen de la matriz que comprenden una segunda imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación. La segunda imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación puede incluir la muestra superpuesta sobre el sustrato que comprende la matriz, el fiducial de la matriz, y el al menos un separador. El al menos un separador puede ser visible en la segunda imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación. El método también puede incluir determinar, por el procesador de datos, la localización del fiducial de la matriz en la segunda imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación en base a un primer sistema de coordenadas. El método puede incluir además determinar, por el procesador de datos, la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación en base a un segundo sistema de coordenadas. El método también puede incluir registrar, por el procesador de datos, la segunda imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación a la segunda imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación alineando la localización del fiducial de la matriz y la localización de la muestra en un sistema de coordenadas común que incluye el primer sistema de coordenadas y el segundo sistema de coordenadas. El sistema de coordenadas común puede incluir además la localización del fiducial de la matriz y la localización de la muestra. El método puede incluir además determinar, por el procesador de datos, la localización del fiducial de la matriz en la segunda imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación en base al sistema de coordenadas común. El método también puede incluir determinar, por el procesador de datos, la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación en base al sistema de coordenadas común. El método puede incluir además comparar, por el procesador de datos, la localización del fiducial de la matriz en la segunda imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación y la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación mediante el uso del sistema de coordenadas común.

En otro aspecto, se proporciona un sistema para detectar fiduciales asociados a una matriz. El sistema puede incluir un portamuestras. El portamuestras puede incluir un primer mecanismo de retención configurado para retener un primer sustrato recibido dentro del primer mecanismo de retención. El primer sustrato puede incluir una muestra. El portamuestras también puede incluir un segundo mecanismo de retención configurado para retener un segundo sustrato recibido dentro del segundo mecanismo de retención. El segundo sustrato puede incluir una matriz y un fiducial de la matriz. El portamuestras puede configurarse para ajustar una localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato para hacer además que toda o una porción de la muestra se alinee con la matriz. El sistema también puede incluir un microscopio acoplado operativamente al portamuestras. El microscopio puede configurarse para ver el primer sustrato y el segundo sustrato dentro del portamuestras y para adquirir datos de imagen asociados con la muestra y/o la matriz. El sistema puede incluir además un primer dispositivo informático acoplado comunicativamente al microscopio y al portamuestras. El dispositivo informático puede incluir una pantalla, un procesador de datos y un medio de almacenamiento legible por ordenador no transitorio que almacena instrucciones legibles y ejecutables por ordenador. Las instrucciones ejecutables cuando se ejecutan pueden hacer que el procesador de datos realice operaciones que incluyen recibir datos de la primera imagen de la matriz que incluyen una primera imagen de la matriz del segundo sustrato. La primera imagen de la matriz puede incluir la matriz y el fiducial de la matriz. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen recibir datos de la segunda imagen de la matriz que incluyen una segunda imagen de la matriz que incluye una superposición de la muestra del primer sustrato y la matriz del segundo sustrato, y el fiducial de la matriz del segundo sustrato. La muestra puede oscurecer el fiducial de la matriz en la superposición. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen determinar la localización del fiducial de la matriz en la primera imagen de la matriz en base a un primer sistema de coordenadas. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen determinar la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz en base al primer sistema de coordenadas. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen comparar la localización del fiducial de la matriz en la primera imagen de la matriz y la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen proporcionar la localización del fiducial de la matriz con relación a la localización de la muestra en base a la comparación.

En algunas variaciones, una o más características descritas en la presente descripción que incluyen las siguientes características pueden incluirse opcionalmente en el sistema en cualquier combinación factible. Por ejemplo, la primera imagen de la matriz puede tomarse cuando la muestra no está en contacto con la matriz y la segunda imagen de la matriz puede tomarse cuando la muestra está en contacto con la matriz. La primera imagen de la matriz y la segunda imagen de la matriz pueden tomarse cuando la muestra está en contacto con la matriz. La primera imagen de la matriz puede adquirirse a una primera profundidad focal para excluir la muestra de la primera imagen de la matriz, y la segunda imagen de la matriz puede adquirirse a una segunda profundidad focal para incluir la muestra superpuesta con la matriz. La primera imagen de la matriz puede adquirirse en una primera iluminación que hace que un contraste de la muestra sea menor que un contraste del fiducial de la matriz, y la segunda imagen de la matriz puede adquirirse en una segunda iluminación que hace que un contraste de la muestra sea mayor que un contraste del fiducial de la matriz. La primera iluminación puede incluir una longitud de onda entre 564 nm y 580 nm o una longitud de onda entre 700 nm y 1 mm. La segunda iluminación puede incluir una longitud de onda entre 534 nm y 545 nm.

La primera imagen de la matriz puede incluir además un primer fiducial del instrumento. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen recibir los datos de la segunda imagen de la matriz que incluyen además el primer fiducial del instrumento en la segunda imagen de la matriz. La muestra puede oscurecer el fiducial de la matriz y el primer fiducial del instrumento en la superposición. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen determinar la localización del fiducial de la matriz con relación al primer fiducial del instrumento en la primera imagen de la matriz en base al primer sistema de coordenadas. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen determinar la localización de la muestra con relación al primer fiducial del instrumento en la segunda imagen de la matriz en base a un segundo sistema de coordenadas. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen comparar la localización del fiducial de la matriz en la primera imagen de la matriz y la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz.

La primera imagen de la matriz puede incluir además un primer fiducial aplicado. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen recibir los datos de la segunda imagen de la matriz que comprenden además el primer fiducial aplicado en la segunda imagen de la matriz. La muestra puede oscurecer el fiducial de la matriz y el primer fiducial aplicado en la superposición. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen determinar la localización del fiducial de la matriz con relación al primer fiducial aplicado en la primera imagen de la matriz en base al primer sistema de coordenadas. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen determinar la localización de la muestra con relación al primer fiducial aplicado en la segunda imagen de la matriz en base al segundo sistema de coordenadas. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen comparar la localización del fiducial de la matriz en la primera imagen de la matriz y la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz.

El primer fiducial aplicado puede ser uno de un sello, una etiqueta adhesiva, un dibujo o un grabado láser localizado en un sustrato en el que se localizan la matriz y el fiducial de la matriz. El primer fiducial de la matriz puede formarse a partir de un material que incluye un colorante, un químico, un agente de contraste o una nanopartícula. El material que forma el primer fiducial de la matriz puede mejorar un contraste visible del primer fiducial de la matriz.

La segunda imagen de la matriz puede adquirirse después de que se haya producido un período de permeabilización de la muestra. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen recibir los datos de la segunda imagen de la matriz. El período de permeabilización hace que el fiducial de la matriz sea visible en la superposición.

La primera imagen de la matriz puede adquirirse de un sustrato que comprende la matriz, el fiducial de la matriz, y al menos un separador. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen recibir los datos de la segunda matriz de imágenes que incluyen además al menos un separador en la superposición en la segunda imagen de la matriz. Una localización de la muestra puede asociarse con el segundo sistema de coordenadas. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen registrar la primera imagen de la matriz con la segunda imagen de la matriz alineando la localización del fiducial de la matriz y la localización de la muestra en un sistema de coordenadas común que incluye el primer sistema de coordenadas y el segundo sistema de coordenadas. El sistema de coordenadas común puede incluir además la localización del fiducial de la matriz y la localización de la muestra. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen determinar la localización del fiducial de la matriz en la primera imagen de la matriz en base al sistema de coordenadas común. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen determinar la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz en base al sistema de coordenadas común. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen comparar la localización del fiducial de la matriz en la primera imagen de la matriz y la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz mediante el uso del sistema de coordenadas común.

La segunda imagen de la matriz puede adquirirse en la primera iluminación e incluye la muestra superpuesta sobre el sustrato que incluye la matriz, el fiducial de la matriz, y al menos un separador localizado en el segundo sustrato y visible en la segunda imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen recibir datos de la segunda imagen de la matriz que comprenden una segunda imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación. La segunda imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación puede incluir una superposición de la matriz con la muestra, el fiducial de la matriz y el al menos un separador. El al menos un separador puede ser visible en la segunda imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen determinar la localización del fiducial de la matriz en la segunda imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación en base a un primer sistema de coordenadas. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen determinar la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación en base a un segundo sistema de coordenadas. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen registrar la segunda imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación a la segunda imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación alineando la localización del fiducial de la matriz y la localización de la muestra en un sistema de coordenadas común.

que incluye el primer sistema de coordenadas y el segundo sistema de coordenadas. El sistema de coordenadas común puede incluir además la localización del fiducial de la matriz y la localización de la muestra. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen determinar la localización del fiducial de la matriz en la segunda imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación en base al sistema de coordenadas común. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen determinar la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación en base al sistema de coordenadas común. Las instrucciones pueden hacer además que el procesador de datos realice operaciones que incluyen comparar la localización del fiducial de la matriz en la segunda imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación y la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación mediante el uso del sistema de coordenadas común.

En otro aspecto, se proporciona un medio legible por ordenador no transitorio que almacena instrucciones. Las instrucciones, cuando se ejecutan por al menos un procesador de datos pueden hacer que el al menos un procesador de datos realice las operaciones. Las operaciones pueden incluir recibir datos de la primera imagen de la matriz que incluyen una primera imagen de la matriz que incluye una matriz y un fiducial de la matriz. Las operaciones también pueden incluir recibir datos de la segunda imagen de la matriz que incluyen una segunda imagen de la matriz que incluye una superposición de una muestra en un primer sustrato y la matriz en un segundo sustrato. Los datos de la segunda imagen de la matriz también pueden incluir el fiducial de la matriz en la superposición. La muestra puede oscurecer el fiducial de la matriz en la superposición. Las operaciones pueden incluir además determinar una localización del fiducial de la matriz en la primera imagen de la matriz en base a un primer sistema de coordenadas. Las operaciones también pueden incluir determinar una localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz en base al primer sistema de coordenadas. Las operaciones también pueden incluir comparar la localización del fiducial de la matriz en la primera imagen de la matriz y la localización de la muestra en la segunda imagen de la matriz. Las operaciones pueden incluir además proporcionar la localización del fiducial de la matriz con relación a la localización de la muestra en base a la comparación.

En otro aspecto, se proporciona un sistema para alinear una muestra a una matriz. El sistema puede incluir un portamuestras que incluye un primer mecanismo de retención configurado para retener un primer sustrato dentro del primer mecanismo de retención. El primer sustrato puede incluir una muestra. El portamuestras también puede incluir un segundo mecanismo de retención configurado para retener un segundo sustrato recibido dentro del segundo mecanismo de retención. El segundo sustrato puede incluir una matriz. El portamuestras puede configurarse para ajustar una localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato para hacer además que toda o una porción de la muestra se alinee con la matriz. El sistema puede incluir además un dispositivo de captura de imágenes acoplado operativamente al portamuestras. El dispositivo de captura de imágenes puede configurarse para ver el primer sustrato y el segundo sustrato dentro del portamuestras; y puede adquirir datos de imagen asociados con la muestra y/o la matriz. El sistema también puede incluir un primer dispositivo informático acoplado comunicativamente al dispositivo de captura de imágenes y al portamuestras. El dispositivo informático puede incluir una pantalla, un procesador de datos y un medio de almacenamiento legible por ordenador no transitorio que almacena instrucciones legibles y ejecutables por ordenador, que cuando se ejecutan puede hacer que el procesador de datos realice operaciones que incluyen recibir datos de imagen de muestra que incluyen una imagen de muestra de la muestra y un fiducial de la muestra, la imagen de muestra que tiene una primera resolución. Las operaciones también pueden incluir recibir datos fiduciales del instrumento que incluyen una imagen fiducial del instrumento de un primer fiducial del instrumento y un segundo fiducial del instrumento. Las operaciones pueden incluir además recibir datos de imagen de la matriz que incluyen una imagen de la matriz que tiene una segunda resolución menor que la primera resolución de la imagen de muestra. La imagen de la matriz puede incluir la matriz y un fiducial de la matriz superpuesto sobre la muestra y el fiducial de la muestra. Las operaciones también pueden incluir registrar la imagen fiducial del instrumento con la imagen de la matriz alineando el primer fiducial del instrumento y el fiducial de la matriz. Las operaciones pueden incluir además registrar la imagen fiducial del instrumento con la imagen de muestra alineando el segundo fiducial del instrumento y el fiducial de la muestra. Las operaciones también pueden incluir generar una imagen alineada en base al registro de la imagen fiducial del instrumento a la imagen de la matriz de muestras y en base al registro de la imagen fiducial del instrumento a la imagen de la matriz. La imagen alineada puede incluir la muestra alineada con la matriz. Las operaciones pueden incluir además proporcionar la imagen alineada.

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

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

En la presente descripción se describen diversas modalidades de las características de esta descripción. Sin embargo, debe entenderse que tales modalidades se proporcionan simplemente a manera de ejemplo, y pueden producirse numerosas variaciones, cambios, y sustituciones para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de esta

descripción. También debe entenderse que varias alternativas a las modalidades específicas descritas en la presente descripción también están dentro del alcance de esta descripción.

Descripción de los dibujos

5 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 elementos similares.

10 La Figura 1 muestra un flujo de trabajo de análisis espacial de ejemplo de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

15 La Figura 2 representa un flujo de trabajo de ejemplo para preparar la muestra biológica en un portaobjetos de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

La Figura 3 es un diagrama esquemático que representa una interacción de solución de permeabilización de ejemplo entre un portaobjetos de tejido y un portaobjetos de expresión génica en una configuración de intercalado de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

20 La Figura 4 es un diagrama esquemático que muestra un aparato de manipulación de muestras de ejemplo de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

25 La Figura 5A representa un primer miembro de ejemplo y un segundo miembro de ejemplo de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

La Figura 5B representa un ejemplo del primer miembro acoplado al segundo miembro de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

30 La Figura 5C representa un ejemplo del primer miembro acoplado al segundo miembro que incluye un miembro de acoplamiento acoplado al primer sustrato y al segundo sustrato de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. La Figura 6 es un diagrama de un primer miembro de ejemplo y un segundo miembro de ejemplo de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

35 La Figura 7 representa un diagrama de una vista inferior en primer plano del primer miembro acoplado al segundo miembro y un área de solapamiento donde el primer sustrato se solapa con el segundo sustrato de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

40 La Figura 8 representa una vista en sección transversal frontal del aparato de manipulación de muestras de ejemplo de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

La Figura 9 es un diagrama de un mecanismo de ajuste de ejemplo de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

45 La Figura 10 es una vista en perspectiva de un aparato de manipulación de muestras de ejemplo que incluye un segundo miembro automatizado de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

La Figura 11A es una vista en perspectiva de un aparato de manipulación de muestras de ejemplo que incluye un calentador de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

50 La Figura 11B es una vista despiezada de un segundo miembro de ejemplo que incluye el calentador de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

55 La Figura 11C es un gráfico de un perfil de temperatura del sustrato deseado de ejemplo (por ejemplo, portaobjetos) a lo largo del tiempo de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

La Figura 12A es una vista en perspectiva de un primer miembro de ejemplo de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

60 La Figura 12B es una vista despiezada del primer miembro de ejemplo de la Figura 12A de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

La Figura 13A es una vista en sección transversal en perspectiva de un primer miembro de ejemplo de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

65 La Figura 13B es una vista en perspectiva de la placa de soporte de ejemplo de la Figura 13A de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

La Figura 13C es una vista en perspectiva del bloque disipador de calor de ejemplo de la Figura 13A de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

5 La Figura 14A es una vista en perspectiva de un aparato de manipulación de muestras de ejemplo en una posición cerrada de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

La Figura 14B es una vista en perspectiva del aparato de manipulación de muestras de ejemplo en una posición abierta de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

10 La Figura 15 es una vista en perspectiva del aparato de manipulación de muestras de ejemplo de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

15 La Figura 16A es una vista en perspectiva del aparato de manipulación de muestras de ejemplo de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

La Figura 16B es una vista frontal del aparato de manipulación de muestras de ejemplo que muestra las dimensiones de ejemplo del aparato de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

20 La Figura 16C es una vista lateral del aparato de manipulación de muestras de ejemplo que muestra las dimensiones de ejemplo del aparato de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

Las Figuras 17A-17C representan un flujo de trabajo para cargar portaobjetos en un aparato de manipulación de muestras para una alineación posterior de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

25 Las Figuras 18A-18C representan un flujo de trabajo para alinear los portaobjetos cargados del aparato de manipulación de muestras de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

30 La Figura 19 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo para alinear un área de muestra con un área de matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

35 La Figura 20 representa un flujo de trabajo para ajustar una localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato para alinear toda o una porción de un área de muestra con un área de matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

Las Figuras 21A-21B representan un flujo de trabajo para ajustar una localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato en base a un indicador de área de matriz configurado dentro de un portamuestras de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

40 Las Figuras 21C-21D representan un flujo de trabajo para ajustar una localización de múltiples primeros sustratos con relación al segundo sustrato en base a múltiples indicadores de área de matriz configurados dentro de un portamuestras de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

45 Las Figuras 22A-22C representa un flujo de trabajo para indicar un área de muestra de un sustrato de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

50 La Figura 23 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo para determinar automáticamente un indicador del área de muestra en base a una imagen recibida de la muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

Las Figuras 24A-24B representan un flujo de trabajo para recibir una entrada que identifica un indicador del área de muestra en base a una imagen de una muestra.

55 La Figura 25 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo para determinar automáticamente un indicador del área de muestra en base a una pluralidad recibida de imágenes de vídeo de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

60 La Figura 26 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo para determinar automáticamente un indicador del área de muestra que responde a determinar un área de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

La Figura 27 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo para determinar una marca fiducial localizada en un primer sustrato de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

- La Figura 28 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo para identificar el indicador del área de muestra en base a una imagen de muestra registrada de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.
- 5 Las Figuras 29A-29C representan un flujo de trabajo para la permeabilización de una muestra del aparato de manipulación de muestras de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.
- La Figura 30 es un diagrama de un aparato de manipulación de muestras de ejemplo de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.
- 10 Las Figuras 31A-31C representan un flujo de trabajo para la captura de imágenes de los portaobjetos intercalados del aparato de manipulación de muestras durante una etapa de permeabilización de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.
- 15 La Figura 32 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo para generar una imagen alineada en base al registro de una imagen de muestra a una imagen de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.
- 20 Las Figuras 33A-33 representan un flujo de trabajo para registrar una imagen de muestra en una imagen de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.
- Las Figuras 34A-34E representan un flujo de trabajo para registrar una imagen de muestra en una imagen de la matriz en base a la alineación de un fiducial de la muestra y un fiducial de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.
- 25 Las Figuras 35A-35E representan un flujo de trabajo para registrar una imagen de muestra en una imagen de la matriz en base a la alineación de un fiducial de la muestra proporcionado por el usuario y un fiducial de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.
- 30 Las Figuras 36A-36B representan un flujo de trabajo para registrar una imagen de muestra en una imagen de la matriz en base a la alineación de un borde de un sustrato de muestra y un fiducial de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.
- 35 Las Figuras 37A-37D son diagramas que ilustran modalidades de fiduciales de las muestras de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.
- Las Figuras 38A-38C son diagramas que ilustran modalidades de un fiducial de la muestra configurado en una parte trasera de un sustrato de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.
- 40 Las Figuras 39A-39E son diagramas que ilustran modalidades de configuraciones de fiduciales de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.
- Las Figuras 40A-40C son diagramas que ilustran modalidades de localizaciones en las que una imagen de baja resolución que incluye una matriz superpuesta a una muestra puede capturarse para registrar una imagen de muestra en una imagen de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.
- 45 La Figura 41 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo para generar una imagen alineada en base al registro de una imagen de muestra a una imagen de la matriz mediante el uso de múltiples fiduciales del instrumento de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.
- 50 La Figura 42 representa un flujo de trabajo para generar una imagen alineada en base al registro de una imagen de muestra a una imagen de la matriz mediante el uso de múltiples fiduciales del instrumento de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.
- 55 Las Figuras 43A-43B ilustran artefactos de costuras que pueden estar presentes dentro de imágenes cosidas que incluyen una pluralidad de porciones individuales de imagen.
- La Figura 44 es un diagrama de flujo del proceso que ilustra un proceso de ejemplo para registrar imágenes de la porción de muestra de una imagen de muestra a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.
- 60 La Figura 45 representa un flujo de trabajo para registrar imágenes de la porción de muestra de una imagen de muestra a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.
- 65

La Figura 46 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo para registrar imágenes de la porción de matriz de una imagen de la matriz a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

5 La Figura 47 representa un flujo de trabajo para registrar imágenes de la porción de matriz de una imagen de la matriz a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

10 La Figura 48 es un diagrama de flujo del proceso que ilustra un proceso de ejemplo para registrar imágenes de porciones de muestra cosidas a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

15 La Figura 49 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo para registrar imágenes de la porción de muestra cosida a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de muestra en base a la determinación de una o más localizaciones con código de barras de una matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

La Figura 50 representa un flujo de trabajo para registrar imágenes de la porción de muestra cosida a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

20 La Figura 51 es un diagrama de flujo del proceso que ilustra un proceso de ejemplo para registrar imágenes de la porción de muestra cosida a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de muestra y registrar imágenes de la porción de matriz cosida a porciones correspondientes de la muestra en la imagen de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

25 La Figura 52 representa un flujo de trabajo para registrar imágenes de la porción de muestra cosida a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de muestra y registrar imágenes de la porción de matriz cosida a porciones correspondientes de la muestra en la imagen de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual.

30 La Figura 53 es un diagrama de una arquitectura de sistema de ejemplo para realizar los procesos de registro de imagen y flujos de trabajo descritos en la presente descripción de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. La Figura 54 es un diagrama de una arquitectura de software de ejemplo para realizar los procesos y flujos de trabajo descritos en la presente descripción de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

35 La Figura 55 es un diagrama de una arquitectura de ejemplo del subsistema de gestión de imágenes que se muestra en la Figura 54 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

La Figura 56 es un diagrama que ilustra una arquitectura de ejemplo de un dispositivo informático de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

40 La Figura 57 es una pantalla de interfaz de ejemplo proporcionada por las herramientas de visualización descritas en la presente descripción de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

45 Las Figuras 58A-58B representan una configuración de una muestra y una matriz en la que los fiduciales de la matriz no se solapan con la muestra en datos de imagen adquiridos de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. La Figura 59 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo para detectar fiduciales asociados a una matriz de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

50 Las Figuras 60A-60B representan un flujo de trabajo para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen adquiridos de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

Las Figuras 61A-61B representan un flujo de trabajo para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen adquiridos en diferentes planos focales de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

55 Las Figuras 62A-62B representan un flujo de trabajo para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen adquiridos en diferentes iluminaciones de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

Las Figuras 63A-63B son imágenes que ilustran datos de imagen adquiridos con diferentes iluminaciones de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

60 La Figura 64 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo para detectar fiduciales asociados a una matriz mediante el uso de fiduciales del instrumento proporcionados en un aparato de manipulación de muestras de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

Las Figuras 65A-65B representan un flujo de trabajo para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen que incluyen fiduciales del instrumento proporcionados en un aparato de manipulación de muestras de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

5 La Figura 66 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo para detectar fiduciales aplicados a un sustrato en el que se localiza una matriz de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

10 Las Figuras 67A-67B representan un flujo de trabajo para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen que incluyen fiduciales aplicados a un sustrato en el que se localiza una matriz de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

15 Las Figuras 68A-68B representan un flujo de trabajo para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen adquiridos en relación con una permeabilización de la muestra de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

20 La Figura 69 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo para detectar fiduciales mediante el uso del registro de imagen de datos de imagen de muestra y datos de imagen de la matriz adquiridos en un aparato de manipulación de muestras que incluye separadores configurados en un sustrato de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

25 Las Figuras 70A-70B representan un flujo de trabajo para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen adquiridos y registrados mediante el uso de un aparato de manipulación de muestras que incluye separadores de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

30 La Figura 71 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo para detectar fiduciales mediante el uso del registro de imagen de datos de imagen de muestra y datos de imagen de la matriz adquiridos en múltiples iluminaciones en un aparato de manipulación de muestras que incluye separadores de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

35 Las Figuras 72A-72B representan un flujo de trabajo para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen adquiridos y registrados en múltiples iluminaciones mediante el uso de un aparato de manipulación de muestras que incluye separadores de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

40 Las Figuras 73A-73C son imágenes que ilustran modalidades de datos de imagen adquiridos en diferentes iluminaciones por un aparato de manipulación de muestras para su uso en procesos y técnicas de registro de imágenes de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

45 Las Figuras 74A-74B son imágenes que ilustran modalidades adicionales de datos de imagen adquiridos en diferentes iluminaciones por un aparato de manipulación de muestras para su uso en procesos y técnicas de registro de imágenes de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

50 Las Figuras 75A-75D son gráficos que ilustran datos de ejemplos asociados con errores de registro y posición usados para verificar los procesos y técnicas de registro de imagen descritos en la presente descripción de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

55 La Figura 76 representa un flujo de trabajo de ejemplo para la captura de imágenes y vídeos mediante un aparato de manipulación de muestras descrito en la presente descripción de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

Descripción detallada

50 I. Introducción

Esta descripción describe aparatos, sistemas, métodos y composiciones para el análisis espacial de muestras biológicas. Esta sección describe cierta terminología general, analitos, tipos de muestras y etapas preparativas a las que se hace referencia en las secciones posteriores de la descripción. Por ejemplo, los términos y frases: análisis espacial, código de barras, ácido nucleico, nucleótido, sonda, objetivo, oligonucleótido, polinucleótido, sujeto, genoma, adaptador, etiqueta, hibridación, hibridar, recocado, recocer, cebador, extensión del cebador, ligadura de proximidad, extensión de ácido nucleico, amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), anticuerpo, grupo de afinidad, etiqueta, etiqueta detectable, etiqueta óptica, oligonucleótido conmutador de molde, oligonucleótido de férula, analitos, muestras biológicas, metodología analítica general basada en matrices espaciales, métodos de análisis espacial, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, sondas de captura, sustratos, matrices, captura de analitos, particionamiento, análisis de analitos capturados, control de calidad, multiplexación, y/o similares se describen con más detalle en la publicación de solicitud de patente PCT núm. WO2020/123320.

65 Los tejidos y las células pueden obtenerse a partir de cualquier fuente. Por ejemplo, los tejidos y las células pueden obtenerse a partir de organismos monocelulares o multicelulares (por ejemplo, un mamífero). La relación entre las

células y sus localizaciones relativas dentro de una muestra de tejido puede ser crítica para comprender la patología de la enfermedad. La tecnología espacial (por ejemplo, transcriptómica espacial) puede permitir a los científicos medir toda la actividad génica en una muestra de tejido y mapear dónde se produce la actividad. Esta tecnología y modalidades descritas en la presente descripción pueden conducir a nuevos descubrimientos que pueden resultar fundamentales para ayudar a los científicos a comprender mejor los procesos biológicos y las enfermedades.

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

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

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

Las metodologías de análisis espacial descritas en la presente descripción proporcionan una gran cantidad de datos de nivel de analito y/o expresión para una variedad de múltiples analitos dentro de una muestra a alta resolución espacial, por ejemplo, mientras retienen el contexto espacial nativo.

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

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

Los aspectos no limitantes de las metodologías de análisis espacial se describen en los documentos WO 2011/127099, WO 2014/210233, WO 2014/210225, WO 2016/162309, WO 2018/091676, WO 2012/140224, WO 2014/060483, patente de Estados Unidos núm. 10,002,316, patente de Estados Unidos núm. 9,727,810, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2017/0016053, Rodriques y otros, *Science* 363(6434):1463-1467, 2019; WO 2018/045186, Lee y otros, *Nat. Protoc.* 10(3):442-458, 2015; WO 2016/007839, WO 2018/045181, WO 2014/163886, Trejo y otros, *PLoS ONE* 14(2):e0212031, 2019, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2018/0245142, Chen y otros, *Science* 348(6233):aa6090, 2015, Gao y otros, *BMC Biol.* 15:50, 2017, WO 2017/144338, WO 2018/107054, WO 2017/222453, WO 2019/068880, WO 2011/094669, Patente de Estados Unidos núm. 7,709,198, Patente de Estados Unidos núm. 8,604,182, Patente de Estados Unidos núm. 8,951,726, Patente de Estados Unidos núm. 9,783,841, Patente de Estados Unidos núm. 10,041,949, WO 2016/057552, WO 2017/147483, WO 2018/022809, WO 2016/166128, WO 2017/027367, WO 2017/027368, WO 2018/136856, WO 2019/075091, Patente de Estados Unidos núm. 10,059,990, WO 2018/057999, WO 2015/161173, y Gupta y otros, *Nature Biotechnol.*

36:1197-1202, 2018, la totalidad de los contenidos puede usarse en la presente descripción en cualquier combinación. En la presente descripción se describen aspectos adicionales no limitantes de las metodologías de análisis espacial. Las modalidades descritas en la presente descripción pueden mapear la expresión génica espacial de muestras de tejido complejas (por ejemplo, en portaobjetos de tejido) con portaobjetos (por ejemplo, portaobjetos de expresión génica) que utilizan la tecnología de captura de transcritos de analito y/o ARNm y de códigos de barras espaciales para la preparación de bibliotecas. Un tejido (por ejemplo, fijado en formalina, embebido en parafina (FFPE), o similar puede cortarse en secciones y colocarse cerca de un portaobjetos con miles de puntos con código de barras, cada uno que contiene millones de oligonucleótidos de captura con códigos de barras espaciales únicos para ese punto. Una vez que las secciones de tejido se fijan, tiñen y permeabilizan, liberan ARNm que se une para capturar oligos de una localización proximal en el tejido. Puede producirse una reacción de transcripción inversa mientras el tejido aún está en su lugar, lo que genera una biblioteca de ADNc que incorpora los códigos de barras espaciales y conserva la información espacial. Las bibliotecas de ADNc con código de barras se mapean de nuevo a un punto específico en un área de captura de los puntos con código de barras. Estos datos de expresión génica pueden estratificarse posteriormente sobre una imagen de microscopio de alta resolución de la sección de tejido, lo que hace posible visualizar la expresión de cualquier ARNm, o combinación de ARNm, dentro de la morfología del tejido de una manera resuelta espacialmente.

La Figura 1 muestra un flujo de trabajo de análisis espacial de ejemplo 100 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El flujo de trabajo 100 incluye preparar una muestra biológica en un portaobjetos (por ejemplo, un portaobjetos de patología) 101, fijar la muestra y/o teñir 102 la muestra biológica para la obtención de imágenes. A continuación, la muestra teñida puede obtenerse una imagen en el portaobjetos 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 las características de la imagen). La obtención de imágenes puede incluir obtención de imágenes de alta resolución (por ejemplo, imágenes que pueden describir características patológicas e histológicas). Opcionalmente, en 103, la muestra puede destañarse antes de la permeabilización. En 104, puede aplicarse una solución de permeabilización a la muestra biológica mientras que el portaobjetos de patología se alinea en una configuración "intercalada" con un portaobjetos que comprende una matriz con código de barras espacial (por ejemplo, en un portaobjetos de la matriz). La solución de permeabilización permite que los transcritos de analito y/o ARNm migren alejándose de la muestra, se difundan a través de la solución de permeabilización y hacia la matriz. Los transcritos de analito y/o ARNm interactúan con una sonda de captura en el portaobjetos.

En 105, 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 conmutadores de molde. En 106, el ADNc de la primera hebra puede amplificarse (por ejemplo, mediante el uso de reacción en cadena de la polimerasa (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 en particular. 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.

La Figura 2 representa un flujo de trabajo de ejemplo 101 para preparar la muestra biológica en el portaobjetos (por ejemplo, un portaobjetos de patología) de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. La preparación de la muestra biológica en el portaobjetos puede incluir seleccionar un portaobjetos de vidrio de patología 201. El flujo de trabajo 101 incluye además colocar secciones de tejido en el portaobjetos de vidrio 202. Colocar secciones de tejido en el portaobjetos de vidrio puede incluir colocar el tejido en cualquier lugar del portaobjetos de vidrio, que incluye colocar el tejido en o en relación con un fiducial dispuesto en el portaobjetos de vidrio. El fiducial puede incluir cualquier marca para ayudar en la colocación del tejido en el portaobjetos y/o ayudar en la alineación del portaobjetos de tejido con relación al portaobjetos de expresión génica. El flujo de trabajo 101 incluye además teñir el tejido con hematoxilina y eosina 203 u otro agente o método de tinción. El flujo de trabajo 101 incluye además obtener imágenes del tejido 204 en el portaobjetos mediante el uso de un campo claro (por ejemplo, para obtener imágenes de tinción con hematoxilina y eosina de la muestra) u otra técnica de obtención de imágenes. La obtención de imágenes puede incluir obtención de imágenes de alta resolución en un sistema de obtención de imágenes del usuario. La obtención de imágenes también puede incluir obtención de imágenes realizadas mediante el uso de un dispositivo de captura de imágenes configurado en los aparatos de manipulación de muestras descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, la obtención de imágenes realizada mediante el uso del dispositivo de captura de imágenes puede incluir obtención de imágenes de baja resolución o alta resolución. La obtención de imágenes puede permitir al usuario confirmar la patología relevante y/o identificar cualquier área objetivo para el análisis. La obtención de imágenes puede realizarse en uno o más modos de captura de imágenes mediante el uso del dispositivo de captura de imágenes y el aparato de manipulación de muestras descrito en la presente descripción.

Las modalidades descritas en la presente descripción relacionadas con la preparación de la muestra biológica en el portaobjetos pueden permitir beneficiosamente que un usuario confirme la patología o las regiones relevantes en una sección de tejido, para confirmar la selección de las secciones de tejido mejores o sin daños para el análisis, para mejorar la alineación matriz-tejido al permitir la colocación en cualquier lugar del portaobjetos de patología. Además,

los flujos de trabajo para preparar la muestra biológica en el portaobjetos pueden permitir al usuario o científicos elegir qué secuencia (por ejemplo, qué sección(ones) de tejido secuenciar).

La Figura 3 es un diagrama esquemático que representa un proceso de intercalado de ejemplo (por ejemplo, interacción de la solución de permeabilización) 104 entre un primer sustrato que comprende una muestra biológica tal como una sección de tejido (por ejemplo, un portaobjetos de tejido) y un segundo sustrato que comprende una matriz con código de barras espacial, (por ejemplo, un portaobjetos de expresión génica) en una configuración de intercalado de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Durante el proceso de intercalado de ejemplo, 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 (por ejemplo, se alinea en una configuración de intercalado). En la configuración de ejemplo, una muestra (una muestra de tejido o biológica) 302 se dispone en el portaobjetos de patología 303 y se intercala entre el portaobjetos de patología 303 y un portaobjetos 304 (por ejemplo, portaobjetos de expresión génica) que se rellena con sondas de captura 306 codificadas espacialmente. Como se muestra, el portaobjetos 304 está en una posición superior al portaobjetos de patología 303. En algunas modalidades, el portaobjetos de patología 303 puede colocarse superior al portaobjetos de vidrio 304. Cuando se aplica una solución de permeabilización 305 a un espacio 307 entre el portaobjetos de patología 303 y el portaobjetos 304, la solución de permeabilización 305 crea un tampón de permeabilización que permeabiliza o digiere la muestra 302 y los analitos (por ejemplo, transcritos de ARNm) 308 de la muestra de tejido 302 pueden liberarse, difundirse a través del espacio 307 hacia las sondas de captura 306, y unirse en las sondas de captura 306. En algunas modalidades, los agentes de captura de analito que se han unido a analitos en la muestra (o porciones de tales agentes de captura de analito) pueden liberar, migrar activa o pasivamente a través del espacio y unirse en las sondas de captura.

Después de que los analitos (por ejemplo, transcritos) 308 se unen en las sondas de captura 306, puede producirse una reacción de extensión (por ejemplo, una reacción de transcripción inversa), generando una biblioteca con código de barras espacial. Por ejemplo, en el caso de los transcritos de ARNm, puede producirse la transcripción inversa, generando de esta manera una biblioteca de ADNc asociada con un código de barras espacial en particular. Las bibliotecas de ADNc con código de barras pueden mapearse de nuevo a un punto específico en un área de captura de las sondas de captura 306. Estos datos de expresión génica pueden estratificarse posteriormente sobre una imagen microscópica de alta resolución de la sección de tejido ((por ejemplo, tomada en 204 de la Figura 2), lo que hace posible visualizar la expresión de cualquier ARNm, o combinación de ARNm, dentro de la morfología del tejido de una manera resuelta espacialmente.

En algunas modalidades, la reacción de extensión puede realizarse por separado del aparato de manipulación de muestras descrito en la presente descripción que se configura para realizar el proceso de intercalado de ejemplo 104. La configuración de intercalado de la muestra 302, el portaobjetos de patología 303 y el portaobjetos 304 pueden proporcionar ventajas sobre otros métodos de análisis espacial y/o captura de analitos. Por ejemplo, la configuración de intercalado puede reducir una carga de que los usuarios se desarrollen en el interior de la experiencia en seccionamiento de tejidos y/o montaje de tejidos. Además, la configuración de intercalado puede desacoplar la preparación de muestras/obtención de imágenes de tejido de la matriz con código de barras (por ejemplo, sondas de captura con código de barras espaciales 306) y permitir la selección de una región particular de interés del análisis (por ejemplo, para una sección de tejido mayor que la matriz con código de barras). La configuración de intercalado también permite beneficiosamente el análisis espacial sin tener que colocar una sección de tejido 302 directamente en el portaobjetos de expresión génica (por ejemplo, el portaobjetos 304).

La configuración de intercalado descrita en la presente descripción proporciona además la capacidad beneficiosa de comprobar la calidad o seleccionar secciones específicas de tejido antes de comprometer tiempo y recursos adicionales al flujo de trabajo del análisis. Esto puede ser ventajoso para reducir costos y riesgos o errores o problemas que pueden surgir durante la preparación de las muestras. Adicionalmente, la configuración de intercalado puede permitir la capacidad de seleccionar qué área de una muestra secuenciar cuando una sección de muestra es mayor que una matriz. Otro beneficio del uso de la configuración de intercalado descrita en la presente descripción es la capacidad de separar la obtención de imágenes fiduciales y la obtención de imágenes de muestras de alta resolución. Esto puede permitir la separación de la experiencia necesaria para realizar flujos de trabajo histológicos y flujos de trabajo de biología molecular y puede permitir además que el ensayo y la muestra se muevan entre diferentes laboratorios. Adicionalmente, la configuración de intercalado descrita en la presente descripción puede proporcionar una gran flexibilidad y más opciones en las condiciones de preparación de muestras ya que no hay oligos en el sustrato de muestra o portaobjetos. Esto puede reducir la posibilidad de que una muestra se caiga del sustrato y puede reducir la posibilidad de que los oligos se dañen debido a altas temperaturas o interacciones con otros reactivos durante la preparación de la muestra. La configuración de intercalado descrita en la presente descripción también puede mejorar la sensibilidad y la resolución espacial al confinar verticalmente las moléculas objetivo dentro de la distancia de difusión.

II. Sistemas para análisis de muestras

Los métodos descritos anteriormente para analizar muestras biológicas, tales como la configuración de intercalado descrita anteriormente, pueden implementarse mediante el uso de una variedad de componentes de hardware. En esta sección, se describen ejemplos de tales componentes. Sin embargo, debe entenderse que en general, las

diversas etapas y técnicas analizadas en la presente descripción pueden realizarse mediante el uso de una variedad de diferentes dispositivos y componentes del sistema, no todos los cuales se exponen expresamente.

5 La Figura 4 es un diagrama esquemático que muestra un aparato de manipulación de muestras de ejemplo 400 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El aparato de manipulación de muestras 400, también denominado portamuestras 400, incluye un primer miembro 404 que contiene un primer sustrato 406 sobre el cual puede posicionarse una muestra 302. El primer miembro 404 puede incluir un primer mecanismo de retención configurado para retener el primer sustrato 406 en una posición fija a lo largo de un eje y dispuesto en un primer plano. Como se muestra, el aparato de manipulación de muestras 400 también incluye un segundo miembro 410 que contiene un segundo sustrato 412. El segundo miembro 410 puede incluir un segundo mecanismo de retención configurado para retener el segundo sustrato 412 dispuesto en un segundo plano. El segundo sustrato 412 puede incluir una matriz con código de barras (por ejemplo, sondas de captura con código de barras espaciales 306), como se describió anteriormente. Como se muestra, el aparato de manipulación de muestras 400 también incluye un mecanismo de ajuste 415 configurado para mover el segundo miembro 410. El mecanismo de ajuste 415 puede acoplarse al segundo miembro 410 e incluye un accionador lineal 420 configurado para mover el segundo miembro 410 a lo largo de un eje z ortogonal al segundo plano. En algunos aspectos, el mecanismo de ajuste 415 puede acoplarse alternativa o adicionalmente al primer miembro 404.

20 La Figura 5A representa un primer miembro de ejemplo 404 y un segundo miembro 410 de ejemplo de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el segundo miembro 410 incluye un pasador 505. Como se muestra además, el primer miembro 404 incluye una abertura 504. La abertura 504 puede dimensionarse y configurarse para acoplarse con el pasador 505. En algunos aspectos, el mecanismo de ajuste 415 (no mostrado) puede incluir el pasador 505 y la abertura 504. El pasador 505 y el acoplamiento de la abertura 504 pueden resultar en que el primer miembro 404 se alinee con relación al segundo miembro 410.

25 La Figura 5B representa un ejemplo del primer miembro 404 acoplado o unido mecánicamente de cualquier otra manera al segundo miembro 410 en una configuración de intercalado (por ejemplo, a través del pasador 505 y la abertura 504) de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el segundo sustrato 412 incluye un separador 507 que rodea al menos parcialmente la matriz con código de barras del segundo sustrato 412. El separador 507 puede configurarse para entrar en contacto y mantener una separación mínima entre el primer sustrato 406 y el segundo sustrato 412. Aunque el separador 507 se muestra dispuesto sobre el segundo sustrato 412, el separador 507 puede disponerse adicional o alternativamente sobre el primer sustrato 406.

35 La Figura 5C representa un ejemplo del primer miembro 404 acoplado al segundo miembro 410 en una configuración de intercalado que incluye un miembro de acoplamiento 509 acoplado al primer sustrato 406 y al segundo sustrato 412 y configurado para inhibir el movimiento entre el primer sustrato 406 y el segundo sustrato 412 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. En algunos aspectos, el miembro de acoplamiento 509 incluye un imán que empuja el primer sustrato 406 hacia el segundo sustrato 412 o viceversa (por ejemplo, mediante una fuerza magnética).

40 La Figura 6 es un diagrama de un primer miembro 604 de ejemplo y un segundo miembro 410 de ejemplo de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra en el lado izquierdo de la Figura 6, el primer miembro 604 se acopla al segundo miembro 410. El lado superior derecho de la Figura 6 representa el primer miembro 604. Como se muestra, el primer miembro 604 se configura para retener dos primeros sustratos 406. Como se muestra además, los dos primeros sustratos 406 se disponen sustancialmente paralelos entre sí a lo largo de un plano común (por ejemplo, un plano xy) dentro del primer miembro 604. El primer miembro incluye un primer mecanismo de retención 608 configurado para retener un primer sustrato 406. El primer mecanismo de retención 608 puede incluir émbolos de resorte configurados para empujar el primer sustrato 406 a una posición, puede incluir un diseño de abrazadera cargada por resorte configurado para aplicar una fuerza al primer sustrato 406 para mantener el contacto entre el primer sustrato 406 y el primer miembro 604, o similares para retener el primer sustrato 406 en una posición en el primer miembro 604. El lado inferior derecho de la Figura 6 representa el segundo miembro 410. El segundo miembro 410 incluye un segundo mecanismo de retención 609 configurado para retener el segundo sustrato 412. El segundo mecanismo de retención 609 puede incluir émbolos de resorte configurados para empujar el segundo sustrato 412 a una posición, puede incluir un diseño de abrazadera cargada por resorte configurado para aplicar una fuerza al segundo sustrato 412 para mantener el contacto entre el segundo sustrato 412 y el segundo miembro 410, o similares para retener el segundo sustrato 412 en una posición en el segundo miembro 410.

55 La Figura 7 representa un diagrama 700 de una vista inferior en primer plano del primer miembro 404 acoplado al segundo miembro 410 y un área de solapamiento 710 donde el primer sustrato 406 se solapa con el segundo sustrato 412 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El solapamiento puede producirse a lo largo de un eje ortogonal al primer sustrato 406 y/u ortogonal al segundo sustrato 412. En algunos aspectos, una cámara puede capturar una imagen del área de solapamiento 710 que puede usarse como parte del análisis espacial descrito adicionalmente en la presente descripción. En algunas modalidades, el diagrama 700 representa un conjunto del primer miembro 404 acoplado al segundo miembro 410 que tiene dimensiones de 113 mm de largo y 112 mm de ancho, aunque son posibles otras dimensiones.

La Figura 8 representa una vista en sección transversal frontal del aparato de manipulación de muestras 400 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el primer miembro 404 y el segundo miembro 410 pueden configurarse para mantener una distancia de separación 405 entre el primer sustrato 406 y el segundo sustrato 412. La distancia de separación 405 puede ser de 19,5 mm en una posición inicial o abierta. En algunos aspectos, el mecanismo de ajuste 415 puede configurarse para ajustar la distancia de separación 405.

La Figura 9 es un diagrama de un mecanismo de ajuste de ejemplo 415 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El mecanismo de ajuste 415 puede incluir una placa móvil 916, un casquillo 917, un tornillo de hombro 918, un soporte de motor 919 y el actuador lineal 420. La placa móvil 916 puede acoplarse al segundo miembro 410 y ajustar la distancia de separación 405 a lo largo de un eje z (por ejemplo, ortogonal al segundo sustrato 412) al mover la placa móvil 916 hacia arriba en una dirección superior hacia el primer sustrato 406. El movimiento de la placa móvil 906 puede lograrse mediante el accionador lineal 420 configurado para mover el segundo miembro 410 a lo largo del eje ortogonal al segundo plano a una velocidad. La velocidad puede controlarse mediante un controlador acoplado comunicativamente al accionador lineal 420. Por ejemplo, la velocidad puede configurarse para mover la placa móvil entre al menos 0,1 mm/seg a 2 mm/seg. En algunos aspectos, la velocidad de la placa móvil (por ejemplo, cerrar el intercalado) puede afectar la generación de burbujas o la retención dentro de la solución de permeabilización 305. Además, el accionador lineal puede configurarse para mover la placa móvil 906 con una cantidad de fuerza (por ejemplo, entre 0,1-4,0 libras de fuerza). El controlador puede configurarse para ajustar la velocidad y/o la cantidad de fuerza del accionador lineal 420 para lograr una combinación deseada de velocidad y fuerza para la placa móvil 906. En algunos aspectos, la velocidad de la placa móvil (por ejemplo, cerrar el intercalado) puede afectar la generación de burbujas o la retención dentro de la solución de permeabilización 305. En algunas modalidades, la velocidad de cierre se selecciona para minimizar la generación o la retención de burbujas dentro de la solución de permeabilización 305. En algunas modalidades, la velocidad de cierre se selecciona para reducir el tiempo que toma la parte frontal del flujo de un medio reactivo desde un punto de contacto inicial con el primer y segundo sustrato para barrer a través del área de intercalado (también denominado en la presente descripción como "tiempo de cierre". En algunas modalidades, la velocidad de cierre se selecciona para reducir el tiempo de cierre a menos de aproximadamente 1100 ms. En algunas modalidades, la velocidad de cierre se selecciona para reducir el tiempo de cierre a menos de aproximadamente 1000 ms. En algunas modalidades, la velocidad de cierre se selecciona para reducir el tiempo de cierre a menos de aproximadamente 900 ms. En algunas modalidades, la velocidad de cierre se selecciona para reducir el tiempo de cierre a menos de aproximadamente 750 ms. En algunas modalidades, la velocidad de cierre se selecciona para reducir el tiempo de cierre a menos de aproximadamente 600 ms. En algunas modalidades, la velocidad de cierre se selecciona para reducir el tiempo de cierre a aproximadamente 550 ms o menos. En algunas modalidades, la velocidad de cierre se selecciona para reducir el tiempo de cierre a aproximadamente 370 ms o menos. En algunas modalidades, la velocidad de cierre se selecciona para reducir el tiempo de cierre a aproximadamente 200 ms o menos. En algunas modalidades, la velocidad de cierre se selecciona para reducir el tiempo de cierre a aproximadamente 150 ms o menos.

La Figura 10 es una vista en perspectiva de un aparato de manipulación de muestras de ejemplo 400 que incluye un segundo miembro automatizado 410 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el aparato de manipulación de muestras 400 incluye el mecanismo de ajuste 415. El mecanismo de ajuste 415 puede automatizarse de manera que una o más de la placa móvil 916, el casquillo 917, el tornillo de hombro 918, el soporte del motor 919 y el accionador lineal 420 pueden controlarse mediante un controlador (no mostrado) acoplado comunicativamente al mecanismo de ajuste 415. El controlador puede configurarse para ajustar una posición del segundo miembro 410 con relación al primer miembro 404 (por ejemplo, distancia de separación 405). El primer miembro 404 puede fijarse con respecto a uno o más ejes (por ejemplo, el eje z).

La Figura 11A es una vista en perspectiva del aparato de manipulación de muestras de ejemplo 400 que incluye un calentador 1108 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el aparato de manipulación de muestras 400 incluye el calentador 1108 como parte del segundo miembro 410.

La Figura 11B es una vista despiezada de un segundo miembro de ejemplo 410 que incluye el calentador 1108 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el calentador 1108 se posiciona por debajo o inferior al segundo sustrato 412 y por encima (superior a) del segundo soporte de miembro 1110. El calentador 1108 puede configurarse para calentar el segundo sustrato 412 a una temperatura deseada u objetivo. El segundo soporte de miembro 1110 incluye una ventana de corte 1111 para el área de solapamiento 710. El segundo soporte de miembro 1110 incluye además un bolsillo de epoxi 1112 para el calentador 1108 y orificios de tornillo 1113 para el primer sustrato 406 y la segunda alineación paralela del sustrato 412. Como se muestra además, el segundo miembro 410 incluye el segundo mecanismo de retención 609. El segundo mecanismo de retención 609 puede incluir una abrazadera oscilante, una abrazadera cargada por resorte, o similares para retener el segundo sustrato 412 en una posición dentro del segundo miembro 410.

La Figura 11C es un gráfico 1150 de un perfil de temperatura del sustrato deseado de ejemplo (por ejemplo, portaobjetos) a lo largo del tiempo de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra en el gráfico 1150, la temperatura del portaobjetos puede rondar cerca de una temperatura ambiente (por ejemplo, entre 18-28 °C) hasta un tiempo de activación 1160 (por ejemplo, cuando se inician la obtención de imágenes o cuando comienza el intercalado de los sustratos). Después del tiempo de activación 1160, el calentador 1108 puede calentar

5 el portaobjetos y la temperatura del portaobjetos puede aumentar linealmente hasta que la temperatura del portaobjetos alcance una temperatura umbral a la temperatura del portaobjetos deseada en 1170. Después de alcanzar la temperatura umbral, la temperatura de portaobjetos puede fluctuar sinusoidalmente alrededor de la temperatura de portaobjetos deseada, T_{set} , y puede estabilizarse dentro de una amplitud umbral alrededor de la temperatura deseada T_{set} . En 1180, el temporizador de intercalado puede completarse y la temperatura de portaobjetos puede comenzar a bajar y volver a la temperatura ambiente. En algunos aspectos, la temperatura deseada puede basarse en la muestra de tejido 302, la solución de permeabilización 305, una temperatura inicial del primer sustrato o del segundo sustrato, o similares.

10 La Figura 12A es una vista en perspectiva de un primer miembro de ejemplo 404 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el primer miembro 404 incluye una placa de sujeción 1210 y el primer mecanismo de retención 608 que retiene el primer sustrato 406 dentro del primer miembro 404.

15 La Figura 12B es una vista despiezada del primer miembro de ejemplo 404 de la Figura 12A de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el primer miembro 404 incluye la placa de soporte 1210, una junta aislante 1211, una almohadilla térmica 1212 y un enfriador termoeléctrico (TEC) 1213. El soporte de la placa 1210 puede configurarse para recibir y retener el primer sustrato 406. La junta aislante 1211, la almohadilla térmica 1212 y/o el TEC 1213 pueden configurarse para ajustar y/o mantener una temperatura deseada u objetivo para el primer sustrato 406.

20 La Figura 13A es una vista en sección transversal en perspectiva de un primer miembro de ejemplo 404 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el primer miembro 404 de la Figura 13A incluye la placa de soporte 1210, la junta aislante 1211, el TEC 1213 y un bloque disipador de calor 1214.

25 La Figura 13B es una vista en perspectiva de la placa de soporte de ejemplo 1210 de la Figura 13A de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el soporte de la placa 1210 incluye una ventana de corte 1216 para el área de solapamiento 710.

30 La Figura 13C es una vista en perspectiva del bloque disipador de calor de ejemplo 1214 de la Figura 13A de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el bloque disipador de calor 1214 incluye una ventana de corte 1217 para el área de solapamiento 710.

35 La Figura 14A es una vista en perspectiva de un aparato de manipulación de muestras de ejemplo 1400 en una posición cerrada de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el aparato de manipulación de muestras 1400 incluye un primer miembro 1404, un segundo miembro 1410, un dispositivo de captura de imágenes 1420, un primer sustrato 1406, una bisagra 1415 y un espejo 1416. La bisagra 1415 puede configurarse para permitir que el primer miembro 1404 se posicione en una configuración abierta o cerrada abriendo y/o cerrando el primer miembro 1404 a manera concha a lo largo de la bisagra 1415.

40 La Figura 14B es una vista en perspectiva del aparato de manipulación de muestras de ejemplo 1400 en una posición abierta de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el aparato de manipulación de muestras 1400 incluye uno o más primeros mecanismos de retención 1408 configurados para retener uno o más primeros sustratos 1406. En el ejemplo de la Figura 14B, el primer miembro 1404 se configura para retener dos primeros sustratos 1406, sin embargo, el primer miembro 1404 puede configurarse para retener más o menos primeros sustratos 1406.

45 En algunos aspectos, cuando el aparato de manipulación de muestras 1400 está en una posición abierta (como en la Figura 14B), el primer sustrato 1406 y/o el segundo sustrato 1412 pueden cargarse y posicionarse dentro del aparato de manipulación de muestras 1400 tal como dentro del primer miembro 1404 y el segundo miembro 1410, respectivamente. Como se señaló, la bisagra 1415 puede permitir que el primer miembro 1404 se cierre sobre el segundo miembro 1410 y forme una configuración de intercalado (por ejemplo, la configuración de intercalado mostrada en la Figura 3).

50 En algunos aspectos, después de que el primer miembro 1404 se cierra sobre el segundo miembro 1410, un mecanismo de ajuste (no mostrado) del aparato de manipulación de muestras 1400 puede accionar el primer miembro 1404 y/o el segundo miembro 1410 para formar la configuración de intercalado para la etapa de permeabilización (por ejemplo, acercar el primer sustrato 1406 y el segundo sustrato 1412 entre sí y dentro de una distancia umbral para la configuración de intercalado). El mecanismo de ajuste puede configurarse para controlar una velocidad, un ángulo, o similares de la configuración de intercalado.

55 En algunas modalidades, la muestra de tejido (por ejemplo, la muestra 302) puede alinearse dentro del primer miembro 1404 (por ejemplo, mediante el primer mecanismo de retención 1408) antes de cerrar el primer miembro 1404 de manera que una región de interés deseada de la muestra 302 se alinea con la matriz con código de barras del portaobjetos de expresión génica (por ejemplo, el portaobjetos 304), por ejemplo, cuando el primer y segundo sustratos se alinean en la configuración de intercalado. Tal alineación puede lograrse manualmente (por ejemplo, por un usuario) o automáticamente (por ejemplo, mediante un mecanismo de alineación automatizado). Después o antes de la

alineación, los separadores pueden aplicarse al primer sustrato 1406 y/o al segundo sustrato 1412 para mantener una separación mínima entre el primer sustrato 1406 y el segundo sustrato 1412 durante el intercalado. En algunos aspectos, la solución de permeabilización (por ejemplo, la solución de permeabilización 305) puede aplicarse al primer sustrato 1406 y/o al segundo sustrato 1412. El primer miembro 1404 puede entonces cerrarse sobre el segundo miembro 1410 y formar la configuración de intercalado. Los analitos y/o transcritos de ARNm 308 pueden capturarse por las sondas de captura 306 y pueden procesarse para el análisis espacial.

En algunas modalidades, durante la etapa de permeabilización, el dispositivo de captura de imágenes 1420 puede capturar imágenes del área de solapamiento (por ejemplo, el área de solapamiento 710) entre el tejido 302 y las sondas de captura 306. Si más de un primer sustrato 1406 y/o segundo sustrato 1412 están presentes dentro del aparato de manipulación de muestras 1400, el dispositivo de captura de imágenes 1420 puede configurarse para capturar una o más imágenes de una o más áreas de solapamiento 710.

El dispositivo de captura de imágenes 1420 y el aparato de manipulación de muestras 1400 pueden configurarse para capturar imágenes en uno o más modos de captura de imágenes. Los modos de captura de imágenes pueden incluir ajustes y parámetros programáticos que pueden aplicarse por un usuario y pueden configurar el dispositivo de captura de imágenes 1420 y el aparato de manipulación de muestras 1400 para capturar imágenes en una variedad de flujos de trabajo o condiciones experimentales. Los modos de captura de imágenes pueden permitir la captura de imágenes y la generación de datos de imagen para una variedad de casos de uso, que incluyen diferentes condiciones de tinción de muestras, diferentes condiciones de fluorescencia y diferentes requisitos de iluminación. De esta manera, el aparato de manipulación de muestras 1400 puede soportar una variedad de necesidades de obtención de imágenes en resoluciones variables que pueden ser independientes de un ensayo o flujo de trabajo experimental en particular.

En algunas modalidades, los modos de captura de imágenes pueden incluir un modo de captura libre y un modo de captura de ensayo. El modo de captura libre puede no asociarse con la captura de datos de imagen con respecto a un ensayo o flujo de trabajo de ensayo en particular. En su lugar, el modo de captura libre puede permitir a los usuarios adquirir datos de imagen como deseen, de una manera adecuada o dentro de un flujo de trabajo experimental personalizado o alternativo. Por ejemplo, pueden visualizarse de muestras de tejido teñidas con H&E antes de eliminar la hematoxilina y después de eliminar la hematoxilina.

El modo de captura del ensayo puede asociarse y realizarse dentro de un ensayo o flujo de trabajo de ensayo en particular. El ensayo o flujo de trabajo del ensayo puede incluir la captura de imágenes de muestras que se han teñido. Por ejemplo, pueden visualizarse de muestras de tejido teñidas con H&E que pueden ser H&E teñidas con hematoxilina y eosina en un ensayo o flujo de trabajo de ensayo para generar datos de imagen RGB. Cuando se configura en modo de captura de ensayo, el aparato de manipulación de muestras 1400 puede capturar datos de imagen antes, durante o después de las etapas de permeabilización que pueden realizarse durante un ensayo como se describe en la presente descripción.

Los datos de imagen capturados adquiridos en cualquiera de los modos de captura de imágenes pueden usarse en los métodos de registro de imagen realizados por el aparato de manipulación de muestras 1400. En algunas modalidades, los datos de imagen adquiridos en el ensayo capturan más y/o el modo de captura libre pueden adquirirse de una manera automatizada programáticamente o de una manera manual definida por las entradas del usuario proporcionadas al aparato de manipulación de muestras 1400.

En algunas modalidades, los datos de imagen capturados en los modos de captura de imágenes descritos en la presente descripción pueden incluir datos del modo de captura de imágenes. Los datos del modo de captura de imágenes pueden ser datos tales como una etiqueta, un parámetro, o un identificador que identifica el modo de captura de imágenes particular en el que operaba el aparato de manipulación de muestras 1400 cuando los datos de imagen se capturaron mediante el uso del dispositivo de captura de imágenes 1420. En algunas modalidades, cualquiera de los aparatos de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 descritos en la presente descripción puede incluir software que implementa cualquiera de los modos de captura de imágenes. Cuando se ejecuta por un procesador de datos, el software puede hacer además que el dispositivo de captura de imágenes configurado en cualquiera de los aparatos de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 adquiera datos de imagen como se describe en la presente descripción.

La Figura 15 es una vista en perspectiva del aparato de manipulación de muestras de ejemplo 1400 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el aparato de manipulación de muestras 1400 está en una posición abierta con el primer miembro 1404 dispuesto por encima (superior a) del segundo miembro 1410. Como se indicó anteriormente, el primer miembro 1404 y/o el segundo miembro 1410 pueden configurarse para contener uno o más sustratos (por ejemplo, los primeros sustratos 1406 y/o los segundos sustratos 1412, respectivamente). El aparato de manipulación de muestras 1400 incluye además una interfaz de usuario 1525. La interfaz de usuario 1525 puede incluir una pantalla táctil para mostrar información relacionada con el aparato de manipulación de muestras y recibir controles de entrada del usuario para controlar aspectos o funciones del aparato de manipulación de muestras 1400. La Figura 16A es una vista en perspectiva del aparato de manipulación de muestras de ejemplo 1400 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

La Figura 16B es una vista frontal del aparato de manipulación de muestras de ejemplo 1400 que muestra las dimensiones de ejemplo del aparato 1400 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el aparato de manipulación de muestras puede tener un ancho de 300 mm y una altura de 255 mm, aunque son posibles otras dimensiones. El segundo miembro 1410 puede tener una altura de 150 mm y un ancho de 300 mm, aunque son posibles otras dimensiones.

La Figura 16C es una vista lateral del aparato de manipulación de muestras de ejemplo 1400 que muestra las dimensiones de ejemplo del aparato 1400 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra, el aparato de manipulación de muestras puede tener una profundidad de 405 mm, aunque son posibles otras dimensiones.

III. Dispositivos y métodos de alineación de muestras y matrices

Los flujos de trabajo de análisis espacial descritos en la presente descripción generalmente implican poner en contacto una muestra con una serie de características. Con tales flujos de trabajo, alinear la muestra con la matriz es una etapa importante en la realización de ensayos espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales). La capacidad de generar eficientemente datos experimentales robustos para una muestra dada puede depender en gran medida de la alineación de la muestra y la matriz. Las técnicas tradicionales requieren que las muestras se coloquen directamente sobre la matriz. Este enfoque puede requerir personal experto y tiempo experimental adicional para preparar una sección de la muestra y montar la sección de la muestra directamente en la matriz. La desalineación de la muestra y la matriz puede resultar en recursos desperdiciados, tiempo extendido de preparación de la muestra y uso ineficiente de las muestras, que pueden estar limitados en cantidad.

Los sistemas, métodos y medios legibles por ordenador descritos en la presente descripción pueden permitir una alineación eficiente y precisa de muestras y matrices, facilitando por lo tanto los flujos de trabajo o ensayos de obtención de imágenes y análisis espacialómico (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) descritos en la presente descripción. Las muestras, tales como porciones de tejido, pueden colocarse sobre un primer sustrato. El primer sustrato puede incluir un portaobjetos sobre el cual un usuario puede colocar una muestra del tejido. Una matriz, tal como una matriz de reactivos, puede formarse sobre un segundo sustrato. El segundo sustrato puede incluir un portaobjetos y la matriz puede formarse sobre el segundo sustrato. El uso de sustratos separados para la muestra y la matriz puede permitir beneficiosamente al usuario realizar los ensayos espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) descritos en la presente descripción sin requerir que la muestra se coloque sobre un sustrato de la matriz. El portamuestras y los métodos de uso descritos en la presente descripción pueden mejorar la facilidad mediante la cual los usuarios proporcionan muestras para el análisis transcriptómico espacial. Por ejemplo, los sistemas y métodos descritos en la presente descripción evitan que los usuarios posean experiencia avanzada en seccionamiento o montaje de muestras o tejidos. Los beneficios adicionales de utilizar sustratos separados para muestras y matrices pueden incluir tiempos mejorados de preparación de muestras e imágenes de muestras, mayor capacidad para realizar la selección de la región de interés (ROI) y un uso más eficiente de las muestras y los sustratos de matriz. Los sistemas, métodos y medios legibles por ordenador descritos en la presente descripción pueden permitir además a los usuarios seleccionar las mejores secciones de una muestra para comprometerse con los flujos de trabajo de secuenciación. Algunas muestras de tejido o porciones de las muestras de tejido pueden dañarse durante el montaje. Por ejemplo, las muestras de tejido o porciones de las muestras de tejido pueden plegarse sobre sí mismas. Los sistemas, métodos y medios legibles por ordenador descritos en la presente descripción pueden permitir además a los usuarios confirmar la patología y/o biología relevante antes de comprometerse con los flujos de trabajo de secuenciación.

El sustrato de muestra y el sustrato de la matriz, y por lo tanto, la muestra y la matriz, pueden alinearse mediante el uso del instrumento y los procesos descritos en la presente descripción. Las técnicas y métodos de alineación descritos en la presente descripción pueden generar resultados más precisos del ensayo espacialómico (por ejemplo, transcriptómico espacial) debido a la alineación mejorada de las muestras con una matriz, tal como una matriz de reactivos.

En algunas modalidades, un flujo de trabajo descrito en la presente descripción comprende poner en contacto una muestra dispuesta sobre un área de un primer sustrato con al menos una matriz de características de un segundo sustrato. En algunas modalidades, el contacto comprende acercar los dos sustratos de manera que la muestra sobre el primer sustrato pueda alinearse con la matriz con códigos de barras sobre el segundo sustrato. En algunos casos, el contacto se logra disponiendo el primer sustrato y el segundo sustrato en un conjunto intercalado. En algunas modalidades, el flujo de trabajo comprende una etapa anterior de montar la muestra sobre el primer sustrato.

La alineación de la muestra en el primer sustrato con la matriz en el segundo sustrato puede lograrse manual o automáticamente (por ejemplo, mediante una alineación motorizada). En algunos aspectos, la alineación manual puede realizarse con una asistencia óptica o mecánica mínima y puede resultar en una precisión limitada al alinear una región deseada de interés para la muestra y la matriz con código de barras. Adicionalmente, los ajustes en la alineación realizados manualmente pueden llevar mucho tiempo debido a los requisitos de tiempo relativamente pequeños durante la etapa de permeabilización.

Puede ser conveniente realizar la alineación en tiempo real de un portaobjetos de tejido (por ejemplo, el portaobjetos de patología 303) con un portaobjetos de matriz (por ejemplo, el portaobjetos 304 con sondas de captura con código de barras 306). En algunas implementaciones, tal alineación en tiempo real puede lograrse mediante etapas motorizadas y accionadores de un aparato de manipulación de muestras (por ejemplo, el aparato de manipulación de muestras 400, el aparato de manipulación de muestras 1400, o similares).

Las Figuras 17A-17C representan un flujo de trabajo 1700 para cargar portaobjetos en un aparato de manipulación de muestras para una alineación posterior de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo.

La Figura 17A representa el aparato de manipulación de muestras de ejemplo 400 sin portaobjetos cargados en el aparato 400. Como se muestra, el aparato de manipulación de muestras 400 incluye dos primeros miembros 404, el segundo miembro 410, y un dispositivo de captura de imágenes 1720. El dispositivo de captura de imágenes 1720 puede corresponder al dispositivo de captura de imágenes 1420 mostrado y descrito con relación a las Figuras. 14A-14B. Mientras que dos primeros miembros 404 y un único segundo miembro 410 se muestran en las Figuras 17A-17C, se apreciará que son posibles más o menos primeros miembros 404 y/o segundos miembros 410. Aunque el dispositivo de captura de imágenes 1720 se muestra en una posición inferior al segundo miembro 410, son posibles otras localizaciones para el dispositivo de captura de imágenes 1720 y también son posibles más o menos dispositivos de captura de imágenes 1720.

La Figura 17B representa el aparato de manipulación de muestras 400 con un portaobjetos de expresión génica (por ejemplo, el portaobjetos 304 con sondas de captura con código de barras 306) cargado en el segundo miembro 410. Una porción inferior de la Figura 17B muestra una vista superior del portaobjetos 304. Como se muestra, el portaobjetos 304 incluye dos regiones de matriz con sondas de captura con código de barras 306A y 306B, respectivamente.

La Figura 17C representa el aparato de manipulación de muestras 400 con un portaobjetos de histología 303A y un portaobjetos de patología 303B cargado en los primeros miembros 404A y 404B, respectivamente. Como se muestra, el portaobjetos de histología 303A y el portaobjetos de patología 303B incluyen muestras de tejido 302A y 302B, respectivamente. Una porción inferior de la Figura 17C muestra una vista superior de una alineación inicial del portaobjetos de expresión génica 304 con el portaobjetos de histología 303A y el portaobjetos de patología 303B después de la carga.

Las Figuras 18A-18C representan un flujo de trabajo 1800 para alinear los portaobjetos cargados del aparato de manipulación de muestras 400. Las Figuras 18A-18C son similares y se adaptan de las Figuras 17A-17C y el flujo de trabajo 1800 pueden producirse después del flujo de trabajo 1700.

La Figura 18A muestra el aparato de manipulación de muestras 400 de la Figura 17C con el segundo miembro 410 se movió hacia arriba hacia los primeros miembros 404A y 404B. En algunos aspectos, acercar el segundo miembro 410 a los primeros miembros 404 puede hacer además que la alineación de las regiones deseadas de los portaobjetos 303 y 304 sea más fácil de lograr. El movimiento del segundo miembro 410 puede realizarse mediante un mecanismo de ajuste (por ejemplo, mecanismo de ajuste 415) del aparato de manipulación de muestras 400. La porción inferior de la Figura 18A muestra una vista superior de la alineación inicial de los portaobjetos 303A, 303B y 304. Como se muestra además, las muestras de tejido 302A y 302B incluyen regiones de interés 1802A y 1802B, respectivamente. Las regiones de interés 1802A y 1802B pueden seleccionarse por un usuario antes de cargar los portaobjetos 303 en el aparato de manipulación de muestras 400 o pueden determinarse después de la obtención de imágenes de las muestras de tejido 302A y 302B. En algunas modalidades, las regiones de interés 1802 pueden ser anotaciones que pueden aplicarse manualmente en el portaobjetos de histología 303A, el portaobjetos de patología 303B o el portaobjetos de matriz 304 por un usuario. Por ejemplo, el usuario puede anotar la región de interés 1802 en los portaobjetos mediante el uso de un marcador, un sello o una etiqueta adhesiva. En algunas modalidades, las regiones de interés 1802 pueden aplicarse manualmente en una imagen de las muestras de tejido 302A y/o 302B, o en una imagen de las muestras de tejido 302A o 302B que se han superpuesto con el portaobjetos de matriz 304 por un usuario.

En algunas modalidades, las regiones de interés 1802 pueden aplicarse automáticamente en el portaobjetos de histología 303A y/o el portaobjetos de patología 303B, o en el portaobjetos de matriz 304 en base a las entradas proporcionadas al aparato de manipulación de muestras 400 por un usuario. En algunas modalidades, las regiones de interés 1802 pueden seleccionarse y anotarse en una pantalla de un dispositivo informático acoplado al aparato de manipulación de muestras 400. En algunas modalidades, el aparato de manipulación de muestras 400 puede alinear el portaobjetos de histología 303A y/o el portaobjetos de patología 303B con el portaobjetos de matriz 304 en base a las regiones de interés seleccionadas 1802. En algunas modalidades, el aparato de manipulación de muestras 400 puede leer o determinar las anotaciones que marcan las regiones de interés 1802 mediante captura de imágenes, tal como mediante el uso del dispositivo de captura de imágenes 1720, y mediante el uso de técnicas de procesamiento de imágenes. En algunas modalidades, la anotación de las regiones de interés 1802 puede realizarse mediante una máquina dedicada, separada del aparato de manipulación de muestras 400, de manera que la máquina dedicada aplica las marcas de anotación al portaobjetos de histología 303A, el portaobjetos de patología 303B, o el portaobjetos de matriz 304 después de que el usuario ha seleccionado las regiones de interés 1802 a través de una interfaz

proporcionada con el aparato de manipulación de muestras 400. La Figura 18B representa una alineación del área de la sonda de captura con código de barras 306A con la región de interés de la muestra de tejido 1802A. La alineación puede producirse en un plano xy y al mover el primer miembro 404A en una dirección xy para alinear óptica y verticalmente las sondas de captura 306A con la región de interés 1802A. Por ejemplo, como se muestra en la porción inferior de la Figura 18B, la vista superior de los portaobjetos 303A y 304 muestra que las sondas de captura 306A se alinean con la región de interés 1802A de la muestra de tejido 302A (por ejemplo, líneas discontinuas). En algunos aspectos, el dispositivo de captura de imágenes 1720 puede ayudar en la alineación de los portaobjetos 303 y 304 al proporcionar imágenes de las sondas de captura 306A, la muestra 302A y/o la región de interés 1802A. En algunos aspectos, la precisión de alineación puede estar dentro de aproximadamente 0,1-0,5 mm. En algunas modalidades, la alineación automatizada descrita en la presente descripción puede permitir la precisión de la alineación dentro de 1-10 micras.

En algunos aspectos, el movimiento del primer miembro 404A puede realizarse mediante un mecanismo de alineación configurado para mover el portaobjetos 303A (por ejemplo, el primer sustrato 406, el primer sustrato 1406, o similares) a lo largo de un primer plano (por ejemplo, el plano xy del portaobjetos histológico 303A). En algunas implementaciones, el mecanismo de alineación puede configurarse para mover el portaobjetos de expresión génica 304 (por ejemplo, el segundo sustrato 412, el segundo sustrato 1412 o similares) a lo largo de un segundo plano (por ejemplo, el plano xy del portaobjetos 304).

La Figura 18C representa una alineación del área de la sonda de captura con código de barras 306B con la región de interés de la muestra de tejido 1802B. La alineación puede producirse en un plano xy y al mover el primer miembro 404B en una dirección xy para alinear óptica y verticalmente las sondas de captura 306B con la región de interés 1802B. Por ejemplo, como se muestra en la porción inferior de la Figura 18C, la vista superior de los portaobjetos 303B y 304 muestra que las sondas de captura 306B se alinean con la región de interés 1802B de la muestra de tejido 302B. En algunos aspectos, el dispositivo de captura de imágenes 1720 puede ayudar en la alineación de los portaobjetos 303 y 304 al proporcionar imágenes de las sondas de captura 306B, la muestra 302B y/o la región de interés 1802B.

En algunos aspectos, el movimiento del primer miembro 404B puede realizarse mediante un mecanismo de alineación configurado para mover el portaobjetos 303B (por ejemplo, el primer sustrato 406, el primer sustrato 1406, o similares) a lo largo de un primer plano (por ejemplo, el plano xy del portaobjetos 303B). En algunas implementaciones, el mecanismo de alineación puede configurarse para mover el portaobjetos de expresión génica 304 (por ejemplo, el segundo sustrato 412, el segundo sustrato 1412 o similares) a lo largo de un segundo plano (por ejemplo, el plano xy del portaobjetos 304).

La Figura 19 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 1900 para alinear un área de muestra con un área de matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. En 1910, un primer sustrato puede recibirse dentro de un primer mecanismo de retención de un aparato de manipulación de muestras, tal como aparatos de manipulación de muestras 400, 1400 o 3000. Un usuario puede proporcionar o colocar el primer sustrato dentro del primer mecanismo de retención del aparato de manipulación de muestras 400. El primer sustrato puede incluir una muestra aplicada al primer sustrato por un usuario. El primer sustrato también puede incluir un área de muestra en la que se va a colocar la muestra. El primer sustrato puede incluir además un indicador del área de muestra que identifica el área de la muestra. En algunas modalidades, el primer sustrato puede incluir una marca fiducial. El primer mecanismo de retención puede incluir uno o más miembros de resorte configurados para aplicar una fuerza al primer sustrato para mantener el contacto entre el primer sustrato y un primer miembro del aparato de manipulación de muestras 400 en el que se configura el primer mecanismo de retención.

En 1920, un segundo sustrato puede recibirse dentro de un segundo mecanismo de retención del aparato de manipulación de muestras 400. El segundo sustrato puede incluir una matriz del medio reactivo formado dentro de un indicador de área de matriz que identifica la matriz en el segundo sustrato. En algunas modalidades, el indicador del área de la matriz puede proporcionarse en el aparato de manipulación de muestras 400. Un usuario puede proporcionar o posicionar el segundo sustrato dentro del segundo mecanismo de retención del aparato de manipulación de muestras 400. El segundo mecanismo de retención puede incluir uno o más miembros de resorte configurados para aplicar una fuerza al segundo sustrato para mantener el contacto entre el segundo sustrato y un segundo miembro del portamuestras en el que se configura el segundo mecanismo de retención.

En 1930, una localización del primer sustrato puede ajustarse con relación al segundo sustrato para hacer además que toda o una porción del área de muestra del primer sustrato se alinee con el área de la matriz del segundo sustrato. En algunas modalidades, ajustar la localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato puede realizarse para hacer además que el indicador del área de muestra se alinee con el indicador del área de la matriz. En algunas modalidades, la localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato puede ajustarse por un usuario. Por ejemplo, el usuario puede manipular manualmente el primer miembro y/o el segundo miembro del portamuestras para ajustar una localización del primer sustrato y/o el segundo sustrato dentro del portamuestras para hacer además que el área de la muestra se alinee con el área de la matriz. En algunas modalidades, la localización del primer sustrato puede ajustarse con relación al segundo sustrato, que puede fijarse en su posición dentro del aparato de manipulación de muestras 400. En algunas modalidades, la localización del segundo sustrato puede ajustarse con relación al primer

sustrato, que puede fijarse en su posición dentro del aparato de manipulación de muestras 400. En algunas modalidades, el segundo sustrato puede fijarse en su lugar dentro del aparato de manipulación de muestras 400 y el primer mecanismo de retención puede ajustarse para hacer además que toda o una porción del área de muestra se alinee con el área de la matriz.

5 En algunas modalidades, un usuario puede ajustar la localización del primer sustrato y/o el segundo sustrato mientras ve el primer sustrato y/o el segundo sustrato dentro del aparato de manipulación de muestras 400. Por ejemplo, el usuario puede ver el primer sustrato y el segundo sustrato mediante un microscopio del instrumento configurado para proporcionar el portamuestras dentro de un campo de visión del microscopio. En algunas modalidades, el instrumento
10 puede incluir una pantalla que proporciona una vista del primer sustrato y del segundo sustrato dentro del aparato de manipulación de muestras.

15 En algunas modalidades, ajustar la localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato puede incluir además ver el primer sustrato y el segundo sustrato dentro del portamuestras y ajustar el primer mecanismo de retención y/o el segundo mecanismo de retención para hacer además que toda o una porción del área de muestra se alinee con el área de la matriz. De esta manera, el aparato de manipulación de muestras 400 puede soportar ventajosamente una alineación eficiente y precisa al proporcionar múltiples y diferentes formas de realizar la alineación. En algunas modalidades, el ajuste puede realizarse en ausencia de un indicador del área de muestra configurado en el primer sustrato y/o en ausencia de un indicador del área de la matriz configurado en el segundo
20 sustrato.

25 En algunas modalidades, la localización del primer sustrato y/o el segundo sustrato puede ajustarse dentro del portamuestras por un usuario que interactúa con un dispositivo de posicionamiento físico configurado en el aparato de manipulación de muestras 400, o en el instrumento mientras ve el primer sustrato y el segundo sustrato. El dispositivo de posicionamiento físico puede incluir un joy stick, una barra apuntadora, un botón o similares. En algunas modalidades, el instrumento puede configurarse con instrucciones legibles y ejecutables por ordenador almacenadas en una memoria del instrumento. Las instrucciones, cuando se ejecutan, pueden realizar el ajuste automáticamente en base a los datos de imagen asociados con el aparato de manipulación de muestras 400, el primer sustrato y/o el segundo sustrato. En algunas modalidades, el instrumento puede configurarse con una pantalla que proporciona una interfaz gráfica de usuario (GUI). Un usuario puede interactuar con la GUI para ajustar la localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato para hacer además que toda o una porción del indicador del área de muestra se alinee con respecto al indicador del área de la matriz.
30

35 La Figura 20 representa un flujo de trabajo 2000 para ajustar una localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato para alinear toda o una porción de un área de muestra con un área de matriz. Como se muestra en la Figura 20, y con referencia a la operación 1930 descrita en relación con la Figura 19, un primer sustrato 2005 puede incluir una muestra 2010 posicionada por un usuario dentro de un área de muestra 2015 identificada por un indicador del área de muestra 2020 del primer sustrato 2005. En algunas modalidades, el primer sustrato 2005 puede no incluir el indicador del área de muestra 2020. El segundo sustrato 2025 puede incluir uno o más indicadores del área de la matriz 2030 que indican una localización de un área de matriz 2035. Cada área de matriz 2035 puede incluir una matriz 2040 en la misma.
40

45 El aparato de manipulación de muestras 400 puede configurarse para permitir el ajuste del primer sustrato 2005 y/o el segundo sustrato 2025 a lo largo de un primer eje 2045 y un segundo eje 2050. El primer eje 2045 puede considerarse un eje posterior dentro de un plano transversal correspondiente a la superficie de montaje en la que el primer sustrato 2005 y el segundo sustrato 2025 se reciben dentro del aparato de manipulación de muestras 400. El segundo eje 2050 puede considerarse un eje longitudinal dentro del plano transversal correspondiente a la superficie de montaje en la que el primer sustrato 2005 y el segundo sustrato 2025 se reciben dentro del aparato de manipulación de muestras 400.
50

55 Como se muestra en la Figura 20, ajustar 2055 el primer sustrato 2005 con relación al segundo sustrato 2025 puede realizarse para hacer además que toda o una porción del área de muestra 2015 se alinee con el área de la matriz 2035. Alternativa o adicionalmente, el ajuste 2055 (por ejemplo, la operación 1930 de la Figura 19) puede provocar además que el indicador del área de muestra 2020 se alinee con respecto al indicador del área de la matriz 2030. De esta manera, el ajuste 2055 puede hacer además que la muestra 2010 se alinee con la matriz 2040.

60 Las Figuras 21A-21B representan un flujo de trabajo 2100 para ajustar una localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato en base a un indicador de área de matriz configurado dentro de un aparato de manipulación de muestras 400 de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. Como se muestra en la Figura 21A, un aparato de manipulación de muestras 400 puede incluir un mecanismo de retención 2105 configurado con una superficie 2110. La superficie 2110 puede incluir un indicador de área de matriz 2115 que identifica un área de matriz 2120. En algunas modalidades, parte o toda la superficie 2110 es transparente. En algunas modalidades, el indicador de área de matriz 2115 identifica la posición de una matriz en el segundo sustrato cuando el primer y segundo sustratos se introducen en una configuración de intercalado (por ejemplo, la configuración de intercalado representada en la Figura 3). El indicador de área de matriz 2115 puede configurarse en una primera superficie del mecanismo de retención 2105, por ejemplo, una primera superficie correspondiente a la superficie 2110. En algunas modalidades, el
65

5 indicador de área de matriz 2115 puede configurarse en una segunda superficie del mecanismo de retención 2105, la segunda superficie opuesta a la superficie 2110. En algunas modalidades, una porción del mecanismo de retención 2105 puede incluir la superficie 2110. En algunas modalidades, el indicador de área de matriz 2115 es transparente y puede retroiluminarse. En algunas modalidades, la superficie 2110 puede estar iluminada frontalmente en lugar de retroiluminada. En algunas modalidades, la superficie 2110 puede no incluir iluminación y puede iluminarse mediante iluminación ambiental.

10 Como se muestra en la Figura 21B, un primer sustrato 2125 que incluye una muestra 2130 posicionada dentro de un área de muestra 2135 puede recibirse dentro del mecanismo de retención 2105. Ajustar 2140 el sustrato 2125 con relación a la superficie transparente 2110 puede realizarse para hacer además que toda o una porción del área de muestra 2135 se alinee con el área de la matriz 2120. El primer y segundo sustratos pueden entonces llevarse a una configuración de intercalado (por ejemplo, la configuración de intercalado representada en la Figura 3) de manera que el área de la muestra 2135 se alinea a una matriz en el segundo sustrato.

15 Las Figuras 21C-21D representan un flujo de trabajo para ajustar una localización de múltiples primeros sustratos con relación al segundo sustrato en base a múltiples indicadores de área de matriz configurados dentro de un portamuestras de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. Como se muestra en la Figura 21C, un aparato de manipulación de muestras 400 puede incluir un mecanismo de retención 2145 configurado con una superficie 2150. La superficie 2150 puede incluir un primer indicador de área de matriz 2155 que identifica una primera
20 área de matriz 2160 y un segundo indicador de área de matriz 2165 que identifica una segunda área de matriz 2170. En algunas modalidades, parte de toda la superficie 2150 es transparente. En algunas modalidades, los indicadores del área de la matriz 2155 y 2165 identifican la posición de las matrices en el segundo sustrato cuando el primer y segundo sustratos se introducen en una configuración de intercalado (por ejemplo, la configuración de intercalado representada en la Figura 3). Los indicadores del área de la matriz 2155 y 2165 pueden configurarse en una primera
25 superficie del mecanismo de retención 2145, por ejemplo, una primera superficie correspondiente a la superficie 2150. En algunas modalidades, los indicadores del área de la matriz 2155 y 2165 pueden configurarse en una segunda superficie del mecanismo de retención 2145, la segunda superficie opuesta a la superficie 2150. Como se muestra en la Figura 21C, un primer sustrato 2125 que incluye una primera muestra 2130 posicionada dentro de un área de muestra 2135 puede recibirse dentro del mecanismo de retención 2145. Un segundo sustrato 2175 que incluye la
30 segunda muestra 2180 posicionada dentro de una segunda área de muestra 2185 también puede recibirse dentro del mecanismo de retención 2145.

35 Como se muestra en la Figura 21C y Figura 21D, ajustar 2190 el primer sustrato 2125 con relación a la superficie 2150 puede realizarse para hacer además que toda o una porción de la primera área de muestra 2135 se alinee con la primera área de matriz 2160. El segundo sustrato 2175 también puede ajustarse 2190 con relación a la superficie 2150 para hacer además que toda o una porción de la segunda área de muestra 2185 se alinee con la segunda área de matriz 2170. El primer sustrato 2125 y el segundo sustrato 2175 pueden entonces llevarse a la configuración de intercalado (por ejemplo, la configuración de intercalado representada en la Figura 3) de manera que la primera área de muestra 2135 se alinea a una matriz configurada dentro de la primera área de matriz 2160 y la segunda área de muestra 2185 se alinea a una matriz configurada dentro de la segunda área de matriz 2170.

45 Las Figuras 22A-22C representan un flujo de trabajo 2200 para indicar un área de muestra de un sustrato de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. El sustrato descrito con relación a las Figuras 22A-22C puede ser equivalente al primer sustrato descrito en relación con las Figuras 19 y 20. Para indicar un área de muestra de un sustrato sobre la cual se coloca una muestra puede considerarse una variedad de modalidades.

50 Como se muestra en la Figura 22A, un sustrato 2205 puede incluir un indicador del área de muestra 2210. El indicador del área de muestra 2210 puede proporcionarse por el fabricante del sustrato de manera que el indicador del área de muestra se proporciona sobre el sustrato 2205 antes de que un usuario coloque una muestra 2220 sobre el sustrato 2205. En algunas modalidades, el indicador del área de muestra 2210 puede aplicarse a un primer lado del sustrato 2205 antes de aplicar la muestra 2220 al primer lado del sustrato 2205. En algunas modalidades, el indicador del área de muestra 2210 puede aplicarse a un segundo lado del sustrato 2205. El segundo lado del sustrato 2205 puede ser opuesto al primer lado del sustrato 2205. En algunas modalidades, el indicador del área de muestra 2210 puede aplicarse al segundo lado del sustrato 2205 después de que la muestra 2220 se ha aplicado al primer lado del sustrato 2205.

60 Como se muestra adicionalmente en la Figura 22A, el sustrato 2205 puede incluir una marca fiducial 2215. La marca fiducial 2215 puede aplicarse al primer lado del sustrato 2205 o al segundo lado del sustrato 2205. La marca fiducial 2215 puede usarse para ayudar a alinear el área de la muestra sobre un primer sustrato 2205 con un área de matriz sobre un segundo sustrato, tal como el segundo sustrato 2025 descrito en relación con la Figura 20. La marca fiducial 2215 puede incluir una variedad de formas y formatos no limitantes, tales como marcas o grabados aplicados o incorporados de diversas formas, adecuados para proporcionar una referencia fiducial sobre el sustrato 2205.

65 Como se muestra en la Figura 22B, el indicador del área de muestra puede incluir un sello o una etiqueta adhesiva 2225. El sello o etiqueta adhesiva 2225 puede aplicarse al segundo lado del sustrato 2205 después de que un usuario haya aplicado la muestra 2220 al primer lado del sustrato 2205.

Como se muestra en la Figura 22C, el indicador del área de muestra puede aplicarse como un dibujo 2230 en el segundo lado del sustrato 2205 después de que la muestra 2220 se ha aplicado al primer lado del sustrato 2205 por un usuario. En algunas modalidades, el dibujo 2230 puede estirarse por un usuario con un marcador adecuado para marcar el sustrato 2205.

En algunas modalidades, pueden proporcionarse etiquetas informativas con guías impresas para ayudar a los usuarios en la colocación del tejido en los portaobjetos. Los marcadores fiduciales (por ejemplo, puntos, números y letras) pueden proporcionar una guía visual para la localización de la matriz impresa en el portaobjetos. Los puntos pueden indicar el centro de una matriz, mientras que los números y las letras pueden identificar pocillos individuales. En algunas modalidades, las etiquetas informativas con guías impresas reducen las manchas superficiales y reducen el contacto directo con las superficies del criostato actuando como una barrera física entre el portaobjetos y otras superficies. En algunas modalidades, las etiquetas informativas son desechables.

En algunas modalidades, las etiquetas informativas pueden ser transparentes. Las etiquetas informativas pueden tener guías impresas que se imprimen con tinta (por ejemplo, tinta blanca, tinta negra, tinta de color o tinta fluorescente). En algunas modalidades, las etiquetas informativas pueden imprimirse mediante el uso de impresión térmica que usa calor para transferir impresiones a la etiqueta informativa. En algunas modalidades, el grabado puede usarse para imprimir guías en la etiqueta informativa. La textura de la etiqueta informativa puede alterarse imprimiendo diferentes patrones en la superficie de la etiqueta informativa. En algunas modalidades, una etiqueta informativa tiene un acabado mate. En algunas modalidades, una etiqueta informativa tiene un acabado brillante. Las etiquetas informativas pueden tener agujeros o cortes en el interior de la etiqueta informativa. En algunas modalidades, una etiqueta informativa ocupa todo el mecanismo de retención y/o la superficie transparente sobre la cual pueden recibirse sustratos de muestra dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. En algunas modalidades, una etiqueta informativa ocupa una porción del mecanismo de retención y/o la superficie transparente del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. En algunas modalidades, una etiqueta informativa es capaz de tener conductividad térmica y eléctrica. En algunas modalidades, una etiqueta informativa es capaz de tener conductividad térmica. En algunas modalidades, una etiqueta informativa es capaz de ser conductora eléctrica. En algunas modalidades, una etiqueta informativa contiene metadatos. Los ejemplos no limitantes de metadatos incluyen guías de colocación de tejidos, identificación de matrices/pocillos, código de barras de identificación de portaobjetos, orientación de portaobjetos, fecha de caducidad, tipo de portaobjetos, dimensión de portaobjetos u otras instrucciones para el usuario. En algunas modalidades, podría usarse un accesorio para mantener el portaobjetos en su lugar para aplicar la etiqueta informativa y evitar daños al portaobjetos. El uso de tal accesorio para aplicar la etiqueta informativa puede reducir las manchas superficiales mientras se aplica la etiqueta informativa al portaobjetos.

La Figura 23 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 2300 para determinar automáticamente un indicador del área de muestra en base a una imagen recibida de la muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. El sistema, los métodos y los medios descritos en la presente descripción pueden configurarse para determinar un indicador del área de muestra en base a una imagen de una muestra. En 2310, una imagen de una muestra puede recibirse por un procesador de datos de un dispositivo informático acoplado comunicativamente a un aparato de manipulación de muestras 400. El aparato de manipulación de muestras 400 puede recibir y retener un sustrato que incluye la muestra en el mismo. El dispositivo informático puede acoplarse además comunicativamente a un dispositivo de captura de imágenes 1720, tal como un microscopio, una cámara, un sensor óptico, un dispositivo de obtención de imágenes, o similares configurados para adquirir y proporcionar una imagen de muestra al dispositivo informático. En algunas modalidades, el procesador de datos del dispositivo informático puede configurarse para recibir la imagen de muestra desde un procesador de datos de un dispositivo informático remoto acoplado comunicativamente al dispositivo informático en el que se realiza el proceso 2300.

En 2320, el procesador de datos puede proporcionar la imagen de muestra para su visualización a través de una pantalla del dispositivo informático. En algunas modalidades, la imagen de muestra puede proporcionarse para su visualización a través de una GUI configurada dentro de la visualización del dispositivo informático.

En 2330, el procesador de datos puede recibir una entrada que identifica el indicador del área de muestra en base a la imagen proporcionada. Por ejemplo, la pantalla del dispositivo informático puede incluir una pantalla táctil configurada para recibir una entrada del usuario que identifica el indicador del área de muestra en la imagen visualizada. En algunas modalidades, la GUI puede configurarse para recibir una entrada proporcionada por el usuario que identifica el indicador del área de muestra.

En 2340, el procesador de datos puede determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base a la imagen. El procesador de datos puede configurarse para acceder y ejecutar instrucciones legibles por ordenador y ejecutables configuradas para determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base a una variedad de características incluidas en la imagen. Por ejemplo, el procesador de datos puede determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base a un contorno del tejido presente dentro de la imagen. Este enfoque puede usarse cuando el área de la muestra es menor que el área de la matriz. En algunas modalidades, el procesador de datos puede determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base a un sello o una etiqueta adhesiva que es visible en la imagen y se aplicó al primer sustrato por un usuario. En algunas modalidades, el procesador de

datos puede determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base a una marca fiducial localizada en el primer sustrato que es visible en la imagen. En algunas modalidades, el procesador de datos puede determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base a un dibujo que es visible en la imagen y se aplicó al primer sustrato por un usuario.

5 En algunas modalidades, el procesador de datos puede acceder y ejecutar instrucciones ejecutables legibles por ordenador configuradas para determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base a los datos indicadores del área de la muestra que pueden almacenarse en una memoria del dispositivo informático. En algunas modalidades, los datos indicadores del área de la muestra pueden importarse al dispositivo informático desde un
10 segundo dispositivo informático que está remoto y acoplado comunicativamente al dispositivo informático que determina automáticamente el indicador del área de muestra asociado con la muestra en la imagen.

15 En algunas modalidades, el procesador de datos puede acceder y ejecutar instrucciones ejecutables legibles por ordenador configuradas para determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base al procesamiento de la imagen de muestra mediante el uso de la funcionalidad de segmentación de imagen. En algunas modalidades, el procesador de datos puede acceder y ejecutar instrucciones legibles por ordenador y ejecutables configuradas para determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base a un tipo de muestra, un tamaño de muestra, una forma de la muestra y/o un área de muestra.

20 Las Figuras 24A-24B representan un flujo de trabajo 2400 para recibir una entrada que identifica un indicador del área de muestra en base a una imagen de una muestra como se describe en relación con la operación 2330 de la Figura 23. Como se muestra en la Figura 24A, un dispositivo informático 2405 puede incluir una pantalla 2410. La pantalla 2410 puede configurarse para proporcionar una imagen 2415 de una muestra. Como se muestra en la Figura 24B, un usuario puede interactuar con la pantalla 2410 para proporcionar una entrada que identifica el indicador del área de muestra 2420. Por ejemplo, el usuario puede manipular un ratón u otro dispositivo de entrada en relación con la imagen 2415 de la muestra para proporcionar una entrada que identifique el indicador del área de muestra 2420. La entrada del usuario puede proporcionarse para seleccionar toda o una porción de la imagen 2415 para asociarse con el
25 indicador del área de muestra 2420. El usuario puede proporcionar la selección arrastrando un cursor 2425 sobre la imagen 2415 para formar el indicador del área de muestra 2420. En algunas modalidades, la entrada puede proporcionarse por un usuario que recorta la imagen 2415 de manera que el perímetro de la imagen recortada forme el indicador del área de muestra 2420.
30

La Figura 25 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 2500 para determinar automáticamente un indicador del área de muestra en base a una pluralidad de imágenes de vídeo recibidas de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. En 2510, un procesador de datos de un dispositivo informático acoplado comunicativamente a un aparato de manipulación de muestras 400 puede recibir una pluralidad de imágenes de vídeo. La pluralidad de imágenes de vídeo puede adquirirse y recibirse a través de un dispositivo de captura de imágenes 1720, tal como un microscopio, una cámara, un sensor óptico, un dispositivo de obtención de imágenes o similares, acoplado comunicativamente al procesador de datos. La pluralidad de imágenes de vídeo puede incluir la muestra posicionada sobre un primer sustrato y la matriz localizada sobre el segundo sustrato. La pluralidad de imágenes de vídeo puede incluir el segundo sustrato superpuesto sobre el primer sustrato. En algunas modalidades, el procesador de datos del dispositivo informático puede configurarse para recibir la imagen de muestra desde un procesador de datos de un dispositivo informático remoto acoplado comunicativamente al dispositivo informático en el que se realiza el proceso 2500.
35
40
45

En 2520, el procesador de datos puede proporcionar la pluralidad de imágenes de vídeo para visualizar a través de una pantalla del dispositivo informático. En algunas modalidades, la pluralidad de imágenes de vídeo puede proporcionarse para su visualización a través de una GUI configurada dentro de la visualización del dispositivo informático. En algunas modalidades, la pluralidad de imágenes de vídeo puede proporcionarse a un procesador de datos de un segundo dispositivo informático. El segundo dispositivo informático puede ser remoto del primer dispositivo informático y puede acoplarse comunicativamente al primer dispositivo informático en el que se recibió por primera vez la pluralidad de imágenes de vídeo. El segundo dispositivo informático puede configurarse para proporcionar la pluralidad de imágenes de vídeo para su visualización a través de una pantalla del segundo dispositivo informático. En algunas modalidades, el segundo dispositivo informático puede configurarse para recibir una entrada de un usuario que identifica un indicador del área de muestra asociado con la muestra posicionada en el primer sustrato. El usuario puede proporcionar la entrada que identifica el indicador del área de muestra al segundo dispositivo informático como se describió anteriormente.
50
55

En 2530, un usuario puede ajustar manualmente un primer mecanismo de retención del aparato de manipulación de muestras 400 para hacer además que el área de la muestra del primer sustrato se alinee con el área de la matriz del segundo sustrato. En algunas modalidades, el usuario puede ajustar el primer mecanismo de retención del aparato de manipulación de muestras 400 para hacer además que el área de la muestra del primer sustrato se alinee con un área de matriz configurada dentro del aparato de manipulación de muestras 400. El usuario puede ajustar el primer mecanismo de retención en base a la visualización de la pluralidad de imágenes de vídeo proporcionadas por el primer dispositivo informático o el segundo dispositivo informático.
60
65

En 2540, adicional o alternativamente, al ajuste manual realizado en 2530, el procesador de datos del primer dispositivo informático puede determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base a la pluralidad de imágenes de vídeo. El procesador de datos del primer dispositivo informático puede configurarse para acceder y ejecutar instrucciones ejecutables legibles por ordenador configuradas para determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base a una variedad de características incluidas en la pluralidad de imágenes de vídeo. Por ejemplo, el procesador de datos puede determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base a un contorno del tejido presente dentro de la pluralidad de imágenes de vídeo. Este enfoque puede usarse cuando el área de la muestra es menor que el área de la matriz. En algunas modalidades, el procesador de datos puede determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base a un sello o una etiqueta adhesiva que es visible en la pluralidad de imágenes de vídeo y se aplicó al primer sustrato por un usuario. En algunas modalidades, el procesador de datos puede determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base a una marca fiducial localizada en el primer sustrato que es visible en la pluralidad de imágenes de vídeo. En algunas modalidades, el procesador de datos puede determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base a un dibujo que es visible en la pluralidad de imágenes de vídeo y se aplicó al primer sustrato por un usuario.

En algunas modalidades, el procesador de datos puede acceder y ejecutar instrucciones ejecutables legibles por ordenador configuradas para determinar automáticamente el indicador del área de muestra en base a los datos indicadores del área de la muestra que pueden almacenarse en una memoria del dispositivo informático. En algunas modalidades, los datos indicadores del área de la muestra pueden importarse al dispositivo informático desde un segundo dispositivo informático que está remoto y acoplado comunicativamente al dispositivo informático que determina automáticamente el indicador del área de muestra asociado con la muestra en la pluralidad de imágenes de vídeo.

En 2550, el procesador de datos del primer dispositivo informático puede realizar el ajuste automáticamente en base al indicador del área de muestra determinado automáticamente. El dispositivo informático puede configurarse para ajustar automáticamente la localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato para hacer además que toda o una porción del área de muestra se alinee con un área de matriz del segundo sustrato mediante un controlador que puede acoplarse comunicativamente al aparato de manipulación de muestras 400 y al primer dispositivo informático. El controlador puede recibir señales de entrada del procesador de datos y puede generar señales de control que hacen que el primer mecanismo de retención o el segundo mecanismo de retención se trasladen dentro del aparato de manipulación de muestras 400 y allí ajustando la localización del primer sustrato o el segundo sustrato, respectivamente.

En algunas modalidades, el procesador de datos de un segundo dispositivo informático, acoplado comunicativamente al procesador de datos del primer dispositivo informático, puede acoplarse de manera similar al controlador y al aparato de manipulación de muestras 400. El procesador de datos del segundo dispositivo informático puede generar señales de entrada al controlador y puede hacer además que el controlador genere señales de control que provoquen que el primer mecanismo de retención o el segundo mecanismo de retención se trasladen dentro del aparato de manipulación de muestras 400. De esta manera, la localización del primer sustrato y/o el segundo sustrato puede controlarse y ajustarse de manera que el área de la muestra del primer sustrato puede alinearse con el área de la matriz del segundo sustrato.

La Figura 26 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 2600 para determinar automáticamente un indicador del área de muestra que responde a determinar un área de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. En 2610, un procesador de datos puede determinar un área de muestra con relación a un área de matriz, tal como durante la alineación del contorno de la muestra con el área de la matriz. Por ejemplo, el procesador de datos puede configurarse para determinar un área de muestra con relación a un área de matriz de manera automatizada. En algunas modalidades, el sustrato de la muestra se tomaría primero en imágenes y un contorno de la muestra podría determinarse mediante el uso de una tubería de procesamiento de imágenes configurada dentro del aparato de manipulación de muestras 400 o el procesador de datos. Si se determina que el tamaño de la muestra es mayor que el tamaño de la matriz, la tubería de procesamiento de imágenes puede anotar el área de la muestra objetivo con una anotación detectable en la tubería de procesamiento de imágenes.

En algunas modalidades, un usuario puede alinear manualmente el contorno de la muestra con el área de la matriz. Cuando el contorno no está claro, o la muestra es más grande, el sustrato de la muestra o el portaobjetos puede anotarse por un experto que indica el área de la muestra en el sustrato de la muestra con un marcador, un sello, una etiqueta adhesiva, o similares. En algunas modalidades, el aparato de manipulación de muestras 400 puede aplicar la anotación en base a las entradas proporcionadas por el usuario que identifican el área de la muestra o una región de interés en una pantalla del aparato de manipulación de muestras. En algunas modalidades, las entradas pueden proporcionarse al aparato de manipulación de muestras 400 o a un dispositivo informático acoplado comunicativamente al aparato de manipulación de muestras 400.

En 2620, el procesador de datos puede determinar automáticamente un indicador del área de muestra en el primer sustrato que responde a determinar que el área de la muestra es menor que el área de la matriz. Por ejemplo, después de que se obtienen imágenes del sustrato de la muestra y se determina el contorno de la muestra mediante el uso de

la tubería de procesamiento de imágenes, el contorno puede compararse con el área de la matriz para determinar que el área de la muestra es menor que el área de la matriz.

5 En 2630, el procesador de datos puede proporcionar el indicador del área de muestra como un contorno de la muestra. Por ejemplo, el indicador del área de muestra puede proporcionarse en una pantalla del dispositivo informático.

10 En 2640, el procesador de datos puede realizar el ajuste automáticamente en base al contorno de la muestra. Por ejemplo, el procesador de datos puede usar la tubería de procesamiento de imágenes del aparato de manipulación de muestras 400 para ajustarse al contorno dentro del área de la matriz. El aparato de manipulación de muestras 400 puede configurarse para proporcionar el accionamiento para provocar la alineación a través de uno o más accionadores. En algunas modalidades, la alineación podría ser con la propia matriz, con un contorno virtual proporcionado en una interfaz gráfica de usuario de una pantalla del aparato de manipulación de muestras 400, o con las marcas de referencia de alineación proporcionadas en el aparato de manipulación de muestras que indican dónde se localizará la matriz. Como se describió anteriormente, el procesador de datos del dispositivo informático puede
15 configurarse para ajustar automáticamente la localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato para hacer además que toda o una porción del área de muestra se alinee con un área de matriz del segundo sustrato a través de un controlador que puede acoplarse comunicativamente al aparato de manipulación de muestras 400 y al dispositivo informático. El controlador puede recibir señales de entrada del procesador de datos y puede generar señales de control que hacen que el primer mecanismo de retención o el segundo mecanismo de retención se
20 trasladen dentro del aparato de manipulación de muestras 400 y allí ajustando la localización del primer sustrato o el segundo sustrato, respectivamente.

25 La Figura 27 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 2700 para determinar una marca fiducial localizada en un primer sustrato de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. En 2710, un procesador de datos puede determinar una marca fiducial localizada en el primer sustrato. Las marcas fiduciales pueden determinarse mediante el uso de la visión informática y/o la funcionalidad de procesamiento de imágenes proporcionada en una tubería de procesamiento de imágenes configurada dentro del aparato de manipulación de muestras 400. El fiducial puede incluir un alto contraste o una marca de forma única para ayudar en la determinación del fiducial a través de la visión informática y/o la funcionalidad de procesamiento de imágenes proporcionada en una
30 tubería de procesamiento de imágenes, u otros métodos.

35 En 2720, el procesador de datos puede realizar el ajuste automáticamente en base a la marca fiducial determinada. Como se describió anteriormente, el procesador de datos del dispositivo informático puede configurarse para ajustar automáticamente la localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato para hacer además que toda o una porción del área de muestra se alinee con un área de matriz del segundo sustrato a través de un controlador que puede acoplarse comunicativamente al aparato de manipulación de muestras 400 y al dispositivo informático. En algunos aspectos, el ajuste puede basarse en la localización del fiducial determinado. Por ejemplo, el fiducial puede proporcionar un punto de referencia para alinear el primer sustrato con el segundo sustrato. El controlador puede recibir señales de entrada del procesador de datos y puede generar señales de control que hacen que el primer
40 mecanismo de retención o el segundo mecanismo de retención se trasladen dentro del aparato de manipulación de muestras 400 y allí ajustando la localización del primer sustrato o el segundo sustrato, respectivamente.

45 La Figura 28 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 2800 para identificar un indicador del área de muestra en base a una imagen de muestra registrada de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. En 2810, un procesador de datos de un primer dispositivo informático puede recibir una imagen de una muestra y un indicador del área de muestra de un segundo dispositivo informático acoplado comunicativamente al primer dispositivo informático.

50 En 2820, el procesador de datos del primer dispositivo informático puede registrar la imagen de recepción de la muestra y el indicador del área de muestra con al menos una imagen de vídeo de una pluralidad de imágenes de vídeo. La pluralidad de imágenes de vídeo puede adquirirse a través de un dispositivo de captura de imágenes 1720, tal como un microscopio, una cámara, un sensor óptico, un dispositivo de obtención de imágenes, o similares, acoplado comunicativamente al procesador de datos del primer dispositivo informático.

55 En 2830, el procesador de datos del primer dispositivo informático puede proporcionar, en base al registro de imagen, una imagen de muestra registrada a través de una pantalla del primer dispositivo informático. Por ejemplo, la imagen de muestra registrada puede proporcionarse en una pantalla del primer dispositivo informático.

60 En 2840, una entrada que identifica el indicador del área de muestra en la imagen de muestra registrada puede recibirse en el primer dispositivo informático. Por ejemplo, un usuario puede proporcionar una entrada a una GUI proporcionada en una pantalla del primer dispositivo informático. En algunas modalidades, la pantalla puede recibir la entrada directamente del usuario o a través de un dispositivo de entrada, tal como un ratón o un lápiz, acoplado a la pantalla.

65 En 2850, el procesador de datos puede realizar el ajuste automáticamente en base a la entrada recibida que identifica el indicador del área de muestra. El dispositivo informático puede configurarse para ajustar automáticamente la

localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato para hacer además que toda o una porción del área de muestra se alinee con un área de matriz del segundo sustrato mediante un controlador que puede acoplarse comunicativamente al aparato de manipulación de muestras 400 y al primer dispositivo informático. El controlador puede recibir señales de entrada del procesador de datos y puede generar señales de control que hacen que el primer mecanismo de retención o el segundo mecanismo de retención se trasladen dentro del aparato de manipulación de muestras 400 y allí ajustando la localización del primer sustrato o el segundo sustrato, respectivamente.

Las Figuras 29A-29C representan un flujo de trabajo 2900 para la permeabilización de una muestra (por ejemplo, muestra 302) del aparato de manipulación de muestras 400. Las Figuras 29A-29C son similares y se adaptan de las Figuras 18A-18C y el flujo de trabajo 2900 pueden producirse después del flujo de trabajo 1800. En algunas modalidades, el flujo de trabajo 2900 puede producirse después de uno o más del proceso 1900 descrito en relación con la Figura 19, el proceso 2300 descrito en relación con la Figura 23, el proceso 2500 descrito en relación con la Figura 25, el proceso 2700 descrito en relación con la Figura 27, y el proceso 2800 descrito en relación con la Figura 28.

Después de alinear los portaobjetos 303 y 304 (por ejemplo, como se muestra en la Figura 18C), puede añadirse una solución de permeabilización (por ejemplo, solución de permeabilización 305). La solución de permeabilización 305 puede crear un tampón de permeabilización en el intercalado (por ejemplo, dentro del espacio 307) que permeabiliza o digiere la muestra de tejido (por ejemplo, la muestra 302). Los analitos y/o transcritos de ARNm de la muestra de tejido 302 pueden liberarse, difundirse a través del espacio 307 hacia las sondas de captura 306, y unirse en las sondas de captura 306 (por ejemplo, como se muestra en la Figura 3).

Como se muestra en la Figura 29A, después de alinear los portaobjetos 303 y 304, el segundo miembro 410 puede bajarse para facilitar la adición de la solución de permeabilización 305. En algunas modalidades, la alineación de los portaobjetos 303 y 304 puede producirse cuando el segundo miembro 410 está en una posición bajada para facilitar añadir la solución de permeabilización 304.

La Figura 29B representa la solución de permeabilización 305 dispensada en el portaobjetos 304. Como se muestra, la solución de permeabilización se dispensa en dos volúmenes 305A y 305B localizados cerca de las sondas de captura 306A y 306B, respectivamente. En algunos aspectos, la solución de permeabilización 305 puede dispensarse manualmente por un usuario o automáticamente a través de un componente del aparato de manipulación de muestras 400.

La Figura 29C representa un intercalado formado por el portaobjetos 303, el portaobjetos 304 y la muestra 302. Durante el intercalado de los portaobjetos y la muestra, la solución de permeabilización 305 puede comenzar a digerir la muestra 302 y liberar analitos y/o transcritos de ARNm de la muestra 302 para su captura por las sondas de captura 306A y 306B. En algunos aspectos, el intercalado puede formarse al mover el segundo miembro 410 hacia arriba hacia de los primeros miembros 404A y 404B de manera que la muestra 302 entra en contacto con al menos una porción de la solución de permeabilización 305 y los portaobjetos 303 y 304 están dentro de una distancia umbral a lo largo de un eje ortogonal a los portaobjetos (por ejemplo, a lo largo de un eje z). El movimiento del segundo miembro 410 puede realizarse mediante un mecanismo de ajuste (por ejemplo, el mecanismo de ajuste 415) del aparato de manipulación de muestras 400.

IV. Dispositivos y métodos de registro de imágenes

La Figura 30 es un diagrama de un aparato de manipulación de muestras de ejemplo 3000 de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El aparato de manipulación de muestras 3000 es similar y se adapta del aparato de manipulación de muestras 400 de las Figuras 4-13C.

Como se muestra, el aparato de manipulación de muestras 3000 incluye un mecanismo de ajuste 415, una guía lineal 3016, una fuente de iluminación 3017 (por ejemplo, una fuente de transiluminación), uno o más calentadores 1108, primeros miembros 404A y 404B, portaobjetos de tejido 303A y 303B, muestras de tejido 302A y 302B, un portaobjetos de expresión génica 304 y el dispositivo de captura de imágenes 1720. En el ejemplo de la Figura 30, el mecanismo de ajuste 415 se configura para mover uno o más primeros miembros 404 a lo largo de un eje ortogonal a los primeros miembros 404 (por ejemplo, a lo largo de un eje z). La guía lineal 3016 puede ayudar en el movimiento del uno o más primeros miembros 404 a lo largo del eje. Como se muestra además, el dispositivo de captura de imágenes 1720 puede montarse en un transportador 3025 configurado para mover el dispositivo de captura de imágenes 1720 lateralmente desde una posición inferior al primer miembro 404A a una posición inferior al primer miembro 404B. El transportador 3025 puede permitir que el dispositivo de captura de imágenes 1720 capture imágenes de los tejidos 302A y 302B alineados con porciones del portaobjetos de expresión génica 304. En algunas modalidades, un segundo dispositivo de captura de imágenes 1720 puede proporcionarse dentro del aparato de manipulación de muestras 400. Las modalidades, que incluyen un segundo dispositivo de captura de imágenes 1720 pueden no incluir el transportador 3025 y, en cambio, el primer y segundo dispositivos de captura de imágenes pueden fijarse dentro del aparato de contención de muestras 400 en una posición adecuada para capturar datos de imagen asociados con la muestra de tejido 302A y 302B, respectivamente. La fuente de iluminación 3017 (por ejemplo, la fuente de transiluminación) puede facilitar la captura de imágenes de las porciones alineadas al proporcionar suficiente iluminación del área de captura

de imágenes. En algunas modalidades, la fuente de iluminación 3017 puede proporcionar luz roja, luz verde, luz azul o sus combinaciones.

En algunas modalidades, la fuente de iluminación 3017 puede proporcionar iluminación o luz verde, roja o azul (por ejemplo, RGB). Los diferentes colores de iluminación pueden seleccionarse para evitar que las marcas de anotación afecten el procesamiento de datos de imagen y los métodos de registro de imagen descritos en la presente descripción. Por ejemplo, puede usarse luz verde para la segmentación de tejidos con tinciones con eosina y se maximizará el contraste tisular. Las marcas de anotación, tales como las regiones de interés 1802 aplicadas por un usuario, no absorben luz verde y, por lo tanto, las marcas de anotación tendrán un contraste menor cuando se toman imágenes bajo luz verde.

En otro ejemplo, puede usarse luz roja para la detección fiducial con tinciones con eosina y se minimizará el contraste tisular. El marco fiducial puede ser visible en estas condiciones incluso cuando está cubierto por tejido. Las marcas fiduciales no absorben luz roja y, por lo tanto, las marcas fiduciales tendrán un menor contraste cuando se obtienen imágenes bajo luz roja. En otro ejemplo, puede usarse luz azul durante la alineación de la matriz ya que las marcas de anotación absorben luz azul y, por lo tanto, tienen un mayor contraste. El uso de luz azul durante la alineación puede mejorar por lo tanto la precisión de la alineación y los resultados de los métodos de registro de imagen.

Las Figuras 31A-31C representan un flujo de trabajo 3100 para la captura de imágenes de los portaobjetos intercalados del aparato de manipulación de muestras 400 durante una etapa de permeabilización de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Las Figuras 31A-31C son similares y se adaptan de las Figuras 29A-29C y el flujo de trabajo 3100 pueden producirse después del flujo de trabajo 2900. En algunas modalidades, el flujo de trabajo 3100 puede producirse después de uno o más del proceso 1900 descrito en relación con la Figura 19, el proceso 2300 descrito en relación con la Figura 23, el proceso 2500 descrito en relación con la Figura 25, el proceso 2700 descrito en relación con la Figura 27, y el proceso 2800 descrito en relación con la Figura 28.

Después de añadir la solución de permeabilización (por ejemplo, la solución de permeabilización 305) a los portaobjetos alineados, puede ser beneficioso capturar imágenes de la muestra de tejido alineada 302 y/o las sondas de captura con código de barras 306 para ayudar en el mapeo de expresiones génicas a localizaciones de la muestra de tejido 302. Como tal, el dispositivo de captura de imágenes 1720 puede configurarse para capturar imágenes de la muestra de tejido alineada 302, las regiones de interés 1802 y/o las sondas de captura con código de barras 306 durante una etapa de permeabilización.

La Figura 31A representa el dispositivo de captura de imágenes 1720 capturando una imagen de registro de la región de interés alineada 1802A y las sondas de captura 306A durante la permeabilización. La porción inferior de la Figura 31A muestra una imagen de registro de ejemplo 3121 capturada por el dispositivo de captura de imágenes 1720 de la muestra de tejido 302A. Como se muestra además, puede ser conveniente que una precisión de alineación de los portaobjetos 303 y 304 sea de menos de 10 micras. La imagen de registro 3121 puede registrar la alineación de cualquier fiducial en el portaobjetos de expresión génica 304 con respecto al tejido 302.

La Figura 31B representa el dispositivo de captura de imágenes 1720 capturando una segunda imagen de registro de la región de interés alineada 1802B con las sondas de captura 306B durante la permeabilización. La porción inferior de la Figura 31B muestra una segunda imagen de registro de ejemplo 3122 capturada por el dispositivo de captura de imágenes 1720 de la muestra de tejido 302B.

En algunos aspectos, la etapa de permeabilización puede producirse dentro de un minuto y puede ser beneficioso que el dispositivo de captura de imágenes 1720 se mueva rápidamente entre los diferentes portaobjetos intercalados y regiones de interés. Aunque se muestra un único dispositivo de captura de imágenes 1720, puede implementarse más de un dispositivo de captura de imágenes 1720.

La Figura 31C representa el aparato de manipulación de muestras 400 después de que se captura cualquier imagen de registro (por ejemplo, imágenes de registro 3121 y/o 3122) y puede completarse la etapa de permeabilización. Como se muestra, el intercalado puede abrirse y cualquiera de los portaobjetos 303 y 304 puede retirarse para lavarse o puede cargarse una solución de lavado en el instrumento para lavarse. Por ejemplo, el portaobjetos de expresión génica 303 puede retirarse para el lavado, la preparación de bibliotecas, la secuenciación génica, el registro de imágenes, el mapeo de expresión génica o similares.

En algunos aspectos, el intercalado puede abrirse al mover el segundo miembro 410 lejos de los primeros miembros 404, o viceversa. La abertura puede realizarse mediante el mecanismo de ajuste 415 del aparato de manipulación de muestras 400.

Aunque los flujos de trabajo 1700, 1800, 2900 y 3100 se muestran y describen con respecto al aparato de manipulación de muestras 400, los flujos de trabajo 1700, 1800, 2900 y 3100 también pueden realizarse con respecto al aparato de manipulación de muestras 1400, el aparato de manipulación de muestras 3000 u otro aparato de manipulación de muestras de acuerdo con las implementaciones descritas en la presente descripción. En algunas modalidades, los procesos 1900, 2300, 2500, 2700, 2800 y 3000 también pueden realizarse con respecto al aparato de manipulación

de muestras 1400, el aparato de manipulación de muestras 3000, u otro aparato de manipulación de muestras de acuerdo con las implementaciones descritas en la presente descripción.

Los procesos y flujos de trabajo espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) descritos en la presente descripción pueden configurarse para mostrar información de expresión génica sobre imágenes de muestra de alta resolución. Las localizaciones con código de barras dentro de una matriz de reactivos pueden capturar transcritos de una muestra que está en contacto con la matriz. Los transcritos capturados pueden usarse en el procesamiento posterior aguas abajo. La determinación de la localización de las localizaciones con código de barras de la matriz de reactivos con relación a la muestra puede realizarse mediante el uso de marcadores fiduciales colocados sobre un sustrato en el que se localiza la matriz de reactivos. Las localizaciones con código de barras pueden visualizarse con la muestra para generar datos espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) para la muestra.

La generación de datos de imagen adecuados para el análisis espacialómico (por ejemplo, transcriptómico espacial) puede verse afectada por la alineación relativa de una muestra con las regiones con código de barras de la matriz de reactivos. Las matrices de alta resolución para el análisis espacialómico (por ejemplo, transcriptómico espacial) pueden requerir la resolución de las localizaciones con código de barras inferidas superpuestas sobre una imagen de muestra de alta resolución para asociar apropiadamente los transcritos capturados con la célula particular de la que se originaron los transcritos. El aparato de manipulación de muestras 400 puede configurarse para realizar los procesos de registro de imágenes y flujos de trabajo descritos en la presente descripción para proporcionar un nivel de precisión para alinear la imagen de muestra y la imagen de la matriz dentro de +/- 1-5 micras, +/- 1-10 micras, +/- 1-20 micras o 1-30 +/- micras.

La Figura 32 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 3200 para generar una imagen alineada en base al registro de una imagen de muestra a una imagen de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. En 3210, los datos de imagen de muestra pueden recibirse por un procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400. En algunas modalidades, los datos de imagen de muestra pueden recibirse por el procesador de datos de un usuario. En algunas modalidades, los datos de imagen de muestra pueden recibirse por el procesador de datos desde un dispositivo informático que se localiza remotamente con relación al procesador de datos.

Los datos de imagen de muestra pueden incluir una imagen de muestra que tiene una primera resolución. Por ejemplo, la resolución de la imagen de muestra puede ser la resolución general de la imagen y puede basarse en el aumento, la abertura numérica, la resolución del sensor o dispositivo de captura en megapíxeles y la longitud de onda. Por ejemplo, un dispositivo de captura, tal como el dispositivo de captura de imágenes 1720 descrito en relación con las Figuras 17 y 30, puede configurarse para capturar una imagen de muestra a una resolución de 0,8 micras mediante el uso de un objetivo de 10x, una abertura numérica de 0,45 a una longitud de onda de 575 nanómetros. En algunas modalidades, el aparato de manipulación de muestras 400 puede configurarse para capturar una imagen de muestra que tiene una primera resolución. Por ejemplo, el aparato de muestra 400 puede configurarse para capturar la imagen de muestra que tiene la primera resolución a través de un módulo de obtención de imágenes de alta resolución configurado para modalidades de campo claro y/o fluorescencia. El módulo de obtención de imágenes de alta resolución puede incluir dispositivos de captura de imágenes con aumento de alta resolución. En algunas modalidades, el módulo de obtención de imágenes de alta resolución también puede incluir una etapa motorizada configurada para trasladarse a lo largo de planos horizontales y verticales (por ejemplo, planos xy) de manera que pueden capturarse múltiples imágenes de alta resolución para formar una única imagen grande. En algunas modalidades, la imagen de muestra que tiene la primera resolución puede capturarse mediante un sistema de obtención de imágenes externo al aparato de manipulación de muestras 400 y antes de usar el aparato de manipulación de muestras 400. Por ejemplo, un usuario puede utilizar un dispositivo y/o sistema de captura de imágenes que es remoto y externo del aparato de manipulación de muestras 400 para capturar la imagen de muestra antes de usar el aparato de manipulación de muestras 400 para realizar los procesos y flujos de trabajo del ensayo espacialómico (por ejemplo, transcriptómico espacial) descritos en la presente descripción. La imagen de muestra capturada de manera remota o externa de esta manera puede transmitirse al procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, donde puede recibirse para un procesamiento adicional como se describe en relación con la operación 3210.

En 3220, el procesador de datos puede recibir datos de imagen de la matriz que comprenden una imagen de la matriz. La imagen de la matriz puede comprender una superposición de una matriz, tal como una matriz de reactivos configurada con las localizaciones con códigos de barra, con la muestra. La imagen de la matriz también puede incluir un fiducial de la matriz. El fiducial de la matriz puede usarse para inferir la localización de la matriz y las localizaciones con código de barras dentro de la matriz de manera que las coordenadas de las localizaciones con código de barras puedan determinarse con relación al fiducial de la matriz. La imagen de la matriz puede tener una segunda resolución menor que la primera resolución de la imagen de muestra.

En 3230, el procesador de datos puede registrar la imagen de muestra con la imagen de la matriz alineando la imagen de muestra y la imagen de la matriz. El registro puede realizarse como un proceso de registro de imagen basado en intensidad mediante el uso de la información mutua (entropía) de Matte o una métrica diferencial media. El preprocesamiento puede realizarse en la imagen de muestra y la imagen de la matriz. El preprocesamiento puede incluir una resolución en forma de píxeles coincidente (muestreo ascendente), inversión de imagen especular y

rotación angular. Puede generarse una transformación de imagen inicial en base a un tipo de transformación inicial y una matriz de transformación inicial. El tipo de matriz de transformación inicial puede incluir una matriz de transformación de similitud basada en la traslación, rotación y escala. En algunas modalidades, la matriz de transformación inicial puede incluir una matriz de transformación afín basada en la traslación, rotación, escala y cizallamiento. La transformación de imagen inicial puede procesarse con respecto a una imagen móvil inicial mediante el uso de interpolación bilineal para generar una imagen móvil transformada. La imagen móvil transformada puede registrarse con una imagen fija para generar una métrica de registro, tal como una medida de la información mutua (entropía) de Matte o un valor métrico diferencial medio. El resultado puede proporcionarse a un optimizador para su comparación con valores umbral predeterminados. En base a la comparación, el registro puede continuar usando una nueva matriz de transformación o puede completarse para generar una imagen alineada y registrada. En algunas modalidades, la imagen de muestra puede incluir además un fiducial de la muestra y el registro puede incluir además alinear el fiducial de la matriz con el fiducial de la muestra.

En 3240, el procesador de datos puede generar la imagen alineada en base al registro realizado en 3230. La imagen alineada puede incluir una superposición de la imagen de muestra con la matriz. En algunas modalidades, la imagen alineada puede incluir el fiducial de la matriz alineada con la muestra.

En 3250, el procesador de datos puede proporcionar la imagen alineada. Por ejemplo, la imagen alineada puede proporcionarse mediante una pantalla del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 o 3000 descrito en la presente descripción.

Las Figuras 33A-33E representan un flujo de trabajo 3300 para registrar una imagen de muestra en una imagen de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. Los procesos y flujos de trabajo de registro de imágenes descritos en la presente descripción pueden mejorarse al alinear una muestra sobre un primer sustrato con una matriz de reactivos sobre un segundo sustrato. Para realizar el registro de alineación e imagen, pueden proporcionarse las coordenadas de las localizaciones con código de barras dentro de la matriz de reactivos y el tamaño de las localizaciones de reactivos con código de barras. En algunas modalidades, las coordenadas de las localizaciones con código de barras y el tamaño de las localizaciones con código de barras pueden proporcionarse por el fabricante del sustrato en el que se configura la matriz de reactivos. En algunas modalidades, las coordenadas de las localizaciones con código de barras y el tamaño de las localizaciones con código de barras pueden visualizarse y proporcionarse por el fabricante del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. En algunas modalidades, las coordenadas de las localizaciones con código de barras y el tamaño de las localizaciones con código de barras pueden visualizarse y proporcionarse por un usuario del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 antes de realizar ensayos espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales). Para realizar además el registro de alineación e imagen, puede proporcionarse una imagen de campo claro o fluorescencia de alta resolución de la muestra. La imagen de campo claro de alta resolución se puede registrar en una imagen de resolución inferior que comprende una superposición de las localizaciones con código de barras con la muestra.

Como se muestra en la Figura 33A, puede proporcionarse un sustrato o portaobjetos y puede incluir un fiducial de la matriz 3305 y una matriz de localizaciones con código de barras 3310. El fiducial de la matriz 3305 puede ser un sello o pegatina a microescala con características dimensionadas en micras. El diámetro de las localizaciones con código de barras 3310 puede estar entre 40-60 micras, tal como 55 micras. En algunas modalidades, el diámetro de las localizaciones con código de barras 3310 es menos de 40 micras, por ejemplo, menos de 10 micras, por ejemplo, aproximadamente 5 micras. En la Figura 33B, puede proporcionarse un sustrato o portaobjetos que incluye una muestra 3315. Un usuario puede proporcionar la muestra en el sustrato. La muestra puede proporcionarse en cualquier localización en el sustrato. En la Figura 33C, una imagen de alta resolución de la muestra 3315 puede capturarse a través de un dispositivo de captura de imágenes. La imagen de alta resolución puede incluir típicamente una imagen adecuada para resolver características histológicas y patológicas subcelulares. La imagen de alta resolución puede incluir imágenes que tienen una resolución de menos de 5-10 micras. El dispositivo de captura de imágenes puede configurarse para capturar imágenes a una resolución entre 1000 y 3000 píxeles. En la Figura 33D, el sustrato de muestra puede ponerse en contacto con el sustrato de la matriz dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 y el dispositivo de captura de imágenes 1720 puede capturar una imagen de baja resolución. La imagen de baja resolución puede incluir una superposición de la matriz de localizaciones con código de barras 3310 y la muestra 3315. La imagen de baja resolución también puede incluir el fiducial de la matriz 3305. La imagen de baja resolución puede incluir una imagen que tiene una resolución menor que la imagen de alta resolución descrita anteriormente (por ejemplo, una imagen que tiene una resolución mayor que 5-10 micras). En la Figura 33E, el registro de imagen puede realizarse entre la imagen de alta resolución de la muestra 3315 mostrada en la Figura 33C y la imagen de resolución inferior de la superposición de la matriz de las localizaciones con código de barras 3310 y la muestra 3315. El registro de imagen puede alinear el fiducial de la matriz 3305, tal como el centro del fiducial de la matriz 3305, con la imagen de baja resolución adquirida en la Figura 33D y la imagen de alta resolución adquirida en la Figura 33C puede alinearse con la imagen de baja resolución adquirida en la Figura 33D para generar la superposición de localizaciones con código de barras 3310 visualizadas sobre la imagen de alta resolución capturada en la Figura 33C.

Las Figuras 34A-34E representan un flujo de trabajo 3400 para registrar una imagen de muestra en una imagen de la matriz en base a la alineación de un fiducial de la muestra y un fiducial de la matriz de acuerdo con algunas

implementaciones del tema actual. En algunas modalidades, el fabricante del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 puede proporcionar un sustrato de muestra o portaobjetos además del sustrato de la matriz en el que se proporcionan las localizaciones del fiducial y con código de barras de la matriz. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 34A, el sustrato de la matriz puede incluir un fiducial de la matriz 3405 y localizaciones con código de barras 3410. En la Figura 34B, el sustrato de muestra o portaobjetos puede incluir un fiducial de la muestra 3415 y un indicador del área de muestra 3420. En la Figura 34C, un usuario puede proporcionar una muestra 3425 sobre el sustrato dentro del área de la muestra definida por el indicador del área de muestra 3420. En la Figura 34D, un dispositivo de captura de imágenes puede adquirir una imagen de alta resolución de la muestra 3425 y el fiducial de la muestra 3415. En algunas modalidades, la imagen de alta resolución puede adquirirse antes de que el sustrato de muestra se reciba dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. Una vez que se recibe el sustrato de muestra, el sustrato de muestra y el sustrato de la matriz pueden ponerse en contacto dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 y el dispositivo de captura de imágenes 1720 puede adquirir una imagen de baja resolución que incluye el fiducial de matriz 3405 alineado con el fiducial de la muestra 3415 como se muestra en la Figura 34E. La alineación del fiducial de la matriz 3405 con el fiducial de la muestra 3415 puede usarse para generar una superposición de la matriz 3430 de localizaciones con código de barras 3410 sobre la imagen de alta resolución de la muestra capturada en la Figura 34D.

Las Figuras 35A-35E representan un flujo de trabajo 3500 para registrar una imagen de muestra a una imagen de la matriz en base a la alineación de un fiducial de la muestra proporcionado por el usuario o proporcionado por el sistema y un fiducial de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. En algunas modalidades, el usuario del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 o el propio aparato de manipulación de muestras puede proporcionar un fiducial de la muestra sobre un sustrato o portaobjetos destinado para su uso como un sustrato o portaobjetos de muestra. En tales modalidades, cualquier sustrato o portaobjetos puede usarse como el sustrato o portaobjetos de muestra para la alineación y el registro de imagen. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 35A, el sustrato de la matriz puede incluir un fiducial de la matriz 3505 y localizaciones con código de barras 3510. En la Figura 35B, un usuario puede proporcionar un sustrato o portaobjetos de muestra y la muestra 3515 puede colocarse en cualquier lugar del sustrato o portaobjetos de muestra proporcionado por el usuario. En la Figura 35C, los usuarios o el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 pueden proporcionar un fiducial de la muestra 3520 y/o un indicador del área de muestra 3525 al sustrato de muestra proporcionado por el usuario o portaobjetos en el que se colocó la muestra 3515. En algunas modalidades, el fiducial de la muestra proporcionado por el usuario 3520 y/o el indicador del área de muestra proporcionado por el usuario 3525 pueden incluir un sello o una etiqueta adhesiva aplicada al sustrato de muestra o portaobjetos. En algunas modalidades, el fiducial de la muestra 3520 y/o el indicador del área de muestra proporcionado por el usuario 3525 pueden ser una marca en el instrumento de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. La marca del instrumento puede ser una marca de alto contraste que incluye accesos para identificar fácilmente el centro de la marca. En 35D, una imagen de alta resolución de la muestra 3515, el fiducial de la muestra 3520, y el indicador del área de muestra 3525 (si se proporciona) pueden adquirirse mediante el uso del dispositivo de captura de imágenes. En algunas modalidades, la imagen de alta resolución puede adquirirse antes de que el sustrato de muestra se reciba dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. El sustrato de muestra y el sustrato de la matriz pueden ponerse en contacto dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 y el dispositivo de captura de imágenes 1720 puede adquirir una imagen de baja resolución que incluye el fiducial de matriz 3505 alineado con el fiducial de la muestra 3520 como se muestra en la Figura 35E. La alineación del fiducial de la matriz 3505 con el fiducial de la muestra 3520 puede usarse para generar una superposición de la matriz 3530 de localizaciones con código de barras 3510 sobre la imagen de alta resolución de la muestra capturada en la Figura 34D.

Las Figuras 36A-36B representan un flujo de trabajo 3600 para registrar una imagen de muestra en una imagen de la matriz basada en alinear un borde de un sustrato de muestra y un fiducial de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. En algunas modalidades, la alineación y el registro de imagen pueden realizarse mediante el uso de un borde de un sustrato o portaobjetos proporcionados por el usuario o fiducial de la muestra. En tales modalidades, cualquier sustrato o portaobjetos puede usarse como el sustrato o portaobjetos de muestra para la alineación y el registro de imagen. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 36A, una muestra 3610 puede colocarse en cualquier localización sobre un sustrato o portaobjetos. Un borde 3605 del sustrato o portaobjetos puede usarse como un fiducial de la muestra. Una imagen de alta resolución de la muestra y el borde 3605 puede capturarse a través del dispositivo de captura de imágenes. En algunas modalidades, la imagen de alta resolución puede adquirirse antes de que el sustrato de muestra se reciba dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. En algunas modalidades, la imagen de alta resolución puede adquirirse mediante el uso de macros o software de adquisición/procesamiento de imágenes configurado para capturar el borde 3605 dentro de la imagen de alta resolución. Una vez que se recibe el sustrato de muestra, el sustrato de muestra y el sustrato de la matriz pueden ponerse en contacto dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 y el dispositivo de captura de imágenes 1720 puede adquirir una imagen de baja resolución que incluye el fiducial de matriz 3615 alineado con el borde 3605 como se muestra en la Figura 36B. La alineación del fiducial de la matriz 3615 con el borde 3605 como el fiducial de la muestra puede usarse para generar una superposición de la matriz 3620 de localizaciones con código de barras sobre la imagen de alta resolución de la muestra capturada en la Figura 36A.

Las Figuras 37A-37D son diagramas que ilustran modalidades de fiduciales de las muestras de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. Se puede contemplar una variedad de tamaños, formas y configuraciones de

indicadores de fiduciales de las muestras y del área de la muestra no limitantes para su uso con el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 sin desviarse del uso previsto de los indicadores de fiduciales de las muestras y/o del área de la muestra descritos en la presente descripción. Los tamaños, formas y configuraciones variables de los indicadores de fiduciales de las muestras y/o del área de la muestra pueden proporcionarse para acomodar tamaños variables de muestras. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 37A, el fiducial de la muestra 3705A puede posicionarse con relación a un indicador del área de muestra 3710 proporcionado como una línea discontinua de forma cuadrada. En algunas modalidades, pueden proporcionarse múltiples muestras fiduciales en el sustrato de muestra o portaobjetos como se muestra mediante la inclusión de un segundo fiducial de la muestra 3705B. En algunas modalidades, el indicador del área de muestra 3710 puede incluir una forma cuadrada, una forma rectangular, una forma circular, una forma ovalada o similares. El fiducial de la muestra 3705 puede posicionarse en una variedad de localizaciones no limitantes en o alrededor del indicador del área de muestra 3710. Como se muestra en la Figura 37B, la forma del indicador del área de muestra 3710 puede ser una línea discontinua de forma rectangular. Como se muestra en la Figura 37C, el fiducial de la muestra 3720 puede configurarse dentro del indicador del área de muestra 3725. El indicador del área de muestra 3725 puede incluir una forma cuadrada proporcionada como una línea sólida gruesa. En la Figura 37D, el indicador del área de muestra 3730 puede proporcionarse como una línea sólida de forma rectangular y el fiducial de la muestra 3720 puede proporcionarse dentro del indicador del área de muestra 3730.

Las Figuras 38A-38C son diagramas que ilustran modalidades de un fiducial de la muestra configurado en una parte trasera de un sustrato de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. Proporcionar un fiducial de la muestra en una superficie trasera de un sustrato de muestra o portaobjetos puede permitir que el fiducial de la muestra se coloque en cualquier lugar del sustrato de muestra o portaobjetos, incluida una localización que está dentro de una localización de la muestra. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 38A, puede proporcionarse un sustrato de muestra o portaobjetos y puede colocarse una muestra 3805 sobre una superficie del sustrato. En la Figura 38B, un fiducial de la muestra 3810 puede colocarse en una superficie opuesta del sustrato de muestra en el que se aplicó la muestra 3805 en la Figura 38A. En la Figura 38C, puede verse una sección transversal del sustrato de muestra o portaobjetos para indicar además la colocación de la muestra 3805 en un lado de tejido o muestra del sustrato de muestra y la colocación del fiducial de la muestra 3810 en un lado fiducial del sustrato de muestra o portaobjetos. El lado fiducial puede ser opuesto al lado de tejido o muestra del sustrato o portaobjetos en el que se localiza la muestra 3805.

Un dispositivo de captura de imágenes del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 puede configurarse para capturar imágenes de alta resolución de manera que una imagen de sustrato de muestra y una imagen de sustrato de la matriz pueden capturarse en dos puntos focales diferentes mientras se mantiene fija la localización xy. Para capturar la muestra y el fiducial de la muestra en la imagen de baja resolución con el mismo enfoque, el dispositivo de captura de imágenes 1720 puede configurarse con una lente de objeto de bajo aumento con una apertura numérica establecida en 0,02. Este ajuste puede proporcionar una profundidad de campo de 1,5 mm que es mayor que un grosor del sustrato de muestra o portaobjetos (~ 1 mm). En algunas modalidades, el fiducial de la muestra 3810 puede ser un fiducial de la muestra opaca o transparente, tal como cuando se captura la imagen de alta resolución antes de poner en contacto el sustrato de la muestra con el sustrato de la matriz dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000.

Las Figuras 39A-39E son diagramas que ilustran modalidades de configuraciones de fiduciales de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. Similar a la colocación del fiducial de la muestra en el sustrato de muestra o portaobjetos, puede proporcionarse un fiducial de la matriz en una variedad de localizaciones no limitantes en el sustrato o portaobjetos de la matriz sin desviarse del uso previsto del fiducial de la matriz y/o la matriz como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 39A, un sustrato o portaobjetos de la matriz puede incluir un fiducial de la matriz 3905 localizado con relación a la matriz 3910 de localizaciones con códigos de barra. El fiducial de la matriz 3905 puede localizarse junto a o cerca de la matriz 3910. Como se muestra en la Figura 39B, el fiducial de la matriz 3905 puede localizarse dentro de un área de matriz 3910. Como se muestra en la Figura 39C, pueden localizarse múltiples fiduciales de la matriz 3905A y 3905B en el sustrato de la matriz o deslizarse cerca de o próximo a la matriz 3910. En algunas modalidades, pueden localizarse múltiples fiduciales de la matriz 3905 dentro de un área de matriz 3910. Como se muestra en la Figura 39D, el fiducial de la matriz 3905 puede localizarse en una superficie trasera del sustrato o portaobjetos de la matriz que está opuesto al lado en el que se localiza la matriz 3910. Como se muestra en la Figura 39E, el fiducial de la matriz 3905 puede localizarse en el mismo lado del sustrato o portaobjetos de la matriz que la matriz 3910.

Las Figuras 40A-40C son diagramas que ilustran modalidades de localizaciones en las que una imagen de baja resolución que incluye una matriz superpuesta a una muestra puede capturarse para registrar una imagen de muestra en una imagen de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. La imagen de baja resolución descrita en relación con la operación 3220 de la Figura 32 por el dispositivo de captura de imágenes 1720 puede capturarse en, cerca o lejos de un área en la que la muestra y la matriz se solapan en dependencia de la localización del fiducial de la muestra y el fiducial de la matriz. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 40A, la imagen de baja resolución puede capturarse por el dispositivo de captura de imágenes 1720 en una localización 4005 en la que al menos una porción de la muestra 4010 y la matriz 4015 se solapan. Como se muestra en la Figura 40B, la imagen de baja resolución puede capturarse por el dispositivo de captura de imágenes 1720 en una localización 4020 en la que

la muestra 4010 y la matriz 4015 se solapan más completamente. Como se muestra en la Figura 40C, la imagen de baja resolución puede capturarse por el dispositivo de captura de imágenes 1720 en una localización 4025 en la que el fiducial de la matriz 4030 se alinea con o está cerca del fiducial de la muestra 4035.

5 La Figura 41 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 4100 para generar una imagen alineada en base al registro de una imagen de muestra a una imagen de la matriz mediante el uso de múltiples fiduciales del instrumento de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. En algunas modalidades, tales como las descritas en relación con la Figura 21, el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 puede incluir uno o más fiduciales del instrumento. Los fiduciales del instrumento pueden proporcionarse sobre una superficie transparente del aparato de manipulación de muestras descrito en la presente descripción. El registro de imagen puede realizarse para proporcionar una imagen alineada que incluye la muestra alineada con la matriz mediante el uso de los fiduciales del instrumento.

15 En 4110, un procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 puede recibir datos de imagen de muestra que comprenden una imagen de muestra de una muestra y un fiducial de la muestra. La misma imagen puede tener una primera resolución. Los datos de imagen de muestra pueden recibirse de acuerdo con la operación 3210 de la Figura 32. En 4120, el procesador de datos puede recibir datos fiduciales del instrumento que comprenden una imagen fiducial del instrumento de un primer fiducial del instrumento y un segundo fiducial del instrumento. Los fiduciales del instrumento pueden incluir una variedad de tamaños, formas y configuraciones no limitantes en una superficie de montaje o visualización adecuada del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 como se describe en relación con la Figura 30.

25 En 4130, el procesador de datos puede recibir datos de imagen de la matriz que comprenden una imagen de la matriz que tiene una segunda resolución que es menor que la primera resolución de la imagen de muestra. La imagen de la matriz puede incluir una matriz y un fiducial de la matriz superpuesto sobre la muestra y el fiducial de la muestra. Los datos de imagen de la matriz pueden recibirse de acuerdo con la operación 3220 de la Figura 32. En 4140, el procesador de datos puede registrar la imagen fiducial del instrumento con la imagen de la matriz basándose en la alineación del primer fiducial del instrumento y el fiducial de la matriz. El registro puede realizarse de manera análoga al registro descrito en relación con la operación 3230 de la Figura 32, excepto que el registro se realiza al registrar la imagen fiducial del instrumento con la imagen de la matriz en base a la alineación del primer fiducial del instrumento y el fiducial de la matriz. En 4150, el procesador de datos puede registrar la imagen fiducial del instrumento con la imagen de muestra alineando el segundo fiducial del instrumento y el fiducial de la muestra. El registro puede realizarse de manera análoga al registro descrito en relación con la operación 3230 de la Figura 32, excepto que el registro se realiza al registrar la imagen fiducial del instrumento con la imagen de muestra en base a la alineación del segundo fiducial del instrumento y el fiducial de la muestra.

40 En 4160, el procesador de datos puede generar una imagen alineada en base al registro de la imagen fiducial del instrumento a la imagen de la matriz y el registro del fiducial del instrumento a la imagen de muestra. En 4170, el procesador de datos puede proporcionar la imagen alineada. Por ejemplo, el procesador de datos puede proporcionar la imagen alineada mediante una pantalla del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000.

45 La Figura 42 representa un flujo de trabajo 4200 para generar una imagen alineada en base al registro de una imagen de muestra a una imagen de la matriz mediante el uso de múltiples fiduciales del instrumento de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. Como se muestra en la Figura 42A, el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 puede incluir una superficie de visualización o montaje transparente 4205 configurada con un primer fiducial del instrumento 4210 y un segundo fiducial del instrumento 4215. Como se muestra en la Figura 42B, un sustrato o portaobjetos de la matriz puede incluir un fiducial de la matriz 4220 y una matriz 4225. Como se muestra en la Figura 42C, un sustrato de muestra o portaobjetos puede incluir un fiducial de la muestra 4230 y una muestra 4235. Como se muestra en la Figura 42D, el sustrato de la matriz que incluye el fiducial de la matriz 4220 puede alinearse con el primer fiducial del instrumento 4210 y el fiducial de la muestra 4230 puede alinearse con el segundo fiducial del instrumento 4215. El sustrato de muestra y el sustrato de la matriz pueden ponerse en contacto dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 y el dispositivo de captura de imágenes 1720 puede adquirir múltiples imágenes de baja resolución. Se puede capturar una primera imagen de baja resolución en base a la alineación del primer fiducial del instrumento 4210 con el conjunto fiducial 4220. Puede capturarse una segunda imagen de baja resolución en base a la alineación del segundo fiducial del instrumento 4215 con el fiducial de la muestra 4230. Las coordenadas conocidas de las localizaciones con código de barras dentro de la matriz 4225 con relación al fiducial de la matriz 4225, la localización conocida de la muestra 4235 con relación al fiducial de la muestra 4230, y la localización conocida del primer fiducial del instrumento 4210 con relación al segundo fiducial del instrumento 4215 pueden usarse con la imagen de muestra recibida en la operación 4110 de la Figura 41 y la imagen de la matriz recibida en la operación 4130 de la Figura 41 para alinear la matriz 4225 con la muestra 4235.

65 El aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 descrito en la presente descripción puede configurarse para realizar registros de imagen para imágenes de muestra que incluyen múltiples imágenes de la porción de muestra que pueden coserse entre sí. Cuando la imagen de alta resolución de la muestra se recoge a un gran aumento, se obtiene típicamente mediante el uso de imágenes de múltiples campos visuales de la muestra. Las costuras de imagen pueden provocar artefactos de costuras. Los artefactos de costuras pueden generar errores durante el registro de la imagen

al alinear la imagen de resolución inferior, que puede ser una imagen de resolución inferior sin coser de la matriz superpuesta sobre la muestra, y la imagen cosida de mayor resolución de la muestra.

5 Las Figuras 43A-43B ilustran artefactos de costuras que pueden estar presentes dentro de imágenes cosidas que incluyen una pluralidad de porciones individuales de imagen. Los artefactos de costuras pueden estar presentes en imágenes de muestra de alta resolución que incluyen una pluralidad de imágenes de la porción de muestra, y también pueden estar presentes en imágenes de matriz de baja resolución que incluyen una pluralidad de imágenes de la porción de matriz que capturan una o más porciones de una superposición de una matriz con la muestra. Los artefactos de costura pueden estar presentes para elementos horizontales, verticales y curvos presentes dentro de una imagen de alta resolución cosida. Como se muestra en la Figura 43A, una imagen de alta resolución cosida 4305 puede adquirirse de un objetivo óptico 4310 de patrones repetidos de marcas objetivo ópticas de diferentes formas, tales como marcas pequeñas y grandes de forma circular, marcas de forma transversal y marcas de forma numeral. Por ejemplo, la imagen de alta resolución cosida 4305 puede adquirirse con un aumento de 10x mediante el uso de un dispositivo de captura de imágenes, tal como un microscopio, configurado con una resolución de 150 megapíxeles. La funcionalidad de obtención de imágenes asociada con el microscopio puede unir automáticamente la obtención de imágenes para construir una imagen compuesta más grande (por ejemplo, la imagen 4305). Como se muestra en la Figura 43A, la imagen de alta resolución cosida 4305 puede incluir una única matriz que es de 9 mm por 9 mm de tamaño y se compone de 81 imágenes de porciones individuales que son cada una de 1 mm por 1 mm de tamaño. La imagen de muestra de alta resolución cosida 4305 puede incluir las marcas de plantilla del objetivo óptico cosida 4310. Como se muestra en 4315, los artefactos de costuras pueden incluir desalineación vertical de una primera marca de plantilla en forma de cruz que se produce a través de un límite de costuras horizontales entre dos de las imágenes de porciones individuales que abarca la marca de plantilla en forma de cruz. Como se muestra en 4320, los artefactos de costuras pueden incluir desalineación horizontal de la marca de plantilla en forma de cruz que se produce a través de un límite de costuras verticales entre dos de las imágenes de porciones individuales que abarca una segunda marca de plantilla en forma de cruz. Como se muestra en 4315, los artefactos de costuras pueden incluir desalineación de una característica curvada de una pequeña marca de plantilla de forma circular que se produce a través de un límite de costuras horizontales entre dos de las imágenes de porciones individuales que abarca la pequeña marca de plantilla de forma circular. Como se muestra en 4330 de la Figura 43B, los artefactos de costuras pueden incluir desalineación de una característica curva de una marca de plantilla grande de forma circular que se produce a través de un límite de costuras horizontales entre dos de las imágenes de porciones individuales que abarca la marca de plantilla grande de forma circular. Como se muestra en 4335, los artefactos de costuras pueden incluir desalineación de una característica curva de una pequeña marca de plantilla de forma circular que se produce en un límite interseccional de cuatro imágenes de porciones individuales. Como se muestra en 4340, los artefactos de costuras pueden incluir desalineación de una característica curva de una pequeña marca de plantilla de forma circular que se produce cerca de un límite de intersección de cuatro imágenes de porciones individuales.

40 Para mitigar y corregir los errores de registro de la imagen debido a los artefactos de costuras, el registro de la imagen puede realizarse mediante el uso de porciones de la imagen de muestra de alta resolución y el registro de las porciones de la imagen de muestra en toda la imagen de resolución inferior. Los errores de costuras también pueden causar errores de registro locales. Para mitigar y corregir los errores de costuras locales, los procesos de registro de imágenes y flujos de trabajo descritos en la presente descripción pueden realizarse mediante el uso de subimágenes locales de la imagen cosida de alta resolución. De esta manera, los errores de registro debidos a artefactos de costuras pueden mitigarse y eliminarse.

La Figura 44 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 4400 para registrar imágenes de la porción de muestra de una imagen de muestra a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. En algunas modalidades, la imagen de muestra de alta resolución puede incluir múltiples imágenes de la porción de muestra que se cosen entre sí para formar la imagen de muestra. Cada una de las imágenes de la porción de muestra puede asociarse con una porción de la muestra. En algunas modalidades, cada una de las imágenes de la porción de muestra puede dimensionarse de manera que el tamaño de cada imagen de la porción de muestra es menor que el tamaño de un campo de visión único de la imagen de muestra. De esta manera, se pueden corregir los errores de registro de localización debido a artefactos de costuras. Como se muestra en la Figura 44, en 4410 el procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 puede recortar la imagen de muestra de alta resolución para determinar una pluralidad de imágenes de la porción de muestra. La imagen de muestra de alta resolución se puede recortar para determinar la pluralidad de imágenes de la porción de muestra mediante el uso de la visión informática y/o la funcionalidad de procesamiento de imágenes proporcionada en una tubería de procesamiento de imágenes configurada dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. En 4420, el procesador de datos puede registrar una o más de las imágenes de la porción de muestra en la imagen de muestra de alta resolución a una porción correspondiente de la muestra en la imagen de la matriz de baja resolución. En algunas modalidades, el registro de la una o más imágenes de la porción de muestra en una porción correspondiente de la muestra en la imagen de la matriz puede realizarse después de registrar inicialmente la imagen de muestra en la imagen de la matriz en una operación de prealineación. La Figura 45 representa un flujo de trabajo 4500 para registrar imágenes de la porción de muestra de una imagen de muestra a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de la matriz de acuerdo con algunas

implementaciones del tema actual. Una imagen de muestra cosida de alta resolución 4405 puede recibirse por un procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000, tal como el procesador de datos 5320 descrito en relación con la Figura 53. En algunas modalidades, el procesador de datos puede ser remoto o externo al aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 y puede configurarse con las tuberías de procesamiento de imágenes y la funcionalidad descritas en la presente descripción. En tales modalidades, los datos de imagen capturados mediante el uso del aparato de manipulación de muestras pueden proporcionarse al procesador de datos configurado remoto o externamente mediante una conexión USB o de red. En algunas modalidades, la imagen de muestra cosida de alta resolución 4505 puede incluir una superposición de la matriz con la muestra y un fiducial de la matriz. Una imagen de muestra de baja resolución 4510 que incluye un campo de visión único de la muestra también puede recibirse por el procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. Una imagen de alineación inicial 4515 puede generarse a través de una operación de registro de imagen completa global que registra la imagen de muestra cosida de alta resolución 4505 a la imagen de muestra de resolución inferior. En algunas modalidades, puede que no sea necesario generar la imagen de alineación inicial 4515. En algunas modalidades, antes de generar la imagen de alineación inicial 4515, el sustrato de muestra y el sustrato de la matriz pueden alinearse manual o automáticamente por el procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. Esta alineación preliminar puede realizarse para especificar las condiciones iniciales de los métodos de registro de imágenes descritos en la presente descripción.

La imagen de muestra cosida de alta resolución 4505 se puede coser para determinar una pluralidad de imágenes de la porción de muestra 4520. La pluralidad de imágenes de la porción de muestra 4520 puede registrarse localmente con la imagen de muestra de baja resolución 4510 para generar una imagen de muestra alineada localmente 4525. Cada imagen de la porción de muestra de la pluralidad de imágenes de la porción de muestra puede ser menor que un campo de visión único de la imagen de muestra cosida de alta resolución 4505. De esta manera, se pueden corregir los errores de registro locales debido a artefactos de costuras.

La Figura 46 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 4600 para registrar imágenes de porciones de matrices de una imagen de la matriz a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema en cuestión. En algunas modalidades, la imagen de baja resolución de la matriz superpuesta a la muestra descrita en relación con la operación 3230 de la Figura 32 puede incluir una pluralidad de imágenes de la porción de matriz. En 4610, el procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 puede determinar una pluralidad de imágenes de la porción de matriz en la imagen de baja resolución de la matriz. La pluralidad de imágenes de la porción de matriz en la imagen de baja resolución de la matriz puede determinarse mediante el uso de la visión informática y/o la funcionalidad de procesamiento de imágenes proporcionada en una tubería de procesamiento de imágenes configurada dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. En 4620, el procesador de datos puede registrar una o más de las imágenes de la porción de matriz en la imagen de la matriz de baja resolución a una porción correspondiente de la muestra en la imagen de muestra de alta resolución.

La Figura 47 representa un flujo de trabajo 4700 para registrar imágenes de la porción de matriz de una imagen de la matriz a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. Una imagen de muestra cosida de alta resolución 4705 puede recibirse por un procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. Una imagen de la matriz de baja resolución 4710 que incluye un campo de visión único de la matriz superpuesta a la muestra también puede recibirse por el procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. En algunas modalidades, la muestra y la matriz pueden localizarse en un único sustrato o portaobjetos. Una imagen de alineación inicial 4715 puede generarse a través de una operación de registro de imagen completa global que registra la imagen de muestra cosida de alta resolución 4705 a la imagen de la matriz de resolución inferior. En algunas modalidades, puede que no sea necesario generar la imagen de alineación inicial 4715. En algunas modalidades, antes de generar la imagen de alineación inicial 4715, el sustrato de muestra y el sustrato de la matriz pueden alinearse manual o automáticamente por el procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. Esta alineación preliminar puede realizarse para especificar las condiciones iniciales de los métodos de registro de imágenes descritos en la presente descripción.

La imagen de la matriz de baja resolución 4710 puede procesarse para determinar una pluralidad de imágenes de la porción de matriz 4720. La pluralidad de imágenes de la porción de matriz 4720 puede registrarse localmente con la imagen de muestra cosida de alta resolución 4705 para generar una imagen de muestra alineada localmente 4725. Cada imagen de la porción de matriz de la pluralidad de imágenes de la porción de matriz puede ser más pequeña que un campo de visión único de la imagen de la matriz cosida de alta resolución 4675. De esta manera, se pueden corregir los errores de registro locales debido a artefactos de costuras.

Las matrices de alta resolución para la espacialómica (por ejemplo, la transcriptómica espacial) pueden configurarse para identificar características de 5-10 micras y resolución de células individuales. La alineación de las localizaciones con código de barras inferidas de la matriz sobre la imagen de muestra de alta resolución puede requerir una resolución de celda única para asociar correctamente los transcritos capturados en las localizaciones con código de barras con la celda a partir de la cual se originaron los transcritos. Típicamente, la imagen de muestra de alta resolución se adquiere con un gran aumento y puede coserse mediante el uso de múltiples campos visuales. Esta forma de tomar

imágenes juntas puede generar artefactos de costuras. Los artefactos de costuras pueden causar errores al extrapolar las localizaciones con código de barras utilizando fiduciales. Los errores de costuras pueden ser del orden de 5-10 micras. Si se deja sin corregir, los datos de expresión génica se asociarán con la localización incorrecta en la imagen de muestra de alta resolución.

5 Para corregir o mitigar los errores de registro debidos a artefactos de costuras, se puede capturar una única imagen de muestra de baja resolución además de la imagen de muestra de alta resolución. La imagen de muestra de resolución inferior puede no incluir artefactos de costuras. Por lo tanto, no pueden surgir errores de localización puntual al extrapolar las localizaciones con código de barras mediante el uso de fiduciales. El registro de imagen puede realizarse entre la imagen de muestra cosida de alta resolución y la imagen de muestra no cosida de baja resolución mediante el uso de porciones de la imagen de muestra cosida de alta resolución. De esta manera, los errores asociados con las localizaciones con código de barras debido a artefactos de costuras pueden mitigarse y/o eliminarse.

15 La Figura 48 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 4800 para registrar imágenes de porciones de muestra cosidas a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema en cuestión. En 4810, el procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 puede recibir un primer conjunto de datos de imágenes de muestra que incluye una primera pluralidad de imágenes de la porción de muestra correspondientes a porciones de una muestra. Cada una de las imágenes de la porción de muestra puede tener una primera resolución.

20 En 4820, el procesador de datos puede recibir un segundo conjunto de datos de imágenes de muestra que incluye una imagen de muestra de la muestra. La imagen de muestra puede tener una segunda resolución que es menor que la primera resolución de cada una de las imágenes de la porción de muestra en el primer conjunto de datos de imágenes de muestra.

25 En 4830, el procesador de datos puede registrar una o más de las imágenes de la porción de muestra en una porción correspondiente de la muestra en la imagen de muestra.

30 La Figura 49 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 4900 para registrar imágenes de porciones de muestra cosidas a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de muestra en base a la determinación de una o más localizaciones con código de barras de una matriz de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. En algunas modalidades, la imagen de muestra puede incluir una pluralidad de imágenes de la porción de muestra que se asocian individualmente con una porción de la muestra. En tales modalidades, el registro puede incluir además operaciones del proceso 4900 mostrado en la Figura 49. Por ejemplo, en 4910, el procesador de datos puede recibir un conjunto de datos de imágenes de la matriz que incluye una matriz de imágenes de un campo de visión único de una matriz. La imagen de la matriz también puede incluir un fiducial de la matriz. En 4920, el procesador de datos puede determinar que el fiducial de la matriz está dentro de un campo de visión único de la imagen de la matriz. Los fiduciales de la matriz pueden determinarse mediante el uso de la funcionalidad de visión informática y/o procesamiento de imágenes proporcionada en una tubería de procesamiento de imágenes configurada dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. En algunas modalidades, los fiduciales de la matriz pueden estar predefinidos y pueden ser visibles bajo el campo de visión. El usuario o el software pueden determinar si todas las características fiduciales están incluidas en el campo de visión antes de tomar la imagen. En algunas modalidades, los fiduciales de la matriz dentro de un campo de visión único de la imagen de la matriz pueden determinarse mediante el uso de la visión informática y/o la funcionalidad de procesamiento de imágenes proporcionada en una tubería de procesamiento de imágenes configurada dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. En 4930, el procesador de datos determina una o más localizaciones con código de barras de la matriz mediante el uso de la imagen de la matriz. La imagen alineada generada, descrita en relación con la operación 3240 de la Figura 32, puede incluir una o más localizaciones con códigos de barra.

50 La Figura 50 representa un flujo de trabajo 5000 para registrar imágenes de porciones de muestra cosidas a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. Una imagen de muestra cosida de alta resolución 5005 que incluye uno o más fiduciales 5010 puede recibirse por el procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. El procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 también puede recibir una la imagen de baja resolución sin coser del campo de visión único 5015 que incluye uno o más fiduciales 5020. Los fiduciales 5020 y la muestra 5025 en la imagen de baja resolución sin coser del campo de visión único 5015 pueden usarse para determinar una o más localizaciones con código de barras 5030. El registro de imagen puede realizarse entre la imagen de baja resolución sin coser del campo de visión único 5015 y la imagen de muestra cosida de alta resolución 5005 para proporcionar, como se muestra en la información de localización del código de barras de alta resolución 5040 con respecto a la imagen de muestra cosida de alta resolución 5005.

65 La Figura 51 es un diagrama de flujo del proceso que ilustra un proceso de ejemplo 5100 para registrar imágenes de la porción de muestra cosidas a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de muestra y registrar imágenes de la porción de muestra cosidas a porciones correspondientes de la muestra en la imagen de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. En algunas modalidades, la imagen de muestra cosida de alta resolución puede incluir una pluralidad de imágenes de la porción de muestra. Cada una de las imágenes de la

porción de muestra puede asociarse con una porción correspondiente de la muestra. La imagen de la matriz de baja resolución puede incluir una pluralidad de imágenes de la porción de matriz cosidas. Cada una de las imágenes de la porción de matriz puede asociarse con una porción correspondiente de la matriz y puede incluir un único campo de visión.

5 En 5110, el procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 puede determinar una pluralidad de imágenes de la porción de muestra en una imagen de muestra cosida de alta resolución. La pluralidad de imágenes de la porción de muestra puede determinarse mediante el uso de la función de visión informática y/o procesamiento de imágenes configurada dentro de o accesible a través del procesador de datos. En algunas modalidades, de la pluralidad de imágenes de la porción de muestra puede conocerse la información grabada por el dispositivo de captura de imágenes cuando se tomó la imagen de muestra cosida de alta resolución. En 5120, el procesador de datos puede registrar una o más de las imágenes de la porción de muestra en la imagen de muestra en una porción correspondiente de la muestra en la imagen de la matriz cosida de baja resolución. En 5130, el procesador de datos puede determinar una pluralidad de imágenes de la porción de matriz en la imagen de la matriz cosida de baja resolución. La pluralidad de imágenes de la porción de matriz puede determinarse mediante el uso de la visión informática y/o la funcionalidad de procesamiento de imágenes configurada dentro de o accesible a través del procesador de datos. En 5140, el procesador de datos puede registrar una o más imágenes de la porción de matriz en la imagen de la matriz cosida de baja resolución a una porción correspondiente de la muestra en la imagen de muestra cosida de alta resolución.

20 La Figura 52 representa un flujo de trabajo 5200 para registrar imágenes de la porción de muestra cosida a porciones correspondientes de la muestra en una imagen de muestra y registrar imágenes de la porción de matriz cosida a porciones correspondientes de la muestra en la imagen de muestra de acuerdo con algunas implementaciones del tema actual. Una imagen de muestra cosida de alta resolución 5205 puede recibirse por un procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. La imagen de muestra cosida de alta resolución 5205 puede incluir uno o más fiduciales de la muestra 5210. Una imagen de la matriz cosida de baja resolución 5215 que incluye cuatro imágenes de la porción de matriz de campo de visión único también pueden recibirse por el procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. La imagen de la matriz cosida de baja resolución 5215 puede incluir uno o más fiduciales de la matriz 5220. Una imagen de alineación inicial 5225 puede generarse a través de una operación de registro de imagen completa global que registra la imagen de muestra cosida de alta resolución 5205 a la imagen de la matriz cosida de resolución inferior. En algunas modalidades, puede que no sea necesario generar la imagen de alineación inicial 5215. En algunas modalidades, antes de generar la imagen de alineación inicial 5225, el sustrato de muestra y el sustrato de la matriz pueden alinearse manual o automáticamente por el procesador de datos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. Esta alineación preliminar puede realizarse para especificar las condiciones iniciales de los métodos de registro de imágenes descritos en la presente descripción.

Un cuarto de la imagen de muestra cosida de baja resolución 5215 puede procesarse para determinar una pluralidad de imágenes de la porción de muestra 5230. El registro puede realizarse para cada una de las imágenes de la porción de matriz de campo de visión único 5230. El fiducial 5235 puede usarse para facilitar el mapeo de los datos de expresión génica a la imagen de muestra de alta resolución. Dado que este cuarto de la imagen 5215 puede ser un campo de visión único y sin coser, la información de localización entre la muestra de tejido y los fiduciales puede determinarse que es precisa. La pluralidad de imágenes de la porción de muestra 5230 puede registrarse localmente con la imagen de la matriz de campo de visión único de baja resolución 5215 para generar una imagen de muestra alineada localmente 5240. Cada imagen de la porción de muestra de la pluralidad de imágenes de la porción de matriz puede ser menor que un campo de visión único de la imagen de muestra cosida de baja resolución 5215. De esta manera, se pueden corregir los errores de registro locales debido a artefactos de costuras en la imagen de alta resolución.

50 V. Arquitectura de software y sistema de registro de imágenes

La Figura 53 es un diagrama de una arquitectura de sistema de ejemplo 5300 para realizar los procesos de registro de imagen y flujos de trabajo descritos en la presente descripción de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Por ejemplo, la arquitectura del sistema 5300 se configura para funcionar con el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 para realizar uno o más flujos de trabajo y procesos descritos en la presente descripción. La arquitectura del sistema 5300 también puede incluir un servicio de procesamiento remoto 5355, un portal de soporte 5360 y un dispositivo informático 5365 que puede acoplarse comunicativamente entre sí a través de una red 5350. La arquitectura del sistema puede configurarse en un sistema y puede realizar flujos de trabajo de registro de imágenes descritos en la presente descripción.

60 Como se muestra en la Figura 53, el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 puede incluir una placa de control de entrada/salida 5305 que controla el funcionamiento de motores, bombas, ventiladores, calentadores, actuadores, sensores, fuentes de iluminación, fuentes de fluidos o similares que pueden configurarse dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. Un control de cámara 5310, y una interfaz de red 5315 también pueden incluirse en el aparato de manipulación de muestras 400, 1400, 3000. Como se muestra, el controlador de entrada/salida (E/S) 5305, el control de cámara 5310 y la interfaz de red 5315 pueden conectarse a través de un

bus de red de área del controlador (CAN). El control de cámara 5310 puede configurarse para controlar aspectos o componentes de una cámara (por ejemplo, el dispositivo de captura de imágenes 1420 o 1720). Por ejemplo, el control de cámara 5310 puede controlar un enfoque, un zoom, una posición de la cámara, una captura de imágenes o similares.

5 El aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 también incluye un procesador 5320, una memoria 5325 que almacena una o más aplicaciones 5330, un dispositivo de entrada 5335 y una pantalla 5340. El procesador 5320 puede configurarse para ejecutar instrucciones legibles por ordenador almacenadas en la memoria 5325 para realizar los flujos de trabajo y procesos asociados con las aplicaciones 5330. El procesador 5320 también puede ejecutar instrucciones legibles por ordenador almacenadas en la memoria 5325, lo que hace que el procesador 5320 controle las operaciones del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 a través del controlador de E/S 5305 y/o los dispositivos de captura de imágenes 1420, 1720 a través del control de cámara 5310. De esta manera, el procesador 5320 puede controlar una operación del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 para alinear una muestra a una matriz. Por ejemplo, el procesador 5320 puede ejecutar instrucciones para hacer además que cualquiera del primer mecanismo de retención o del segundo mecanismo de retención se traslade dentro del aparato de manipulación de muestras 400, 1400, 3000 para ajustar sus respectivas localizaciones y hacer además que un área de muestra de un primer sustrato se alinee con un área de matriz de un segundo sustrato.

20 El dispositivo de entrada 5335 puede incluir un ratón, un lápiz óptico, una almohadilla táctil, un joy stick o similares configurados para recibir entradas de usuario de un usuario. Por ejemplo, un usuario puede usar el dispositivo de entrada 5335 para proporcionar una entrada que indica un indicador del área de muestra para un primer sustrato. La pantalla 5340 puede incluir una interfaz gráfica de usuario 5345 que muestra datos asociados con la una o más aplicaciones 5330.

25 La interfaz de red 5315 puede configurarse para proporcionar conectividad cableada o inalámbrica con una red 5350, tal como Internet, una red de área local, una red de área amplia, una red privada virtual, una red celular o similares. En algunas modalidades, la interfaz de red 5315 puede configurarse para comunicarse a través de Ethernet, Wi-Fi, Bluetooth, USB o similares. La red 5350 puede conectarse a uno o más recursos informáticos distribuidos o servicios de procesamiento remoto 5355. En algunas modalidades, el servicio de procesamiento remoto 5355 puede ser un entorno informático en la nube, una tubería de software como un servicio (SaaS). El servicio de procesamiento remoto 5355 puede configurarse para ayudar, realizar o controlar la alineación automatizada de imágenes y/o el registro de imágenes del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 descrito en la presente descripción. El portal de soporte 5360 puede configurarse para enviar datos de imagen compartidos, datos de registro de imagen, datos de calibración de instrumentos o datos de autocomprobación que incluyen imágenes, vídeos y registros o datos de parámetros asociados al portal de soporte 5655. En algunas modalidades, el servicio de procesamiento remoto 5355 o el portal de soporte 5360 pueden configurarse como un entorno informático en la nube, un entorno informático virtual o en contenedores y/o un entorno de microservicios basado en la web.

40 El aparato de manipulación de muestras 400 también puede acoplarse comunicativamente a través de la red 5350 a un dispositivo informático 5365. En algunas modalidades, el segundo dispositivo informático 5365 puede localizarse de forma remota desde el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000.

45 El dispositivo informático 5365 puede configurarse para transmitir y recibir datos con el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. El dispositivo informático 5365 puede incluir un escritorio, portátil, móvil, tableta, dispositivo informático con pantalla táctil o similar. En algunas modalidades, el dispositivo informático 5365 puede incluir un teléfono inteligente, tal como un teléfono configurado con un sistema operativo iOS o Android.

50 La Figura 54 es un diagrama de una arquitectura de software de ejemplo 5400 para realizar los procesos y flujos de trabajo descritos en la presente descripción de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. La arquitectura 5400 puede configurarse en la memoria 5325 del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 descrito en relación con la Figura 53. Los módulos programáticos de la arquitectura pueden implementarse como un sistema operativo 5410 (por ejemplo, un OS Linux) del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 y pueden almacenarse en la memoria 5325. El sistema operativo 5410 puede incluir el controlador de E/S 5305, un controlador CAN 5412, una interfaz de cámara 5414, un subsistema de gestión de imágenes 5420, un subsistema de diagnóstico 5425, un recolector de estadísticas 5430, un servicio de publicación y suscripción 5435 y un subsistema de actualización 5440, un subsistema de gestión de plataforma 5445, un subsistema de interfaz de usuario 5450, un subsistema de gestión de la nube 5460 y un subsistema de control de ensayo 5470. El subsistema de interfaz de usuario 5450 puede incluir una infraestructura de interfaz de usuario de pantalla táctil 5452. El subsistema de gestión de la nube 5460 puede incluir una infraestructura de conectividad en la nube 5462. El subsistema de control del ensayo 5470 puede incluir un subsistema de control del dispositivo de la red de área del controlador (CAN) 5472 y un subsistema de control de la cámara 5474. El subsistema de control del dispositivo CAN 5472 puede conectarse a otras placas que controlan otros sensores, actuadores, calentadores, fuentes de iluminación u otros componentes de los aparatos de manipulación de muestras conectados 400, 1400 y 3000. La interfaz de cámara 5414 puede configurarse para controlar y grabar imágenes/vídeos mediante el uso del/de los dispositivo(s) de captura de imágenes.

65

La Figura 55 es un diagrama de una arquitectura de ejemplo 5500 del subsistema de gestión de imágenes 5420 que se muestra en la Figura 54. El subsistema de gestión de imágenes 5420 puede configurarse para realizar los procesos de registro de imágenes y flujos de trabajo descritos en la presente descripción de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El subsistema de gestión de imágenes 5420 puede incluir una tubería de procesamiento de imágenes 5505 y herramientas de visualización 5510.

La tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede incluir una o más tuberías de análisis configuradas para procesar la salida espacial de la secuencia de ARN y la obtención de imágenes de microscopio de campo claro y fluorescencia con el fin de detectar muestras, alinear lecturas, generar matrices de características y puntos, realizar análisis de agrupación y expresión génica, y colocar puntos en el contexto espacial en la imagen de sustrato. En algunas modalidades, la tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede incluir una funcionalidad configurada para demultiplexar correctamente las ejecuciones de secuenciación y convertir el código de barras y los datos leídos en archivos con formato FASTQ. El formato FASTQ es un formato basado en texto para almacenar tanto una secuencia biológica (normalmente una secuencia de nucleótidos) como sus correspondientes puntuaciones de calidad. Tanto la letra de secuencia como la puntuación de calidad están cada una codificadas con un único carácter ASCII por brevedad. En algunas modalidades, la tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede incluir una funcionalidad configurada para recibir una imagen de portaobjetos del microscopio y archivos FASTQ y para realizar la alineación, detección de tejidos, detección fiducial y recuento de localización de códigos de barras. La tubería de procesamiento de imágenes 5505 usa los códigos de barras espaciales para generar matrices de puntos de características, determinar conglomerados y realizar análisis de expresión génica. En algunas modalidades, la tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede incluir la funcionalidad configurada para recibir la salida de ejecuciones múltiples de contar las localizaciones de códigos de barras y/o identificadores moleculares únicos (UMI) de muestras relacionadas y puede agregar la salida, normalizar esas ejecuciones a la misma profundidad de secuenciación y luego volver a calcular las matrices de códigos de barras de características y el análisis en los datos combinados. La tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede combinar datos de múltiples muestras en una matriz y análisis de códigos de barras de características para todo el experimento.

La tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede incluir además una funcionalidad configurada para procesar imágenes de campo claro y de fluorescencia. Por ejemplo, la tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede configurarse para recibir una imagen deslizante como entrada para usarse como un mapa anatómico en el que se visualizan las mediciones de expresión génica. La tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede configurarse para recibir al menos dos estilos de imágenes: a) una imagen de campo claro teñida con hematoxilina y eosina (H&E) con tejido oscuro sobre un fondo claro o b) una imagen de fluorescencia con señal brillante sobre un fondo oscuro. Aunque la entrada de campo claro puede comprender una única imagen, la entrada de fluorescencia puede comprender uno o más canales de información generados por excitaciones separadas de la muestra.

La tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede incluir además la funcionalidad de realizar automática y/o manualmente flujos de trabajo de procesamiento de imágenes descritos en la presente descripción. Por ejemplo, la tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede incluir una funcionalidad configurada para alinear un patrón de puntos con código de barras de sustratos con una imagen de sustrato de entrada para imágenes de campo claro. La tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede discriminar aún más entre el tejido y el fondo en un portaobjetos para imágenes de campo claro. La tubería de procesamiento de imágenes 5505 también puede configurarse para preparar imágenes de portaobjetos de resolución completa para su uso con las herramientas de visualización 5510.

La tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede configurarse con uno o más algoritmos de obtención de imágenes. Los algoritmos de obtención de imágenes pueden configurarse para determinar dónde se ha colocado una muestra, tal como tejido, y alinear el patrón de puntos fiduciales impreso. La detección de tejidos puede usarse para identificar qué puntos de captura, y por lo tanto qué códigos de barras, se usarán para el análisis. La alineación fiduciaria puede realizarse para determinar en qué lugar de la imagen reside un punto con código de barras individual, ya que cada usuario puede establecer un campo de visión ligeramente diferente al visualizar el área de la muestra. La tubería de análisis de procesamiento de imágenes 5505 también puede configurarse para soportar la alineación manual y la selección de tejidos a través de las herramientas de visualización 5510.

La tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede realizar una alineación fiducial identificando el patrón específico del portaobjetos de puntos de captura invisibles impresos en cada portaobjetos y cómo se relacionan con los puntos fiduciales visibles que forman una trama alrededor de cada área de captura. El marco fiducial puede incluir esquinas y lados únicos que el software intenta identificar. Para determinar la alineación de los fiduciales, la tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede extraer características que "se ven" como los puntos fiduciales y luego puede intentar alinear estos puntos fiduciales candidatos con el patrón de puntos fiduciales conocido. Los puntos extraídos de la imagen pueden contener necesariamente algunos errores, por ejemplo, en lugares donde los puntos fiduciales estaban cubiertos por tejido, y algunos falsos positivos, tales como donde los residuos en el portaobjetos o elementos de tejido pueden parecer puntos fiduciales.

Después de la extracción de puntos fiduciales supuestos de la imagen, este patrón puede alinearse con el patrón de puntos fiduciales conocido de una manera que sea robusta a un número razonable de falsos positivos y falsos negativos. La salida de este proceso puede ser una transformación de coordenadas que relaciona el patrón de puntos

con código de barras con la imagen de tejido del usuario. En algunas modalidades, el algoritmo de alineación fiducial puede ejecutarse para cada una de las posibles transformaciones de trama del fiducial y elegir entre esas la alineación con el mejor ajuste.

5 La tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede incluir además la funcionalidad de detección de tejidos. Cada área en un sustrato o portaobjetos puede contener una cuadrícula de puntos de captura poblada con sondas con código de barras espacial para capturar ARNm poliadenilado. Solo una fracción de estas manchas puede cubrirse por el tejido. Para restringir el análisis de la tubería de procesamiento de imágenes 5505 solo a aquellos puntos donde se colocó el tejido, la tubería de procesamiento de imágenes 5505 puede usar un algoritmo para identificar el tejido en la imagen de campo claro de entrada. Por ejemplo, mediante el uso de una versión en escala de grises muestreada hacia abajo de una imagen de entrada, pueden calcularse y compararse múltiples estimaciones de la colocación de la sección de tejido. Estas estimaciones pueden usarse para formar un clasificador estadístico para etiquetar cada píxel dentro del área de captura como tejido o fondo. Para lograr resultados óptimos, el algoritmo de detección de tejidos puede configurarse para recibir una imagen con un fondo liso, brillante y tejido más oscuro con una estructura compleja.

Como se muestra además en la Figura 55, el subsistema de gestión de imágenes 5420 también puede incluir herramientas de visualización 5510. Las herramientas de visualización 5510 pueden configurarse para proporcionar los datos espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) en uno o más formatos visuales. Las herramientas de visualización 5510 pueden proporcionar los datos espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) para mostrar en una pantalla del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. En algunas modalidades, los datos espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) pueden proporcionarse en una GUI de la pantalla del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. En algunas modalidades, las herramientas de visualización 5510 pueden configurarse en un dispositivo informático remoto que se acopla comunicativamente al aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000, de manera que los datos espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) pueden visualizarse y/o manipularse en el dispositivo informático remoto.

Las herramientas de visualización 5510 pueden configurarse para proporcionar un sistema de entrada del usuario y una interfaz de usuario, tal como una aplicación de escritorio que proporciona una funcionalidad de visualización interactiva para analizar datos de diferentes procesos y flujos de trabajo espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) descritos en la presente descripción. Las herramientas de visualización 5510 pueden incluir un navegador que puede configurarse para permitir a los usuarios evaluar e interactuar con diferentes vistas de los datos espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) para obtener rápidamente información sobre la biología subyacente de las muestras que se analizan. El navegador puede configurarse para evaluar genes significativos, caracterizar y refinar conglomerados de datos y para realizar análisis de expresión diferencial dentro del contexto espacial de una imagen de muestra.

Las herramientas de visualización 5510 pueden configurarse para leer y escribir en archivos generados por la tubería de procesamiento de imágenes 5505. Los archivos pueden configurarse para incluir versiones en mosaico y no en mosaico de imágenes de muestra para todas las localizaciones con código de barras en un sustrato o portaobjetos, datos de alineación asociados con la alineación de una muestra o porciones de la muestra y las localizaciones con código de barras de una matriz, e información de conglomeración basada en expresión génica para las localizaciones con códigos de barra. La información de conglomeración basada en la expresión génica puede incluir proyecciones de Incrustación de vecinos estocásticos distribuidos en t (t-SNE) y aproximación y proyección uniforme del colector (UMAP).

La Figura 56 es un diagrama que ilustra una arquitectura de ejemplo de un sistema informático 5605. El sistema informático 5605 puede incluir un primer dispositivo informático 5610 y un segundo dispositivo informático 5630. En algunas modalidades, el dispositivo informático 5610 puede ser el mismo que el dispositivo informático 5360 descrito en relación con la Figura 53. En algunas modalidades, el dispositivo informático 5610 puede acoplarse comunicativamente con el dispositivo informático 5630, por ejemplo cuando el dispositivo informático 5630 se configura como o dentro del instrumento 400, 1400 y 3000 descrito en la presente descripción.

Como se muestra en la Figura 56, el dispositivo informático 5610 incluye al menos un procesador 5640 para realizar acciones de acuerdo con las instrucciones, y uno o más dispositivos de memoria (por ejemplo, caché 5645) y/o memoria 5650 para almacenar instrucciones y datos. El dispositivo informático 5610 incluye uno o más procesadores 5640 en comunicación, a través de un bus 5615, con memoria 5650 y con al menos un controlador de interfaz de red 5620 con una interfaz de red 5625 para conectarse a dispositivos externos, tales como el dispositivo informático 5630, por ejemplo, un dispositivo informático (tal como el instrumento 400, 1400, 3000 en la presente descripción). El uno o más procesadores 5640 también están en comunicación, a través del bus 5615, entre sí y con cualquier dispositivo de E/S en una o más interfaces de E/S 5625, y cualquier otro dispositivo 5660. El procesador 5640 ilustrado puede incorporarse, o puede conectarse directamente a, la memoria caché 5645. Generalmente, un procesador ejecutará las instrucciones recibidas de la memoria.

El controlador de interfaz de red 5620 gestiona los intercambios de datos a través de la interfaz de red 5625. El controlador de interfaz de red 5620 maneja las capas físicas y de enlace de datos del modelo de interconexión de

sistemas abiertos (OSI) para la comunicación en red. En algunas implementaciones, algunas de las tareas del controlador de la interfaz de red son manejadas por el procesador 5640. En algunas implementaciones, el controlador de interfaz de red 5620 es parte del procesador 5640. En algunas implementaciones, el dispositivo informático 5610 tiene múltiples controladores de interfaz de red 5620. En algunas implementaciones, la interfaz de red 5625 es un punto de conexión para un enlace de red físico, por ejemplo, un conector RJ 45. En algunas implementaciones, el controlador de interfaz de red 5620 admite conexiones de red inalámbricas y un puerto de interfaz 5625 es un receptor/transmisor inalámbrico. Generalmente, el dispositivo informático 5610 puede intercambiar datos con otros dispositivos de red 5630, tal como el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 descritos en la presente descripción a través de enlaces físicos o inalámbricos a una interfaz de red 5625. En algunas implementaciones, el controlador de interfaz de red 5620 implementa un protocolo de red, tal como Ethernet.

Los otros dispositivos informáticos 5630 se conectan al dispositivo informático 5610 a través de un puerto de interfaz de red 5625. El otro dispositivo informático 5630 puede ser un dispositivo informático homólogo, un dispositivo de red o cualquier otro dispositivo informático con funcionalidad de red. En algunas modalidades, el dispositivo informático 5630 puede ser un dispositivo de red tal como un concentrador, un puente, un conmutador o un enrutador, que conecta el dispositivo informático 5360 a una red de datos tal como Internet. En algunas modalidades, el dispositivo informático 5610 puede acoplarse comunicativamente al dispositivo informático 5630 (por ejemplo, el instrumento 400, 1400 y 3000) a través de la interfaz de E/S 5635. En algunas implementaciones un dispositivo de E/S se incorpora en el dispositivo informático 5610, por ejemplo, como se configuraría en un dispositivo informático de pantalla táctil o una tableta.

En algunos usos, la interfaz de E/S 5635 admite un dispositivo de entrada y/o un dispositivo de salida. En algunos usos, el dispositivo de entrada y el dispositivo de salida se integran en el mismo hardware, por ejemplo, como en una pantalla táctil. En algunos usos, tal como en un contexto de servidor, no hay interfaz de E/S 5635 o la interfaz de E/S 5635 no se usa.

En más detalle, el procesador 5640 puede ser cualquier circuito lógico que procesa instrucciones, por ejemplo, instrucciones obtenidas de la memoria 5650 o caché 5645. En muchas modalidades, el procesador 5640 es un procesador integrado, una unidad de microprocesador o un procesador de propósito especial. En algunas modalidades, la funcionalidad descrita en relación con el dispositivo informático 5610 puede configurarse en cualquier procesador, por ejemplo, un procesador de señal digital (DSP) adecuado, o un conjunto de procesadores, capaz de funcionar como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, el procesador 5640 puede ser un procesador de un núcleo único o de múltiples núcleos. En algunas modalidades, el procesador 5640 puede componerse de múltiples procesadores.

La memoria caché 5645 es generalmente una forma de memoria informática de alta velocidad colocada cerca del procesador 5640 para tiempos de lectura/escritura rápidos. En algunas implementaciones, la memoria caché 5645 es parte de o está en el mismo chip que el procesador 5640.

La memoria 5650 puede ser cualquier dispositivo adecuado para almacenar datos legibles por ordenador. La memoria 5650 puede ser un dispositivo con almacenamiento fijo o un dispositivo para leer medios de almacenamiento extraíbles. Los ejemplos incluyen todas las formas de memoria no volátil, dispositivos de medios y memoria, dispositivos de memoria semiconductores (por ejemplo, EPROM, EEPROM, SDRAM, dispositivos de memoria flash y todos los tipos de memoria de estado sólido), discos magnéticos y discos ópticos de magnetó. El dispositivo informático 5610 puede tener cualquier número de dispositivos de memoria 5650.

La memoria 5650 puede incluir una o más aplicaciones 5655. Las aplicaciones 5655 pueden incluir instrucciones programáticas e interfaces de usuario configuradas para transmitir y recibir datos correspondientes a datos de imagen y/o datos de ensayo generados por el aparato de manipulación de muestras 400, 1400, 3000. En algunas modalidades, la aplicación 5655 puede configurarse para compartir datos con el sistema operativo 5410, el servicio de procesamiento remoto 5355 y/o el portal de soporte 5360.

Las aplicaciones 5655 pueden permitir a un usuario recibir datos sobre flujos de trabajo, muestras y ajustes experimentales del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. Las aplicaciones 5655 pueden incluir características y funcionalidad para que un usuario visualice el progreso o los resultados del ensayo, o para monitorear y controlar el progreso de un ensayo. De esta manera, las aplicaciones 5655 pueden proporcionar monitoreo de manera que es posible que no se requiera monitoreo en persona e in situ para parte o todo un flujo de trabajo de ensayo. En algunas modalidades, las aplicaciones 5655 pueden incluir características o funcionalidad para ordenar consumibles, tales como reactivos o manchas, usados junto con ensayos realizados mediante el uso del aparato de manipulación de muestras 400, 1400, 3000.

En algunas modalidades, las aplicaciones 5655 pueden permitir a un usuario anotar una región de interés en un portaobjetos o sustrato. Por ejemplo, las aplicaciones 5655 pueden proporcionar una visualización de una imagen de una muestra de tejido en un sustrato, una imagen de una matriz en un sustrato, o una imagen de un sustrato de muestra de tejido superpuesto con un sustrato de la matriz en una configuración de intercalado descrita en la presente descripción. Un usuario puede interactuar con las aplicaciones 5655 para proporcionar una entrada que identifique

una región de interés. La entrada puede proporcionarse con un ratón, un lápiz, una pantalla táctil o similares. La entrada puede procesarse por la aplicación 5655 y mostrarse en una imagen del sustrato de muestra, el sustrato de la matriz, o el sustrato de muestra de tejido superpuesto con un sustrato de la matriz. En algunas modalidades, el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 puede recibir datos asociados con la anotación de entrada del usuario y puede aplicar la anotación al sustrato de muestra, al sustrato de la matriz o al sustrato de muestra de tejido superpuesto con un sustrato de la matriz.

En algunas modalidades, las aplicaciones 5655 pueden proporcionar características y funcionalidad para que un usuario revise los resultados del ensayo o los datos de imagen, evalúe los resultados del ensayo o los datos de imagen mediante el uso de técnicas o componentes de procesamiento adicionales, así como comentar y compartir los resultados del ensayo y los datos de imagen. Las aplicaciones 5655 también pueden permitir a un usuario informar problemas y rastrear el estado de emisión sobre el funcionamiento del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 al portal de soporte 5360. Como tal, la experiencia de atención al cliente del usuario puede elevarse ya que las aplicaciones pueden permitir el acceso directo a un error sin requerir que el usuario escriba por separado correos electrónicos largos y recoja archivos de registro o parámetros operativos del aparato de manipulación de muestras 400, 1400, 3000 para proporcionar al equipo de atención al cliente. En algunas modalidades, las aplicaciones 5360 pueden proporcionar documentación, tal como materiales de formación, datos de ensayos o reactivos, y manuales de usuario para el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. Por ejemplo, las aplicaciones 5655 pueden informar inmediatamente al usuario de las guías de usuario actualizadas y las mejoras del producto. En algunas modalidades, las aplicaciones 5655 pueden proporcionar a un usuario un fácil acceso a tutoriales e instrucciones interactivas.

Un usuario que interactúa con las aplicaciones 5655 en el dispositivo informático 5610, tal como un teléfono móvil, tableta o dispositivo informático personal, puede proporcionar retroalimentación sobre el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 a un equipo de atención al cliente, por ejemplo a través del portal de soporte 5360. El equipo de atención al cliente puede interactuar con el usuario para proporcionar información oportuna y factible sobre el estado y las operaciones del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 para mejorar la experiencia del usuario y la posibilidad de resultados experimentales más exitosos. De esta manera, el equipo de atención al cliente puede reducir el tiempo de diagnóstico y el tiempo de implementación de la solución. En algunas modalidades, las aplicaciones 5655 pueden configurarse para recibir e instalar actualizaciones de software o parches asociados con el sistema operativo 5410 o las aplicaciones 5655. De esta manera, las aplicaciones 5655 pueden ayudar a configurar e inicializar automática o manualmente el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. Por ejemplo, el equipo de atención al cliente puede acceder al aparato de manipulación de muestras a través de las aplicaciones 5655 y puede acceder directamente a un error una vez notificado el problema por una aplicación 5655. Por lo tanto, en algunas modalidades, las aplicaciones 5655 pueden generar alertas y notificaciones asociadas a ensayos y configuraciones del aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. Por ejemplo, en un contexto de atención al cliente, cuando se determina un protocolo o flujo de trabajo experimental o se realiza una adición a un ensayo, las aplicaciones 5655 pueden notificar al usuario. Las aplicaciones 5655 pueden instanciar la actualización en el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 de manera que el usuario pueda acceder al protocolo de actualizaciones inmediatamente.

En algunas modalidades, otros dispositivos 5660 están en comunicación con los dispositivos informáticos 5610 o 5630. En algunas modalidades, los otros dispositivos 5660 pueden incluir dispositivos informáticos externos o de almacenamiento de datos conectados a través de un bus serie universal (USB). Los otros dispositivos 5660 también pueden incluir una interfaz de E/S, puertos e interfaces de comunicación, y procesadores de datos. Por ejemplo, los otros dispositivos pueden incluir un teclado, micrófono, ratón u otros dispositivos señaladores, dispositivos de salida tales como una pantalla de vídeo, un altavoz o una impresora. En algunas modalidades, los otros dispositivos 5660 pueden incluir dispositivos de memoria adicionales (por ejemplo, unidad flash portátil o unidad de medios externos). En algunas implementaciones, los otros dispositivos pueden incluir un coprocesador. En algunas modalidades, el dispositivo adicional 5660 puede incluir un FPGA, un ASIC o una GPU para ayudar al procesador 5640 con cálculos de alta precisión o complejos asociados con los métodos de procesamiento y registro de imágenes descritos en la presente descripción.

La Figura 57 es una pantalla de interfaz de ejemplo 5700 proporcionada por las herramientas de visualización 5410 descritas en la presente descripción de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. La pantalla de interfaz 5700 puede incluir la funcionalidad de configuración de imagen 5705 configurada para ajustar o configurar los ajustes asociados con la pantalla del fiducial, la pantalla de escala, la rotación y el restablecimiento de los datos de imagen. La pantalla de interfaz 5700 también puede incluir una o más herramientas de manipulación de imágenes 5710, tales como un puntero para seleccionar datos o elementos de menú, un láser para seleccionar datos, y un bolígrafo para anotar o marcar datos o una región de interés en un portaobjetos o una imagen del portaobjeto(s). Los datos espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) pueden proporcionarse en un panel de visualización primario 5715.

Como se muestra en la Figura 57, la pantalla de interfaz 5700 puede incluir una presentación 5720 de datos de expresión de genes/características organizados con respecto a conglomerados. En algunas modalidades, la presentación 5720 puede proporcionar conglomerados representativos como gráficos de violín, aunque se puede

prever un número de otros tipos de gráficos no limitantes. La pantalla de interfaz 5700 también puede incluir paneles de visualización secundarios 5725 y 5730. Los paneles de visualización secundarios 5725 y 5730 pueden proporcionar una o más proyecciones de los datos espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) proporcionados en el panel de visualización primario 5715. Por ejemplo, el panel de visualización secundario 5725 puede proporcionar una proyección espacial de los datos espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) para que un usuario pueda interactuar con la opacidad espacial y los ajustes de aumento de los datos. El panel de visualización secundario 5730 puede proporcionar una proyección adicional de los datos espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales), tal como una proyección t-SNE mostrada en la Figura 57. El panel de visualización primario 5715 y los paneles de visualización secundarios 5725 y 5730 pueden configurarse cada uno individualmente con herramientas de manipulación de imágenes 5510 que incluyen, pero no se limitan a, funcionalidad de tamaño de imagen, funcionalidad de recorte de imagen, funcionalidad de zoom de imagen, funcionalidad de captura de imágenes, funcionalidad de vista de mosaico, funcionalidad de vista de lista o similares.

VI. Detección del fiducial mediante el uso del sistema de registro de imágenes

Para las aplicaciones espacialómicas (por ejemplo, transcriptómicas espacial) realizadas mediante el uso de los sistemas, métodos y medios legibles por ordenador descritos en la presente descripción, la información del análisis puede mostrarse sobre imágenes de tejidos de alta resolución. Una matriz de puntos con código de barras puede capturar análisis de una muestra (por ejemplo, una muestra de una sección de tejido) para la secuenciación aguas abajo. La localización de los puntos en un sustrato o portaobjetos de la matriz con relación a la localización de la muestra en un portaobjetos o sustrato de muestra puede inferirse mediante el uso de marcadores fiduciales que pueden colocarse sobre el sustrato de la matriz que pueden visualizarse junto con la sección de tejido en el sustrato de muestra. Los aparatos de manipulación de muestras, tales como los aparatos de manipulación de muestras 400, 1400 o 3000 descritos en la presente descripción pueden permitir ensayos espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) sin tener que colocar primero una muestra de una selección de tejido directamente sobre el sustrato de la matriz que incluye la matriz de puntos con código de barras. Los aparatos de manipulación de muestras 400, 1400 o 3000 descritos en la presente descripción pueden configurarse para formar una superposición o intercalado de un sustrato de muestra y un sustrato de la matriz. La superposición o intercalado puede formarse y ensamblarse durante una etapa de permeabilización en la que puede introducirse una solución de permeabilización en la superposición o intercalado del sustrato de muestra y el sustrato de la matriz. Durante la permeabilización, la muestra puede permeabilizarse o digerirse y puede liberar transcritos que pueden difundirse a través de un espacio formado entre el sustrato de muestra y el sustrato de la matriz (por ejemplo, desde la muestra de tejido hasta la matriz de puntos con código de barras) y puede unirse a los oligos con código de barras presentes dentro de los puntos con código de barras. Debido a que esta liberación y captura de transcritos se realiza en la configuración de superposición confinada o intercalada del sustrato de muestra y el sustrato de la matriz, puede ser difícil intercambiar reactivos durante esta etapa para asegurar suficiente dispersión de fluidos y control de la distribución de reactivos de manera que la visualización espacial de los transcritos pueda lograrse en condiciones óptimas. Cuando la muestra se solapa con los fiduciales, puede ser difícil visualizar los fiduciales para una detección sólida y el posterior procesamiento de imágenes. Esto puede afectar la alineación de las imágenes de la matriz con las imágenes de muestra necesarias para realizar los flujos de trabajo espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) descritos en la presente descripción.

Las Figuras 58A-58B representan una configuración de una muestra y una matriz en la que los fiduciales de la matriz no se solapan con la muestra en datos de imagen adquiridos de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra en la Figura 58A, los aparatos de manipulación de muestras 400, 1400 o 3000 pueden adquirir datos de imagen de un sustrato de muestra 5805 que incluye una muestra 5810 sobre el mismo superpuesta con un sustrato de la matriz 5815. El sustrato de la matriz 5815 puede incluir una matriz 5820 y un fiducial de la matriz 5825. En algunas modalidades, una trama del fiducial puede incluir una pluralidad de fiduciales de la matriz individuales 5825 en una disposición con patrones que rodea la matriz 5820. El fiducial de la matriz 5825 puede delinear e identificarse una localización de la matriz 5820 en el sustrato de la matriz 5815. Las imágenes de la superposición pueden adquirirse a través del dispositivo de captura de imágenes 5830 (correspondiente al dispositivo de captura de imágenes 1720 descrito en la presente descripción). Las imágenes y los datos de imagen correspondientes asociados con la imagen pueden adquirirse en uno o más planos focales, iluminaciones y velocidades de tramas como se describirá con más detalle.

Como se muestra en la Figura 58B, se puede adquirir una imagen 5835 de la superposición y puede incluir la muestra 5810 y el fiducial 5825. Como se muestra, la muestra 5810 se ha proporcionado de manera que no se oscurece ni se solapa con el fiducial de la matriz 5825. De esta manera, la imagen 5835 incluye tanto la muestra 5810 como el fiducial de la matriz 5825 en la imagen. Como la posición del fiducial de la matriz 5825 se conoce con relación a la matriz 5820 de puntos con código de barras y los puntos con código de barras no son visibles en la imagen 5835 de la superposición, la posición del fiducial de la matriz 5825 puede usarse para determinar la localización o posición de los puntos con código de barras de la matriz 5820 con relación a la localización o posición de la muestra 5810.

En condiciones en las que la muestra 5810 no cubre el fiducial de la matriz 5825, como se muestra en la imagen 5835, la localización de los fiduciales de la matriz 5825 con relación a la localización de la muestra 5810 puede determinarse mediante el uso del aparato de manipulación de muestras 400, 1400, o 3000 al cargar primero el sustrato de muestra

y el sustrato de la matriz en el aparato de manipulación de muestras y llevar el sustrato de muestra 5805 cerca del sustrato de la matriz 5815 para formar la superposición o intercalado de la muestra 5810 y la matriz 5820. Los datos de imagen pueden adquirirse a través del dispositivo de captura de imágenes 5830 de la superposición que incluye la muestra 5810, la matriz 5820 y los fiduciales de la matriz 5825 como se muestra en la imagen 5835. Un dispositivo informático acoplado comunicativamente al dispositivo de captura de imágenes 5830 y al aparato de manipulación de muestras 400, 1400 o 3000 puede recibir datos de imagen que incluyen la imagen 5835 y puede detectar la localización de los fiduciales de la matriz 5825 con respecto a un sistema de coordenadas determinado y aplicado a los datos de imagen por el dispositivo informático. El dispositivo informático puede detectar además la localización de la muestra 5810 en la imagen 5835 mediante el uso del sistema de coordenadas. Dado que la localización de la muestra 5810 y la localización de los fiduciales de la matriz 5825 se determinan por el dispositivo informático en la misma imagen 5835 y mediante el uso del mismo sistema de coordenadas, la localización de los fiduciales de la matriz 5825 con relación a la localización de la muestra 5810 puede determinarse y proporcionarse por el dispositivo informático. Sin embargo, en algunas condiciones, la muestra 5810 puede solapar y oscurecer los fiduciales de la matriz 5825, lo que dificulta determinar la localización de los fiduciales de la matriz 5825 con relación a la localización de la muestra 5810. Los sistemas, métodos y medios legibles por ordenador descritos en la presente descripción proporcionan una detección mejorada de los fiduciales de la matriz.

La Figura 59 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 5900 para detectar fiduciales asociados a una matriz de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El proceso 5900 puede realizarse por el sistema 5300 configurado con la arquitectura de software 5400 y la arquitectura de ejemplo 5500 del subsistema de gestión de imágenes 5420.

Por ejemplo, en la operación 5910 el procesador 5320 puede recibir datos de imagen adquiridos a través de un dispositivo de captura de imágenes, tal como el dispositivo de captura de imágenes 1720. Los datos de imagen pueden incluir una imagen de una matriz y un fiducial de la matriz superpuesto sobre una muestra.

En funcionamiento, 5920, el procesador 5320 puede recibir datos de imagen, adquiridos a través del dispositivo de captura de imágenes 1720, que incluye una imagen de una superposición de la matriz con la muestra como se describe en relación con las Figuras 58A-58B después de que el sustrato de muestra 5805 se ha superpuesto o intercalado con respecto al sustrato de la matriz 5815. El aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 puede evitar el movimiento del sustrato del portaobjetos con relación al sustrato de la matriz cuando la superposición o intercalado se forma mediante el uso del aparato de manipulación de muestras. El aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 también puede evitar el movimiento del sustrato de la matriz con relación al dispositivo de captura de imágenes 1720. La imagen de la superposición también puede incluir el fiducial de la matriz. La muestra puede localizarse con relación a la matriz de manera que la muestra oscurece el fiducial de la matriz en la superposición. La muestra puede no oscurecer completamente el fiducial de la matriz, sino que puede oscurecer una porción del fiducial de la matriz para limitar o reducir la detección mejorada del fiducial de la matriz descrita en la presente descripción.

En la operación 5930, el procesador 5320 puede determinar la localización del fiducial de la matriz en base a los datos de imagen y la imagen que incluye la matriz y el fiducial de la matriz. El procesador 5320 puede determinar la localización del fiducial de la matriz en base a un sistema de coordenadas. En algunas modalidades, los datos de imagen incluyen el sistema de coordenadas, en donde los datos de píxeles se almacenan en el sistema de coordenadas. En algunas modalidades, los datos de imagen comprenden datos de valores de píxeles almacenados en el sistema de coordenadas. En algunas modalidades, los datos de imagen comprenden datos de valores de píxeles que se almacenan en un sistema de coordenadas de matriz. En algunas modalidades, el sistema de coordenadas se almacena dentro de la memoria 5320 o de cualquier otra manera es accesible al sistema operativo 5410 (tal como el subsistema de gestión de imágenes 5420, o la placa de control de E/S 5305). En algunas modalidades, la memoria 5320 o el sistema operativo 5410 puede almacenar o acceder a uno o más sistemas de coordenadas únicos y diferentes. En algunas modalidades, los sistemas de coordenadas pueden incluir sistemas de coordenadas cartesianas de una, dos o tres dimensiones. El procesador 5320 puede aplicar las coordenadas del sistema de coordenadas a una o más características de los datos de imagen recibidos de manera que las localizaciones de las características en los datos de imagen, tales como las localizaciones del fiducial de la matriz y/o las localizaciones de las muestras pueden conocerse con respecto a las coordenadas del sistema de coordenadas.

En la operación 5940, el procesador 5320 puede determinar una localización de la muestra en base a los datos de imagen y la imagen que incluye la superposición de la matriz con la muestra y que incluye además el fiducial de la matriz. Los fiduciales de la matriz pueden oscurecerse en estos datos de imagen por la muestra y pueden no ser visibles. La localización de la muestra puede determinarse en el sistema de coordenadas por el procesador de datos 5320 de una manera similar a la descrita en relación con la determinación de la localización del fiducial de la matriz en la operación 5930.

En la operación 5950, el procesador de datos 5320 puede comparar la localización del fiducial de la matriz determinada en la operación 5930 y la localización de la muestra determinada en la operación 5940. Dado que no hay un presunto desplazamiento en el sustrato de la muestra y el sustrato de la matriz uno con relación al otro o a uno o más dispositivo(s) de captura de imágenes 1720 entre la captura de la primera y segunda imágenes, las localizaciones pueden considerarse dentro del mismo sistema de coordenadas y el procesador 5320 puede realizar la comparación

para confirmarlo. En la operación 5960, en base a la comparación, el procesador 5320 puede proporcionar la localización de los fiduciales de la matriz con relación a la localización de la muestra como se define por el sistema de coordenadas en el que se ha determinado cada uno que se localiza dentro. En algunas modalidades, el procesador 5320 puede proporcionar la localización del fiducial de la matriz y la localización de la muestra en la pantalla 5335 y/o la interfaz gráfica de usuario 5340.

Las Figuras 60A-60B representan un flujo de trabajo 6000 para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen adquiridos de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El flujo de trabajo 6000 puede realizarse con respecto a las modalidades del proceso 5900 descritas en la Figura 59. Como se muestra en la Figura 60A, el dispositivo de captura de imágenes 6020 (correspondiente al dispositivo de captura de imágenes 1720) puede adquirir una imagen 6025. La imagen 6025 puede ser de un sustrato de la matriz 6005, que puede incluir un fiducial de la matriz 6010 y una matriz 6015. La imagen 6025 puede incluir el sustrato de la matriz 6005 y el fiducial de la matriz 6010. Como se muestra en la Figura 60B, puede formarse una superposición 6055 del sustrato de muestra 6040 que incluye una muestra 6045 en el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 o 3000 con el sustrato de la matriz 6005. El dispositivo de captura de imágenes 6020 puede adquirir una imagen 6050 de la superposición 6055. La imagen 6050 puede incluir el fiducial de la matriz 6010 superpuesto y oculto por la muestra 6045.

Las Figuras 61A-61B representan un flujo de trabajo 6100 para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen adquiridos en diferentes planos focales de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El flujo de trabajo 6100 puede realizarse con respecto a las modalidades del proceso 5900 de la Figura 59. El aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 puede configurarse para mover el dispositivo de captura de imágenes 6135 en una dirección vertical con respecto al eje z, mientras permanece fijo en los ejes x, y con relación al sustrato de la matriz 6115.

Como se muestra en la Figura 61A, los datos de imagen pueden adquirirse de una superposición 6125 del sustrato de muestra 6105 y el sustrato de la matriz 6115. El sustrato de muestra 6105 puede incluir la muestra 6110 y el sustrato de la matriz puede incluir los fiduciales de la matriz 6120. Los datos de imagen pueden adquirirse por el dispositivo de captura de imágenes 6135 (correspondiente al dispositivo de captura de imágenes 1720) en un plano focal 6130. El plano focal puede corresponder a una profundidad focal a la que se adquieren los datos de imagen asociados con la superposición 6125. En el plano focal 6130 mostrado en la Figura 61A, la superposición 6125 puede no capturarse completamente, por ejemplo, el sustrato de muestra 6105 y la muestra 6110 pueden estar desenfocados, mientras que el sustrato de la matriz 6115 y los fiduciales de la matriz 6120 pueden ser más visibles. La imagen 6140 capturada por el dispositivo de captura de imágenes 6135 de la superposición 6125 puede reflejar esta profundidad focal subóptima de manera que los fiduciales de la matriz 6120 pueden mostrarse en la imagen 6140 con mayor enfoque, mientras que la muestra 6110 se muestra desenfocada.

En la Figura 61B, el plano focal captura la superposición 6125 de la muestra 6110 y los fiduciales de la matriz 6120 de manera más óptima. La imagen 6150 capturada por el dispositivo de captura de imágenes 6135 puede incluir la superposición 6125 y específicamente, la muestra 6110 y los fiduciales de la matriz 6120, en enfoque. La imagen 6140 puede usarse para la detección de los fiduciales de la matriz directamente, o para ayudar a la detección de los fiduciales de la matriz mediante el uso de la imagen 6150. Como no hubo un presunto desplazamiento en la superposición 6125 con relación al dispositivo de captura de imágenes 6135 en los ejes x y y durante la formación de la superposición al intercalar el sustrato de muestra 6105 y el sustrato de la matriz 6115, ambos sustratos están presentes en el mismo sistema de coordenadas.

Las Figuras 62A-62B representan un flujo de trabajo 6200 para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen adquiridos en diferentes iluminaciones de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El flujo de trabajo 6200 puede realizarse con respecto a modalidades del proceso 5900 descritas en relación con la Figura 59. El aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 puede configurarse con una fuente de luz 6240 configurada para proporcionar luz en uno o más ajustes de iluminación durante las etapas de adquisición de imágenes descritas en relación con el proceso 5900. Aunque la fuente de luz 6240 se muestra orientada sobre la superposición 6225, una variedad de números, configuraciones y orientaciones no limitantes de la fuente de luz 6240 pueden incluirse en el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. Por ejemplo, en algunas modalidades, la fuente de luz 6240 puede configurarse debajo de la superposición 6225. La fuente de luz puede emitir luz de color RGB en varias longitudes de onda. En algunas modalidades, la fuente de luz y los ajustes de iluminación pueden asociarse con una o más longitudes de onda que están cerca o coinciden con la longitud de onda de absorbancia de uno o más colorantes usados para teñir la muestra, tal como un colorante de eosina o un colorante fluorescente. En algunas modalidades, la fuente de luz y los ajustes de iluminación pueden configurarse para mejorar el contraste del fiducial de la matriz y/o el contraste de muestra. En algunas modalidades, el procesador 5320 puede seleccionar los datos de imagen o filtrar los datos de imagen asociados con uno o más canales RGB de la fuente de luz 6240.

Como se muestra en la Figura 62A, la fuente de luz 6240 puede proporcionar una iluminación 6230 sobre la superposición 6225. La iluminación 6230 puede corresponder a una longitud de onda configurada para mejorar un contraste de los fiduciales de la matriz 6220. Por ejemplo, una iluminación entre 550 nm y 1 μ m puede maximizar el contraste del fiducial de la matriz con relación al contraste de una muestra teñida con eosina, ya que la banda de absorción asociada con la tinción con eosina es de 440 nm a \sim 550 nm. Cuando se captura la imagen 6245, el contraste

del fiducial de la matriz 6220 se mejora con respecto a la muestra 6210 como se muestra en la imagen 6245 de la superposición 6225. Por ejemplo, la iluminación 6230 puede incluir una iluminación roja o infrarroja (IR). Como se muestra en la Figura 61B, la fuente de luz 6240 puede proporcionar una iluminación 6250 sobre la superposición 6225. La iluminación 6250 puede corresponder a una longitud de onda configurada para mejorar un contraste de la muestra 6210 como se muestra en la imagen 6255 de la superposición 6225. Por ejemplo, la iluminación 6250 puede incluir una iluminación verde. En algunas modalidades, las iluminaciones 6230 y 6250 pueden incluir longitudes de onda entre 500 nm y 1 mm. En algunas modalidades, las iluminaciones pueden incluir longitudes de onda entre 500 nm y 530 nm, entre 525 nm y 550 nm, entre 540 y 570 nm, entre 560 y 585 nm, entre 580 nm y 700 nm, entre 600 nm y 800 nm, entre 700 nm y 1 mm, y entre 850 nm y 1 μ m. La imagen 6245 puede usarse directamente para la detección de los fiduciales de la matriz 6220 o para ayudar en la detección de los fiduciales de la matriz 6220 en la imagen 6255. Si no hay un presunto desplazamiento en el sustrato de la muestra y el sustrato de la matriz uno con relación al otro o a uno o más dispositivo(s) de captura de imágenes 6235 entre la captura de imágenes en las diferentes iluminaciones, las localizaciones pueden considerarse dentro del mismo sistema de coordenadas y el procesador 5320 puede realizar la comparación para confirmarlo.

Las Figuras 63A-63B son imágenes que ilustran datos de imagen adquiridos con diferentes iluminaciones de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra en la Figura 63A, una iluminación IR puede maximizar el contraste de los fiduciales de la matriz 6305. Como se muestra en la Figura 63B, una iluminación verde puede maximizar el contraste de la muestra de un tejido 6310.

La Figura 64 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 6400 para detectar fiduciales asociados a una matriz mediante el uso de fiduciales del instrumento proporcionados en un aparato de manipulación de muestras de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El proceso 6400 puede realizarse con respecto a las modalidades descritas en relación con el proceso 5900 de la Figura 59. El aparato de manipulación de muestras puede incluir uno o más fiduciales del instrumento como se describe en relación con la Figura 41. Los fiduciales del instrumento pueden proporcionar marcas de alto contraste que son fácilmente visibles a través de muestras de tejido. Los datos de imagen de la matriz de la imagen de la matriz adquirida en la operación 5910 pueden incluir además un fiducial del instrumento configurado en el aparato de manipulación de muestras. De esta manera, puede determinarse la localización de los fiduciales del instrumento con relación a los fiduciales de la matriz.

En la operación 6410, el procesador 5320 puede recibir datos de imagen de la matriz, tal como en la operación 5920, que incluye un fiducial del instrumento en la imagen con la superposición de la muestra, la matriz y el fiducial de la matriz. La muestra puede oscurecer el fiducial de la matriz y el fiducial del instrumento en la superposición. De esta manera, puede determinarse la localización de los fiduciales del instrumento a la localización de la muestra. Es posible que los fiduciales de la matriz no sean fácilmente visibles si están cubiertos por la muestra.

En la operación 6420, el procesador 5320 puede determinar la localización del fiducial de la matriz con relación al fiducial del instrumento en los datos de imagen de la matriz capturados en la operación 5910 y ahora incluir el fiducial del instrumento en base al sistema de coordenadas usado en la operación 5910.

En la operación 6430, el procesador 5320 puede determinar la localización de la muestra con relación al fiducial del instrumento capturado en los datos de imagen de la matriz adquiridos en la operación 5910. La localización de la muestra con relación al fiducial del instrumento puede determinarse mediante el uso de los datos de imagen de la matriz adquiridos en la operación 6410. La localización de la muestra con relación al fiducial del instrumento puede determinarse mediante el uso de un segundo sistema de coordenadas, o sistema de coordenadas alternativo que es diferente al sistema de coordenadas usado para determinar la localización de los fiduciales de la matriz con relación a los fiduciales del instrumento en la operación 6420.

En la operación 6440, el procesador 5320 puede comparar la localización del fiducial de la matriz en la imagen de la matriz adquirida en la operación 5910 y además incluir el fiducial del instrumento con la localización de la muestra en la imagen de la matriz adquirida en la operación 6410. Dado que la localización de los fiduciales de la matriz se conoce con relación a la localización de la muestra, y la localización de los fiduciales del instrumento se conoce con relación a la localización del fiducial de la matriz, la localización de la muestra al fiducial de la matriz puede determinarse en base a las diferencias entre las localizaciones en los dos sistemas de coordenadas.

Las Figuras 65A-65B representan un flujo de trabajo 6500 para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen que incluyen fiduciales del instrumento proporcionados en un aparato de manipulación de muestras de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El flujo de trabajo 6500 puede realizarse con respecto a las modalidades descritas en relación con el proceso 5900 de la Figura 59. Como se muestra en la Figura 65A, un sustrato de la matriz 6505 que incluye un fiducial de la matriz 6510 puede posicionarse dentro o sobre un miembro de sujeción 6515 (correspondiente al miembro 410). El miembro de sujeción 6515 puede incluir uno más fiduciales del instrumento 6520. El dispositivo de captura de imágenes 6525 puede adquirir la imagen 6530 que incluye datos de imagen del fiducial de la matriz 6510 y el fiducial del instrumento 6520. Como se muestra en la Figura 65B, el dispositivo de captura de imágenes 6525 puede adquirir además datos de imagen que incluyen la imagen 6550 de la superposición 6535 que incluye la muestra 6545 superpuesta con el fiducial de la matriz 6510 y el fiducial del instrumento 6520. Los fiduciales de la matriz 6510 pueden oscurecerse o cubrirse por la muestra 6545, sin embargo,

la localización de los fiduciales de la matriz 6510 puede determinarse mediante el uso de los fiduciales del instrumento 6520 debido al alto contraste y visibilidad de los fiduciales del instrumento 6520 con relación a la muestra 6545.

La Figura 66 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 6600 para detectar fiduciales aplicados a un sustrato en el que se localiza una matriz de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El proceso 6600 puede realizarse con respecto a las modalidades descritas en relación con el proceso 5900 de la Figura 59.

En algunas modalidades, los fiduciales aplicados pueden incluir un sello, una etiqueta adhesiva, un separador, un dibujo, puntos impresos o un grabado láser aplicado y localizado sobre un sustrato en el que pueden localizarse la matriz y el fiducial de la matriz. Los separadores pueden aplicarse a un sustrato de la matriz para proporcionar control de flujo de un reactivo de permeabilización usado durante los procesos de permeabilización descritos en la presente descripción. Los separadores pueden proporcionar una cantidad de separación entre un sustrato de la matriz y un sustrato de muestra de manera que cuando el sustrato de la matriz y el sustrato de muestra se ponen en contacto, el separador puede funcionar para mantener la cantidad de separación entre los dos sustratos. Los separadores pueden incluir materiales de alto contraste que pueden ser visibles cuando se cubren u oscurecen por una muestra de tejido. Por ejemplo, en algunas modalidades, los separadores pueden incluir un material de grafito formado a partir de una lámina de grafito. El grafito es un material oscuro y puede proporcionar un separador de alto contraste sin requerir que se apliquen acabados de alto contraste adicionales al separador. En algunas modalidades, los separadores pueden incluir un acabado de alto contraste aplicado a un material separador. Por ejemplo, un acabado negro oscuro puede aplicarse a un material de poliéster transparente para crear un separador de alto contraste. Los separadores pueden fijarse al sustrato de la matriz para evitar el movimiento con relación al sustrato de la matriz durante la formación de la superposición formada cerrando el miembro de sujeción del sustrato 404 sobre el miembro de sujeción del sustrato 410. En algunas modalidades, los separadores pueden ser opacos.

En algunas modalidades, los fiduciales aplicados pueden formarse a partir de un material que incluye un colorante, un químico, un agente de contraste o una nanopartícula. Los fiduciales aplicados pueden configurarse para mejorar el contraste del fiducial cuando se oscurece por una muestra de tejido durante la obtención de imágenes para que sean más fácilmente visibles al ojo humano o a un dispositivo de captura de imágenes cuando se iluminan a longitudes de onda específicas. Por ejemplo, pueden usarse nanopartículas de oro de diferentes tamaños y formas para proporcionar diferentes contrastes a diferentes longitudes de onda. Los datos de imagen de la matriz de la imagen de la matriz adquirida en la operación 5910 pueden incluir además un fiducial aplicado al sustrato en el que se localizan la matriz y el fiducial de la matriz. De esta manera, puede determinarse la localización de los fiduciales aplicados con relación a los fiduciales de la matriz.

En la operación 6610, el procesador 5320 puede recibir datos de imagen, tal como en la operación 5920, que incluye además un fiducial aplicado que se ha aplicado al sustrato en el que se localizan la matriz y el fiducial de la matriz. De esta manera, puede determinarse la localización de los fiduciales aplicados con relación a los fiduciales de la matriz. Es posible que los fiduciales de la matriz no sean fácilmente visibles si están cubiertos por la muestra.

En la operación 6620, el procesador 5320 puede determinar la localización del fiducial de la matriz con relación al fiducial aplicado en los datos de imagen de la matriz capturados en la operación 5910 y ahora incluir el fiducial aplicado en base al sistema de coordenadas usado en la operación 5910.

En la operación 6630, el procesador 5320 puede determinar la localización de la muestra con relación al fiducial aplicado capturado en los datos de imagen de la matriz adquiridos en la operación 5910. La localización de la muestra con relación al fiducial aplicado puede determinarse mediante el uso de los datos de imagen de la matriz adquiridos en la operación 6610. La localización de la muestra con relación al fiducial aplicado puede determinarse mediante el uso de un segundo sistema de coordenadas, o sistema de coordenadas alternativo que es diferente del sistema de coordenadas usado para determinar la localización de los fiduciales de la matriz con relación a los fiduciales aplicados en la operación 6620.

En la operación 6640, el procesador 5320 puede comparar la localización del fiducial de la matriz en la imagen de la matriz adquirida en la operación 5910 y además incluir el fiducial aplicado con la localización de la muestra en la imagen de la matriz adquirida en la operación 6610. Dado que la localización de los fiduciales de la matriz se conoce con relación a la localización de la muestra, y la localización de los fiduciales aplicados se conoce con relación a la localización del fiducial de la matriz, la localización de la muestra al fiducial de la matriz puede determinarse en base a las diferencias entre las localizaciones en los dos sistemas de coordenadas.

Las Figuras 67A-67B representan un flujo de trabajo 6700 para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen que incluyen fiduciales aplicados a un sustrato en el que se localiza una matriz de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El flujo de trabajo 6700 puede realizarse con respecto a las modalidades descritas en el proceso 5900 de la Figura 59 y el proceso 6600 de la Figura 66. Como se muestra en la Figura 67A, el dispositivo de captura de imágenes 6720 (correspondiente al dispositivo de captura de imágenes 1720) puede adquirir datos de imagen que incluyen una imagen 6725. La imagen 6725 puede incluir un sustrato de la matriz 6705, un fiducial de la matriz 6710 y un fiducial de la matriz aplicada 6715 que se ha aplicado al sustrato de la matriz 6705. La

imagen 6725 puede usarse para determinar la posición de los fiduciales aplicados 6715 con relación a los fiduciales de la matriz 6710. En algunas modalidades, los fiduciales aplicados 6715

5 Como se muestra en la Figura 67B, el dispositivo de captura de imágenes 6720 puede adquirir datos de imagen de un dato de imagen que incluye la imagen 6745. La imagen 6745 puede incluir una superposición 6730 de la muestra 6740, el fiducial de la matriz 6710 y el fiducial de la matriz aplicada 6715. La imagen 6745 puede usarse para determinar la localización de la muestra 6740 con relación al fiducial de la matriz 6710 ya que se conoce la localización del fiducial aplicado 6715 con relación a la localización de la muestra 6740 y también se conoce la localización del fiducial aplicado 6716 con relación al fiducial de la matriz 6710.

10 Las Figuras 68A-68B representan un flujo de trabajo 6800 para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen adquiridos en relación con la permeabilización de la muestra de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El flujo de trabajo 6800 puede realizarse con respecto a las modalidades descritas en el proceso 5900 de la Figura 59. La permeabilización de la muestra mediante el uso del aparato de manipulación de muestras descrito en la presente descripción puede realizarse de acuerdo con las descripciones proporcionadas en relación con la Figura 3, Figuras. 29A-29C y Figuras 31A-31C. Como se muestra en la Figura 68A, el dispositivo de captura de imágenes 6825 (correspondiente al dispositivo de captura de imágenes 1720) puede adquirir datos de imagen de la superposición 6830 antes del inicio o cerca del comienzo de la permeabilización de la muestra cuando la superposición 6830 se ha formado inicialmente cerrando el miembro de sujeción del sustrato 404 sobre el miembro de sujeción del sustrato 410. La imagen 6835 puede incluir la muestra 6810 en alto contraste que oscurece las fiduciales de la matriz 6820.

25 Como se muestra en la Figura 68B, el dispositivo de captura de imágenes 6825 puede adquirir datos de imagen que incluyen la imagen 6845. La imagen 6845 puede adquirirse después de que se haya producido un período de permeabilización de la muestra 6810 en la superposición 6840. El período de permeabilización puede hacer además que la muestra se digiera, lo que puede resultar en que el fiducial de la matriz 6820 se vuelva más visible a mayor contraste en la imagen 6845.

30 La Figura 69 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 6900 para detectar fiduciales mediante el uso del registro de imagen de datos de imagen de muestra y datos de imagen de la matriz adquiridos en un aparato de manipulación de muestras que incluye separadores configurados en un sustrato de la matriz de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo, tales como las descritas en relación con las Figuras. 65. El proceso 6900 puede realizarse en relación con las modalidades descritas en el proceso 5900 de la Figura 59, el proceso 6600 de las Figuras 66, y el flujo de trabajo 6600 de las Figuras. 66A-66B. Pueden realizarse métodos y técnicas de registro de imágenes con respecto a las descripciones proporcionadas en la presente descripción en la sección IV: Dispositivos y métodos de registro de imágenes.

35 Como se muestra en la Figura 69, en la operación 6910 el procesador 5320 puede recibir datos de imagen de la matriz adquiridos a través del dispositivo de captura de imágenes 1720 e incluir una imagen del fiducial de la matriz como se adquirió en la operación 5910, descrita en relación con la Figura 59, y que incluye además al menos un separador. Una variedad de números, formas y disposiciones no limitantes de separadores pueden incluirse en el sustrato de la matriz y, por lo tanto, en los datos de imagen de la matriz.

40 En la operación 6920, el procesador 5320 puede realizar el registro de imagen como se describe en relación con la Figura 53 para registrar la imagen adquirida en la operación 5910, descrito en relación con la Figura 59, a la imagen adquirida en la operación 6910 al alinear la localización del fiducial de la matriz y la localización de la muestra en un sistema de coordenadas común que incluye el sistema de coordenadas aplicado por el procesador 5320 a la imagen adquirida en la operación 5910 descrita en relación con la Figura 59 y el segundo sistema de coordenadas aplicado por el procesador 5320 a la imagen adquirida en la operación 6910.

45 En la operación 6930, el procesador 5320 puede determinar la localización del fiducial de la matriz en la imagen adquirida en la operación 5910, descrita en relación con la Figura 59, en base al sistema de coordenadas común. En la operación 6940, el procesador 5320 puede determinar la localización de la muestra en la imagen adquirida en la operación 5910, descrita en relación con la Figura 59, en base al sistema de coordenadas común. En la operación 6950, el procesador 5320 puede comparar la localización del fiducial de la matriz en la imagen adquirida en la operación 5910 y la localización de la muestra en la imagen adquirida en la operación 6910 mediante el uso del sistema de coordenadas común. Las operaciones 6930-6950 pueden realizarse como se describió en relación con las operaciones 5930-5950 correspondientes a la descripción de la Figura 59, excepto como se señaló de cualquier otra manera en la presente descripción.

50 Las Figuras 70A-70B representan un flujo de trabajo 7000 para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen adquiridos y registrados mediante el uso de un aparato de manipulación de muestras que incluye separadores de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El flujo de trabajo 7000 puede realizarse con respecto a las modalidades descritas en el proceso 5900 descrito en relación con la Figura 59 y el proceso 6900 descrito en relación con la Figura 69. Como se muestra en la Figura 70A, el dispositivo de captura de imágenes 7020 (correspondiente al dispositivo de captura de imágenes 1720) puede adquirir datos de imagen que

incluyen una imagen 7025. La imagen 7025 puede incluir el separador 7015 además del fiducial de la matriz 7010. El separador 7015 puede tener un alto contraste y puede ser visible cuando se cubre por la muestra 7040.

5 Como se muestra en la Figura 70B, el dispositivo de captura de imágenes 7020 puede adquirir datos de imagen que incluyen una imagen 7045 de la superposición 7030. La imagen 7045 puede incluir el separador 7015 visible a través de la muestra 7040 que oscurece los fiduciales de la matriz 7010. De esta manera, el procesador 5320 puede realizar el registro de imagen entre la imagen 7025 y la imagen 7045 para determinar la localización de la localización del fiducial de la matriz en la imagen 7025 y la localización de la muestra en la imagen 7045 para comparar la localización del fiducial de la matriz 7010 y la localización de la muestra en la imagen 7045 como se describe en relación con las operaciones 6930-6950.

15 La Figura 71 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra un proceso de ejemplo 7100 para detectar fiduciales superpuestos con una muestra mediante el uso del registro de imagen de datos de imagen de muestra y datos de imagen de la matriz adquiridos en múltiples iluminaciones en un aparato de manipulación de muestras que incluye separadores de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El proceso 7100 puede realizarse con respecto a las modalidades descritas en el proceso 5900 descrito en relación con la Figura 59, flujo de trabajo 6200 descrito en relación con las Figuras 62A-62B, proceso 6600 descrito en relación con la Figura 66, y flujo de trabajo 6700 descrito en relación con las Figuras 67A-67B. El proceso 7100 puede realizarse para confirmar que la localización de la muestra y las localizaciones del fiducial permanecen sin cambios cuando las condiciones de iluminación han cambiado. Realizar el registro de la imagen con respecto a las localizaciones del separador puede ayudar a confirmar la localización de la muestra y la localización fiducial no ha cambiado. Si las posiciones del separador han cambiado, el registro de imagen puede usarse para determinar la localización de la muestra y la localización del fiducial en los datos de imagen recibidos.

25 Como se muestra en la Figura 71, en la operación 7110 el procesador 5320 puede recibir los datos de imagen de la matriz adquiridos en una primera iluminación y recibidos en la operación 5920. La imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación y recibida en la operación 5920 puede incluir la muestra superpuesta sobre un sustrato que incluye una matriz, un fiducial de la matriz, y al menos una porción de un separador visible en la imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación. El procesador 5320 puede recibir además datos de imagen de la matriz adicionales o posteriores que incluyen una imagen de la matriz adquirida en una segunda iluminación e incluye la muestra superpuesta sobre el sustrato que incluye la matriz, el fiducial de la matriz, y el separador. En algunas modalidades, los separadores en la primera imagen de la matriz y la segunda imagen de la matriz pueden ser opacos. El separador puede ser visible en la imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación debido a sus propiedades de contraste. La comparación de los datos de imagen de la matriz de la obtención de imágenes de matriz adquiridas en la primera y la segunda iluminaciones puede usarse para determinar las localizaciones de un fiducial de la matriz y una muestra mediante el uso de un sistema de coordenadas común.

40 En algunas modalidades, la primera y/o la segunda iluminaciones pueden seleccionarse para aumentar o disminuir una cantidad de contraste entre la muestra y el fiducial de la matriz. Por ejemplo, una primera iluminación puede mejorar el contraste de la muestra en comparación con el contraste del fiducial de la matriz. Una segunda iluminación puede mejorar el contraste del fiducial de la matriz en comparación con el contraste de la muestra. Las iluminaciones también pueden seleccionarse en base a las propiedades o características de iluminación descritas en relación con las Figuras 62A-62B y Figuras 63A-63B en la presente descripción.

45 En la operación 7120, el procesador 5320 puede determinar la localización del fiducial de la matriz en la imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación y recibida en la operación 5920 e incluir el separador visible en la imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación. La localización del fiducial de la matriz puede determinarse en la imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación en base a un primer sistema de coordenadas. En la operación 7130, el procesador puede determinar la localización de la muestra en la imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación y recibida en la operación 7110 en base a un segundo sistema de coordenadas. En algunas modalidades donde no hubo desplazamiento en el sustrato de muestra, el separador (o porción del mismo) y el sustrato de la matriz uno con relación al otro o a uno o más dispositivo(s) de captura de imágenes entre la captura de imágenes en la primera y segunda iluminaciones, el segundo sistema de coordenadas puede ser el mismo que el primer sistema de coordenadas, por ejemplo, puede ser un sistema de coordenadas común. En otras palabras, las localizaciones pueden considerarse dentro del mismo sistema de coordenadas y el procesador 5320 puede realizar la comparación para confirmarlo.

60 En algunas modalidades donde se produjo un desplazamiento en, por ejemplo, el separador o porción del mismo con relación al/los dispositivo(s) de captura de imágenes entre la captura de imágenes en la primera y segunda iluminaciones, el registro de imagen puede realizarse para transformar el segundo sistema de coordenadas en el primer sistema de coordenadas. Alternativamente, en algunas modalidades donde se produjo un desplazamiento en, por ejemplo, el separador o porción del mismo con relación al/los dispositivo(s) de captura de imágenes entre la captura de imágenes en la primera y segunda iluminaciones, el registro de imagen puede realizarse para transformar el primer sistema de coordenadas en el segundo sistema de coordenadas. Alternativamente, en algunas modalidades donde se produjo un desplazamiento en, por ejemplo, el separador o porción del mismo con relación al/los dispositivo(s) de

captura de imágenes entre la captura de imágenes en la primera y segunda iluminaciones, el registro de imagen puede realizarse para transformar el primer y segundo sistemas de coordenadas en un sistema de coordenadas común.

5 En la operación 7140, el procesador 5320 puede registrar la imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación en la operación 5920 que incluye el separador con la imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación y recibida en la operación 7110 alineando la localización del fiducial de la matriz y la localización de la muestra en el sistema de coordenadas común. El sistema de coordenadas común puede incluir el primer sistema de coordenadas y el segundo sistema de coordenadas y también puede incluir la localización del fiducial de la matriz y la localización de la muestra. Pueden realizarse métodos y técnicas de alineación con respecto a las descripciones proporcionadas en la presente descripción en la Sección III: Dispositivos y métodos de alineación de muestras y matrices. Pueden realizarse métodos y técnicas de registro de imágenes con respecto a las descripciones proporcionadas en la presente descripción en la sección IV: Dispositivos y métodos de registro de imágenes.

15 En algunas modalidades, tal como cuando no hubo desplazamiento en el sustrato de la muestra, el separador (o porción del mismo) y el sustrato de la matriz uno con relación al otro o a uno o más dispositivo(s) de captura de imágenes entre la captura de imágenes en la primera y segunda iluminaciones, y el segundo sistema de coordenadas puede ser el mismo que el primer sistema de coordenadas, por ejemplo, puede ser un sistema de coordenadas común, la operación 7140 puede omitirse opcionalmente ya que no se necesita registro de imagen. En otras palabras, el primer sistema de coordenadas y el segundo sistema de coordenadas pueden considerarse como el mismo sistema de coordenadas porque no hay ningún cambio en la localización del fiducial de la matriz y/o la muestra.

25 En la operación 7150, el procesador 5320 puede determinar la localización del fiducial de la matriz en la imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación y recibida en la operación 5920 que incluye el separador en base al sistema de coordenadas común. En la operación 7160, el procesador 5320 puede determinar la localización de la muestra en la imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación y recibida en la operación 7110 en base al sistema de coordenadas común. En la operación 7170, el procesador 5320 puede comparar la localización del fiducial de la matriz en la imagen de la matriz adquirida en la primera iluminación y recibida en la operación 5920 que incluye el separador y la localización de la muestra en la imagen de la matriz adquirida en la segunda iluminación y recibida en la operación 7110 mediante el uso del sistema de coordenadas común. De esta manera, puede proporcionarse la localización de los fiduciales de la matriz con relación a la localización de la muestra.

En algunas modalidades, las operaciones del proceso 6900 descritas en relación con la Figura 69 y las operaciones del proceso 7100 descritas en relación con la Figura 71 pueden combinarse.

35 Las Figuras 72A-72B representan un flujo de trabajo 7200 para detectar fiduciales de la matriz solapados con una muestra en datos de imagen adquiridos y registrados en múltiples iluminaciones mediante el uso de un aparato de manipulación de muestras que incluye separadores de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. El flujo de trabajo 7200 puede realizarse con respecto a modalidades del proceso 5900 descritas en relación con la Figura 59, modalidades del flujo de trabajo 6200 descritas en relación con la Figura 62, y modalidades del proceso 7100 descritas en relación con la Figura 71.

45 Como se muestra en la Figura 72A, el dispositivo de captura de imágenes 7235 (correspondiente al dispositivo de captura de imágenes 1720) puede adquirir datos de imagen que incluyen la imagen 7250. La imagen 7250 puede incluir una superposición 7230 de la muestra 7210, el fiducial de la matriz 7220 y el separador 7225. La imagen 7250 puede iluminarse mediante una fuente de luz 7240 que proporciona una iluminación 7245. Por ejemplo, la iluminación 7245 puede incluir una longitud de onda roja o infrarroja (IR) para maximizar el contraste de los fiduciales de la matriz 7220. Por ejemplo, una iluminación entre 550 nm y 1 μ m puede maximizar el contraste del fiducial de la matriz con relación al contraste de una muestra teñida con eosina, ya que la banda de absorción asociada con la tinción con eosina es de 440 nm a ~550 nm. El separador de alto contraste 7220 también puede ser visible en la imagen 7250.

50 Como se muestra en la Figura 72B, el dispositivo de captura de imágenes puede adquirir datos de imagen que incluyen la imagen 7265. La imagen 7265 puede incluir una superposición de la muestra 7210, el fiducial de la matriz 7220, y el separador 7225. La imagen 7265 puede iluminarse mediante una fuente de luz 7240 que proporciona iluminación 7260. Por ejemplo, la iluminación 7260 puede incluir una longitud de onda verde para maximizar el contraste de la muestra 7210. En algunas modalidades, puede configurarse más de una fuente de luz 7240 en el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000. En la imagen 7265, el separador 7225 y la muestra 7210 son visibles, mientras que los fiduciales de la matriz 7220 no son visibles cuando se cubren por la muestra 7210. En algunas modalidades, las iluminaciones 7245 y 7260 pueden incluir longitudes de onda entre 500 nm y 1 mm. En algunas modalidades, las iluminaciones pueden incluir longitudes de onda entre 500 nm y 530 nm, entre 525 nm y 550 nm, entre 540 y 570 nm, entre 560 y 585 nm, entre 580 nm y 700 nm, entre 600 nm y 800 nm, entre 700 nm y 1 mm, y entre 850 nm y 1 μ m.

65 Las Figuras 73A-73C son imágenes que ilustran modalidades de datos de imagen adquiridos en diferentes iluminaciones por el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 300 para su uso en procesos y técnicas de registro de imágenes descritas en relación con modalidades descritas en las Figuras. 62A-62B y Figuras 72A-72B de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra en la Figura 73A, puede adquirirse una imagen

que incluye un fiducial de la matriz 7305. En la Figura 73B, puede adquirirse una imagen con una iluminación verde para maximizar un contraste entre la muestra 7310 y el fiducial de la matriz 7305. En la Figura 73C, una imagen puede adquirirse con una iluminación roja o infrarroja (IR) para maximizar un contraste de los fiduciales de la matriz 7305.

5 Las Figuras 74A-74B son imágenes que ilustran modalidades adicionales de datos de imagen adquiridos en diferentes iluminaciones por el aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 300 para su uso en procesos y técnicas de registro de imágenes descritas en relación con modalidades descritas en las Figuras. 62A-62B y Figuras 72A-72B de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra en la Figura 74A, los fiduciales de la matriz pueden detectarse en una imagen donde los fiduciales de la matriz 7405 son visibles dentro de la imagen. En la Figura 74B, el registro de imagen puede realizarse en datos de imagen que incluyen imágenes que contienen un separador. En la Figura 74C, una trama de fiduciales de la matriz 7405 puede superponerse sobre una muestra 7410.

15 En algunas modalidades, las localizaciones del fiducial de la matriz detectadas en los datos de imagen adquiridos pueden registrarse con las localizaciones de las fiduciales de la matriz identificadas en un archivo de datos, tal como un archivo .gpr. En función del registro de imagen, se puede asignar un error de registro para cada fiducial de la matriz. En algunas modalidades, las localizaciones del fiducial de la matriz detectadas en los datos de imagen de baja resolución adquiridos pueden registrarse con las localizaciones del fiducial de la matriz detectadas en los datos de imagen de alta resolución adquiridos. En función del registro de imagen, se puede asignar un error de registro para cada fiducial de la matriz. Las iluminaciones monocromáticas pueden usarse para datos de imagen adquiridos sin contribuir a errores de registro.

25 Las Figuras 75A-75D son gráficos que ilustran datos de ejemplos asociados con errores de registro y posición usados para verificar los procesos y técnicas de registro de imagen descritos en la presente descripción de acuerdo con algunas implementaciones de ejemplo. Como se muestra en las Figuras 75A-75B, los gráficos para dos muestras diferentes de datos de imagen (por ejemplo, "C1" y "D1") ilustran los recuentos de errores de registro (eje x) en función del tamaño del error de registro (eje y) en μm para imágenes de alta resolución e imágenes de baja resolución. Como se muestra en las Figuras 75A-75B, los recuentos de errores de registro son similares para imágenes de alta y baja resolución cuando se usa un sensor monocromático de 12 M (por ejemplo, un sensor de 3 k) con un aumento de 0,4. Como se muestra en las Figuras 75C-75D, los gráficos para dos muestras diferentes de datos de imagen (por ejemplo, "C1" y "D1") ilustran el recuento de errores de registro frente a posición (eje x) en función del tamaño del error (eje y) en μm para imágenes de alta resolución e imágenes de baja resolución. Como se muestra en las Figuras 75C-75D, la mayoría de los errores son menores o iguales a 1 píxel (por ejemplo, $\sim 4,5\ \mu\text{m}$) con un aumento de 0,4 para los datos de imagen adquiridos a alta resolución y baja resolución mediante el uso del sensor monocromático de 12 M.

35 La Figura 76 representa un flujo de trabajo de ejemplo 7600 para la captura de imágenes y vídeo por un aparato de manipulación de muestras descrito en la presente descripción. El flujo de trabajo 7600 comienza una vez que los sustratos que incluyen una muestra y una matriz se cargan en el aparato de manipulación de muestras. Un usuario puede iniciar el flujo de trabajo pulsando un botón de "inicio" en el aparato de manipulación de muestras. En algunas modalidades, el inicio del flujo de trabajo 7600 puede controlarse programáticamente mediante un dispositivo informático acoplado comunicativamente al aparato de manipulación de muestras.

45 En 7610, después del cierre de la tapa, se captura una imagen previa al intercalado del portaobjetos de matriz. Se pueden capturar varias imágenes en este momento. En algunas modalidades, las imágenes de la muestra sobre el primer sustrato superpuestas sobre la matriz sobre el segundo sustrato se adquieren en una o más iluminaciones, tales como iluminación que incluye longitudes de onda asociadas con luz roja, verde o azul. En algunas modalidades, las imágenes se adquieren a una o más resoluciones, tal como una resolución completa. Por ejemplo, una resolución completa puede incluir una resolución asociada con las capacidades de resolución según diseño del dispositivo que adquiere la imagen, tal como una resolución de 3000 x 3000 píxeles. En algunas modalidades, las imágenes se adquieren con uno o más aumentos, tales como un aumento de 0,4. Un aumento de 0,4 puede interpretarse para indicar que un objeto de 1 cm puede captarse como un objeto de 0,4 cm en el plano del sensor que adquiere la imagen. En algunas modalidades, las imágenes se adquieren en un formato de archivo de imagen de etiqueta multicapa (TIFF). En algunas modalidades, las imágenes se adquieren durante un período de tiempo, tal como 3-5 segundos. La adquisición de imágenes durante 7610 puede permitir la determinación de la capacidad de servicio del aparato de manipulación de muestras, y la carga adecuada del portaobjetos, así como la identificación y registro de las condiciones de inicio antes del intercalado. Después de 7610, el aparato de manipulación de muestras comienza a traer el primer sustrato que incluye una muestra junto con el segundo sustrato que incluye la matriz para iniciar el proceso de intercalado.

60 En 7620, comienza el proceso de cierre del intercalado y alineación del intercalado. Se adquiere un vídeo del proceso de cierre del intercalado. En algunas modalidades, el vídeo se adquiere a una velocidad de tramas predeterminada, tal como 30 tramas por segundo (fps). En algunas modalidades, el vídeo se adquiere en una o más iluminaciones, tal como una iluminación que incluye una longitud de onda asociada con una luz verde. En algunas modalidades, el vídeo se adquiere a una o más resoluciones, tales como una resolución de 1000 píxeles x 1000 píxeles, que puede ser una resolución que es menor que las capacidades de resolución según diseño del sensor que adquiere la obtención de imágenes. En algunas modalidades, el vídeo se adquiere en uno o más formatos de vídeo, tal como un formato de audio entrelazado de vídeo (AVI). El archivo de vídeo con formato AVI puede incluir datos de vídeo que se comprimen

mediante el uso de uno o más esquemas de compresión, tal como un esquema comprimido JPEG. En algunas modalidades, el vídeo se adquiere por un período de tiempo, tal como 10 segundos. La adquisición de vídeo durante 7620 puede ayudar a determinar la capacidad de servicio del aparato de manipulación de muestras.

5 En 7630, pueden adquirirse imágenes de los portaobjetos alineados. En algunas modalidades, la obtención de imágenes de la muestra en el primer sustrato alineado sobre la matriz en el segundo sustrato se adquieren en una o más iluminaciones, tales como iluminaciones que incluyen longitudes de onda asociadas con luz roja, verde o azul. En algunas modalidades, las imágenes se adquieren a una o más resoluciones, tal como una resolución completa como se describió anteriormente en relación con 7610. En algunas modalidades, las imágenes se adquieren en un formato TIFF multicapa. En algunas modalidades, las imágenes se adquieren durante un período de tiempo, tal como 3-5 segundos. La adquisición de imágenes durante 7630 puede permitir la determinación de la salida del ensayo que se realiza.

15 En 7640, se adquiere un vídeo que captura el período de tiempo en el que el primer sustrato que incluye la muestra se intercala con el segundo sustrato que incluye la matriz. El vídeo del temporizador de intercalado puede asociarse con un período de permeabilización realizado durante el ensayo. En algunas modalidades, el vídeo se adquiere a una velocidad de tramas predeterminada, tal como 0,5 fps. En algunas modalidades, el vídeo se adquiere en una o más iluminaciones, tal como una iluminación que incluye una longitud de onda asociada con una luz verde. En algunas modalidades, el vídeo se adquiere a una o más resoluciones, tales como una resolución de 1000 píxeles x 1000 píxeles como se describió anteriormente en relación con 7520. En algunas modalidades, el vídeo se adquiere en uno o más formatos de vídeo, tal como un formato AVI. El archivo de vídeo con formato AVI puede incluir datos de vídeo que se comprimen mediante el uso de uno o más esquemas de compresión, tal como un esquema comprimido JPEG. En algunas modalidades, el vídeo se adquiere durante un período de tiempo, tal como ~30 minutos. En algunas modalidades, el vídeo se adquiere durante un período de tiempo entre 1-90 minutos. La adquisición de vídeo durante 25 7640 puede ayudar a determinar la capacidad de servicio del aparato de manipulación de muestras.

En 7650, las imágenes pueden adquirirse al final del proceso de intercalado. Se pueden capturar varias imágenes en este momento. En algunas modalidades, las imágenes de la muestra sobre el primer sustrato superpuestas sobre la matriz sobre el segundo sustrato se adquieren en una o más iluminaciones, tales como iluminación que incluye longitudes de onda asociadas con luz roja, verde o azul. En algunas modalidades, las imágenes se adquieren a una o más resoluciones, tal como una resolución completa como se describió anteriormente en relación con 7610. En algunas modalidades, las imágenes se adquieren con uno o más aumentos, tales como un aumento de 0,4 como se describió anteriormente en relación con 7610. En algunas modalidades, las imágenes se adquieren en un TIFF multicapa. En algunas modalidades, las imágenes se adquieren durante un período de tiempo, tal como 3-5 segundos. La adquisición de imágenes durante el 7650 puede permitir la determinación de la capacidad de servicio del aparato de manipulación de muestras y la identificación y registro de las condiciones del intercalado antes de abrir el intercalado.

40 Aunque los flujos de trabajo 1700, 1800, 2900, 3100 y 7600 se muestran y describen con respecto al aparato de manipulación de muestras 400, los flujos de trabajo 1700, 1800, 2900, 3100 y 7600 también pueden realizarse con respecto al aparato de manipulación de muestras 1400, el aparato de manipulación de muestras 3000 u otro aparato de manipulación de muestras de acuerdo con las implementaciones descritas en la presente descripción. En algunas modalidades, los procesos 1900, 2300, 2500, 2700, 2800 y 3000 también pueden realizarse con respecto al aparato de manipulación de muestras 1400, el aparato de manipulación de muestras 3000, u otro aparato de manipulación de muestras de acuerdo con las implementaciones descritas en la presente descripción.

Los procesos y flujos de trabajo espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) descritos en la presente descripción pueden configurarse para mostrar información de expresión génica sobre imágenes de muestra de alta resolución. Las localizaciones con código de barras dentro de una matriz de reactivos pueden capturar transcritos de una muestra que está en contacto con la matriz. Los transcritos capturados pueden usarse en el procesamiento posterior aguas abajo. La determinación de la localización de las localizaciones con código de barras de la matriz de reactivos con relación a la muestra puede realizarse mediante el uso de marcadores fiduciales colocados sobre un sustrato en el que se localiza la matriz de reactivos. Las localizaciones con código de barras pueden visualizarse con la muestra para generar datos espacialómicos (por ejemplo, transcriptómicos espaciales) para la muestra.

55 La generación de datos de imagen adecuados para el análisis espacialómico (por ejemplo, transcriptómico espacial) puede verse afectada por la alineación relativa de una muestra con las regiones con código de barras de la matriz de reactivos. Las matrices de alta resolución para la espacialomía (por ejemplo, la transcriptómica espacial) pueden requerir la resolución de las localizaciones con código de barras inferidas superpuestas sobre una imagen de muestra de alta resolución para asociar correctamente los transcritos capturados con la célula particular de la que se originaron los transcritos. El aparato de manipulación de muestras 400, 1400 y 3000 puede configurarse para realizar los procesos de registro de imágenes y flujos de trabajo descritos en la presente descripción para proporcionar un nivel de precisión para alinear la imagen de muestra y la imagen de la matriz dentro de +/- 1-5 micras, +/- 1-10 micras, +/- 1-20 micras o 1-30 +/- micras.

65

Uno o más aspectos o características descritas en el presente documento pueden realizarse en circuitos electrónicos digitales, circuitos integrados, ASIC especialmente diseñados, conjuntos de puertas programables en campo (FPGA), hardware de computadora, firmware, software y/o combinaciones de los mismos. Estos diversos aspectos o características pueden incluir la implementación en uno o más programas informáticos que son ejecutables y/o interpretables en un sistema programable que incluye al menos un procesador programable, que puede ser de propósito especial o general, acoplado para recibir datos e instrucciones de, y para transmitir datos e instrucciones a, un sistema de almacenamiento, al menos un dispositivo de entrada, y al menos un dispositivo de salida. El sistema programable o sistema informático puede incluir clientes y servidores. Un cliente y un servidor son generalmente remotos entre sí e interactúan típicamente a través de una red de comunicación. La relación del cliente y el servidor surge en virtud de programas informáticos que se ejecutan en los ordenadores respectivos y que tienen una relación cliente-servidor entre sí.

Estos programas informáticos, que también pueden denominarse programas, software, aplicaciones de software, aplicaciones, componentes o código, incluyen instrucciones de la máquina para un procesador programable, y pueden implementarse en un lenguaje de programación de procedimiento y/u orientado a objetos de alto nivel, y/o en lenguaje de ensamblador/máquina. Como se usa en la presente descripción, el término "medio legible por máquina" se refiere a cualquier producto, aparato y/o dispositivo de programa informático, tal como por ejemplo discos magnéticos, discos ópticos, memoria, y Dispositivos Lógicos Programables (PLD), usados para proporcionar instrucciones y/o datos de la máquina a un procesador programable, que incluye un medio legible por máquina que recibe instrucciones de la máquina como una señal legible por máquina. El término "señal legible por máquina" se refiere a cualquier señal usada para proporcionar instrucciones y/o datos de la máquina a un procesador programable. El medio legible por máquina puede almacenar tales instrucciones de la máquina de manera no transitoria, tal como por ejemplo una memoria de estado sólido no transitoria o un disco duro magnético o cualquier medio de almacenamiento equivalente. El medio legible por máquina puede almacenar alternativa o adicionalmente tales instrucciones de la máquina de manera transitoria, tal como por ejemplo, como lo haría una memoria caché del procesador u otra memoria de acceso aleatorio asociada con uno o más núcleos de procesador físicos.

Para proporcionar la interacción con un usuario, uno o más aspectos o características del tema descrito en la presente descripción pueden implementarse en un ordenador que tiene un dispositivo de visualización, tal como por ejemplo un tubo de rayos catódicos (CRT) o una pantalla de cristal líquido (LCD) o un monitor de diodo emisor de luz (LED) para mostrar información al usuario y un teclado y un dispositivo señalador, tal como por ejemplo un ratón o una bola de seguimiento, mediante el cual el usuario puede proporcionar información al ordenador. También pueden usarse otros tipos de dispositivos para proporcionar la interacción con un usuario. Por ejemplo, la retroalimentación proporcionada al usuario puede ser cualquier forma de retroalimentación sensorial, tal como por ejemplo retroalimentación visual, retroalimentación auditiva o retroalimentación táctil; y la entrada del usuario puede recibirse en cualquier forma, incluida la entrada acústica, de voz o táctil. Otros posibles dispositivos de entrada incluyen pantallas táctiles u otros dispositivos sensibles al tacto tales como almohadillas de pista resistivas o capacitivas de punto único o múltiple, hardware y software de reconocimiento de voz, escáneres ópticos, punteros ópticos, dispositivos de captura de imágenes digital y software de interpretación asociado, y similares.

Aunque las modalidades se han descrito anteriormente con fines de ejemplos, la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para alinear una muestra biológica con una matriz de reactivos, el método que comprende:
 5 recibir, por un procesador de datos, datos de imagen de muestra que comprenden una imagen de muestra de la muestra biológica, la imagen de muestra que tiene una primera resolución;
 recibir, por el procesador de datos, datos de imagen de la matriz que comprenden una imagen de la matriz que comprende una superposición de una matriz de reactivos y una trama del fiducial de matriz con la muestra biológica, la imagen de la matriz que tiene una segunda resolución menor que la primera resolución de la imagen de muestra, en donde la trama del fiducial de matriz comprende una pluralidad de fiduciales de la matriz individuales en una disposición con patrones que rodea la matriz de reactivos;
 10 registrar, por el procesador de datos, la imagen de muestra con la imagen de la matriz alineando la imagen de muestra y la imagen de la matriz mediante el uso de la trama del fiducial de matriz;
 generar, por el procesador de datos, una imagen alineada en base al registro, la imagen alineada que comprende una superposición de la imagen de muestra con la matriz de reactivos; y
 15 proporcionar, por el procesador de datos, la imagen alineada.
2. El método de la reivindicación anterior, en donde los datos de imagen de muestra se reciben de un usuario o de un dispositivo informático remoto del procesador de datos.
- 20 3. El método de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde la imagen alineada comprende además la trama del fiducial de la matriz alineado con la muestra biológica.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la imagen de muestra es de la muestra biológica sobre un primer sustrato que comprende un borde, en donde, opcionalmente, un fiducial de la muestra comprende el borde.
- 25 5. El método de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde la imagen de muestra comprende además un fiducial de la muestra que delinea un área de muestra en la que la muestra se coloca sobre un sustrato de muestra.
- 30 6. El método de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde una localización de la trama del fiducial de la matriz se usa para determinar las posiciones de una pluralidad de puntos con código de barras compuestos en la matriz de reactivos con relación a una localización de la muestra biológica.
7. El método de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde la muestra biológica se localiza sobre un primer sustrato y la matriz de reactivos se localiza sobre un segundo sustrato.
- 35 8. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde el fiducial de la muestra se localiza en un primer lado del primer sustrato, el primer lado del primer sustrato opuesto a un segundo lado del primer sustrato en el que se localiza la muestra biológica y la imagen de la matriz se adquiere a una profundidad de campo adecuada para adquirir la muestra biológica y el fiducial de la muestra en el mismo plano focal.
- 40 9. El método de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde la trama del fiducial de la matriz se localiza en un primer lado de un segundo sustrato, el primer lado del segundo sustrato opuesto a un segundo lado del segundo sustrato en el que se localiza la matriz de reactivos.
- 45 10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en donde la trama del fiducial de la matriz se localiza en el mismo lado del segundo sustrato que se localiza la matriz de reactivos.
- 50 11. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en donde el fiducial de la muestra se localiza en el primer sustrato adyacente a, dentro de o distante de la muestra biológica.
12. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en donde la trama del fiducial de la matriz se localiza en el segundo sustrato adyacente a, dentro de o distante de un reactivo configurado en el segundo sustrato.
- 55 13. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7-12, en donde el primer sustrato comprende uno o más fiduciales de la muestra y/o el segundo sustrato comprende uno o más fiduciales de la matriz.
14. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la imagen de la matriz se adquiere de manera que una porción de la matriz de reactivos se superpone sobre una porción de la muestra biológica en base a una localización de la trama del fiducial de la matriz y/o el fiducial de la muestra.
- 60 15. Un sistema para alinear una muestra biológica con una matriz de reactivos, el sistema que comprende:
 un portamuestras que comprende
 65 un primer mecanismo de retención configurado para retener un primer sustrato recibido dentro del primer mecanismo de retención, el primer sustrato comprende una muestra biológica, y

un segundo mecanismo de retención configurado para retener un segundo sustrato recibido dentro del segundo mecanismo de retención, el segundo sustrato que comprende una matriz de reactivos, el portamuestras configurado para ajustar una localización del primer sustrato con relación al segundo sustrato para hacer además que toda o una porción de la muestra biológica se alinee con la matriz de reactivos;

5 un microscopio acoplado operativamente al portamuestras, el microscopio se configura para ver el primer sustrato y el segundo sustrato dentro del portamuestras; y adquirir datos de imagen asociados con la muestra biológica y/o la matriz de reactivos; y

10 un primer dispositivo informático acoplado comunicativamente al microscopio y al portamuestras, el dispositivo informático comprende una pantalla, un procesador de datos y un medio de almacenamiento legible por ordenador no transitorio que almacena instrucciones legibles y ejecutables por ordenador, que cuando se ejecutan hacen que el procesador de datos realice operaciones que comprenden

recibir datos de imagen de muestra que comprenden una imagen de muestra de la muestra biológica, la imagen de muestra que tiene una primera resolución;

15 recibir datos de imagen de la matriz que comprenden una imagen de la matriz que tiene una segunda resolución menor que la primera resolución de la imagen de muestra, la imagen de la matriz que comprende la matriz de reactivos y una trama del fiducial de la matriz superpuesta sobre la muestra biológica, en donde la trama del fiducial de la matriz comprende una pluralidad de fiduciales de la matriz individuales en una disposición con patrones que rodea la matriz de reactivos;

20 registrar la imagen de muestra con la imagen de la matriz alineando la imagen de muestra y la imagen de la matriz mediante el uso de la trama del fiducial de matriz;

generar una imagen alineada en base al registro, la imagen alineada que comprende la muestra alineada con la matriz; y

proporcionar la imagen alineada.

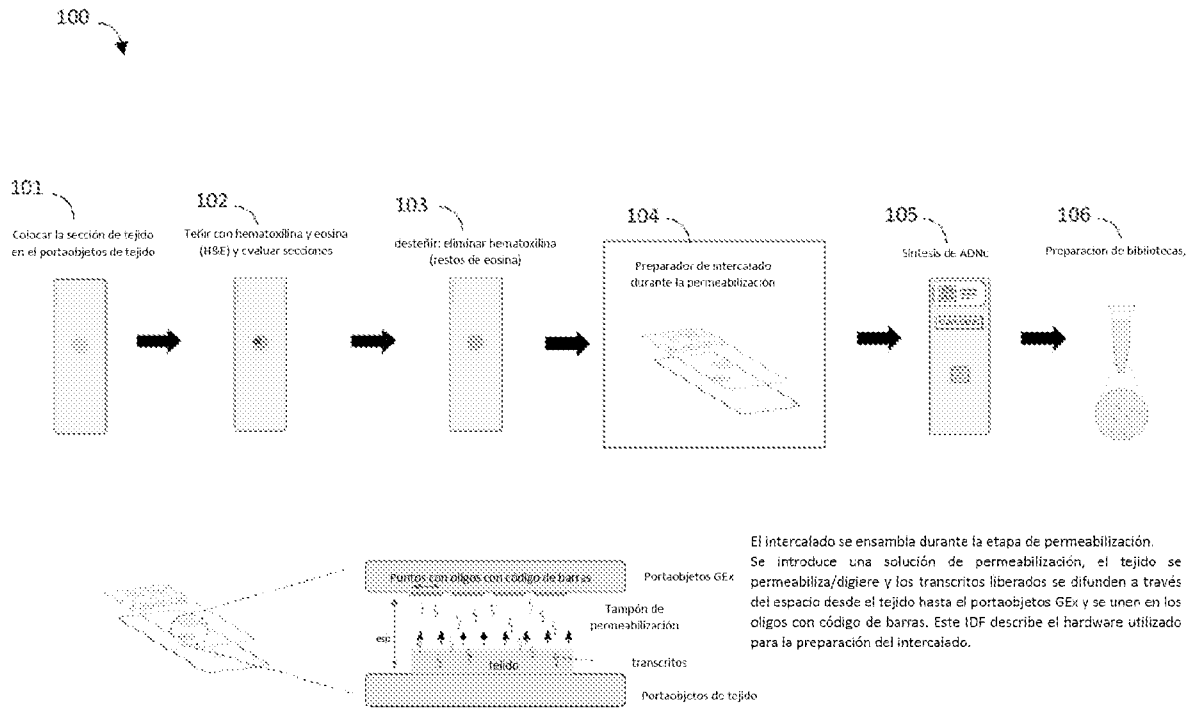


Figura 1

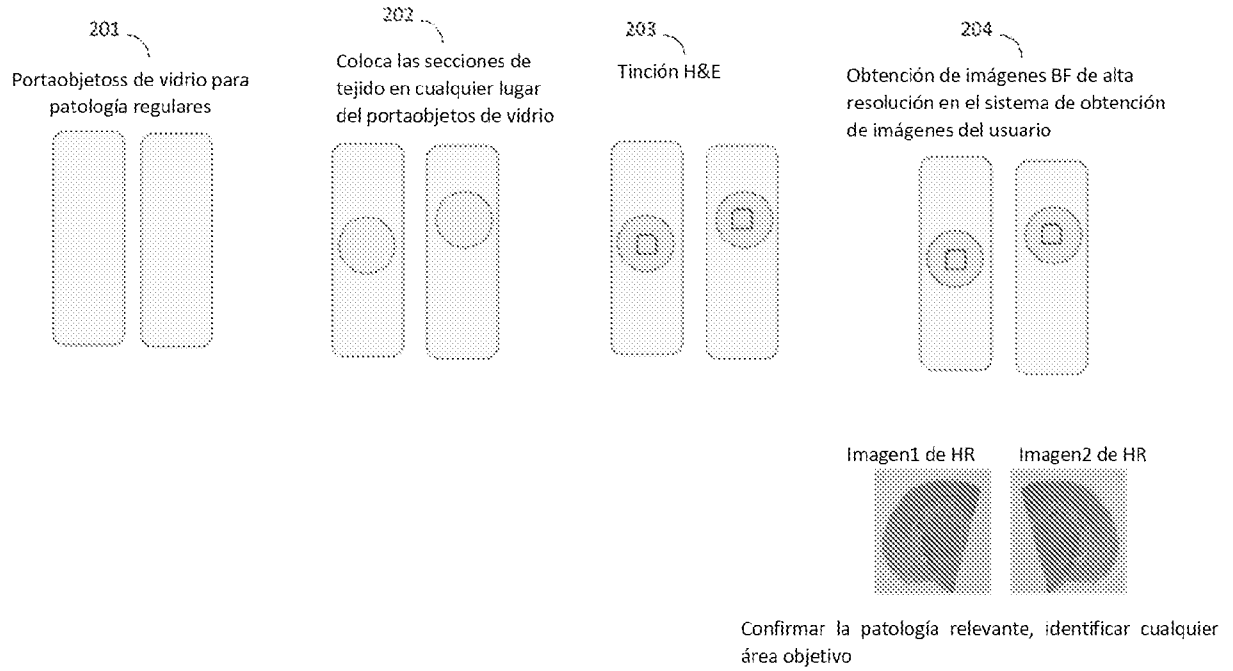


Figura 2

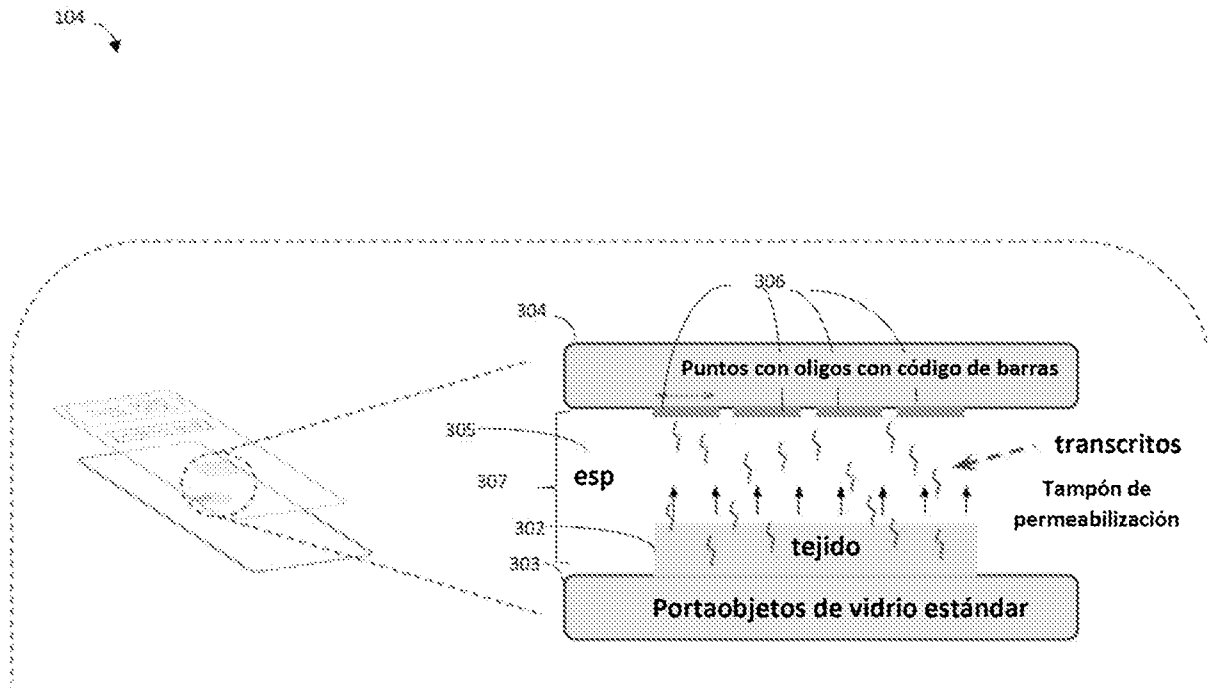


Figura 3

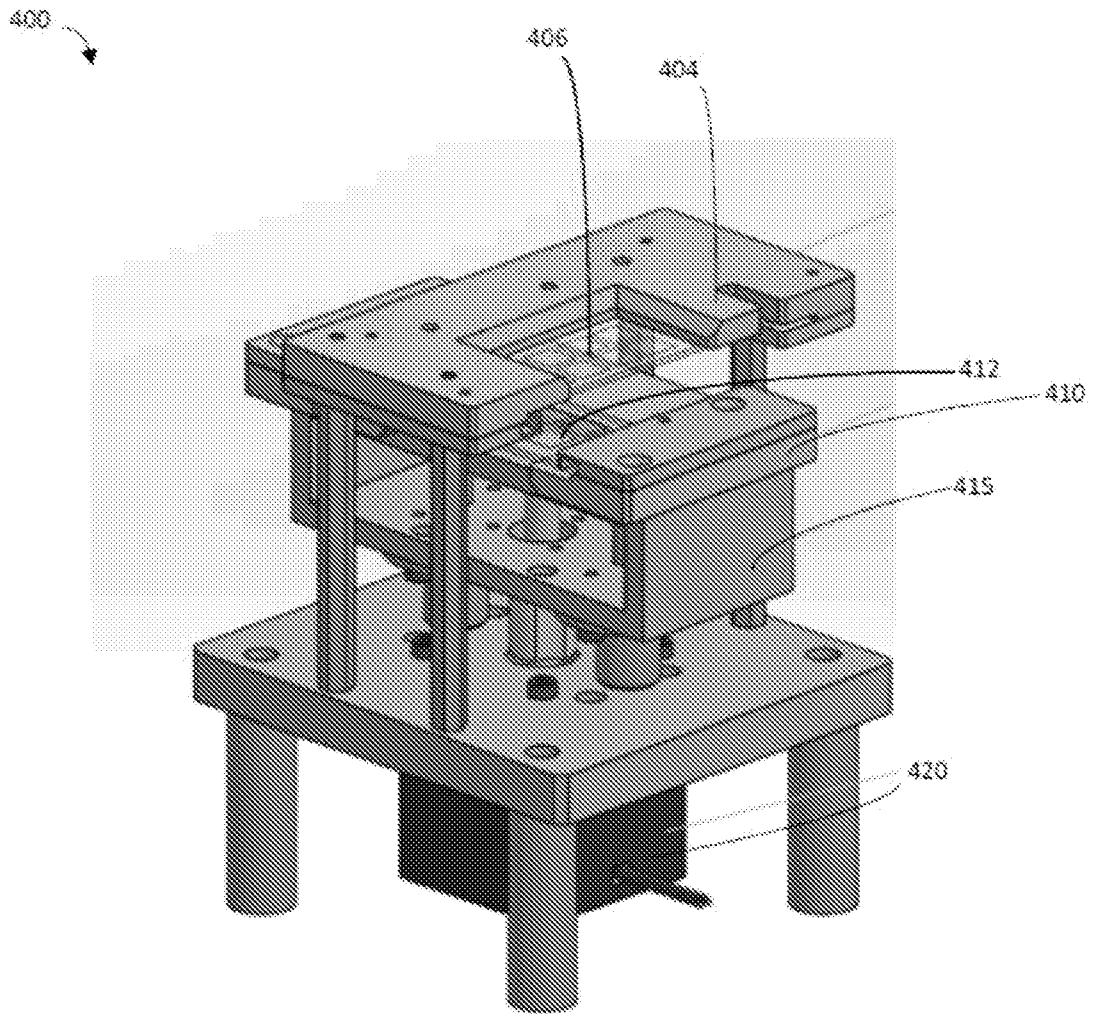


Figura 4

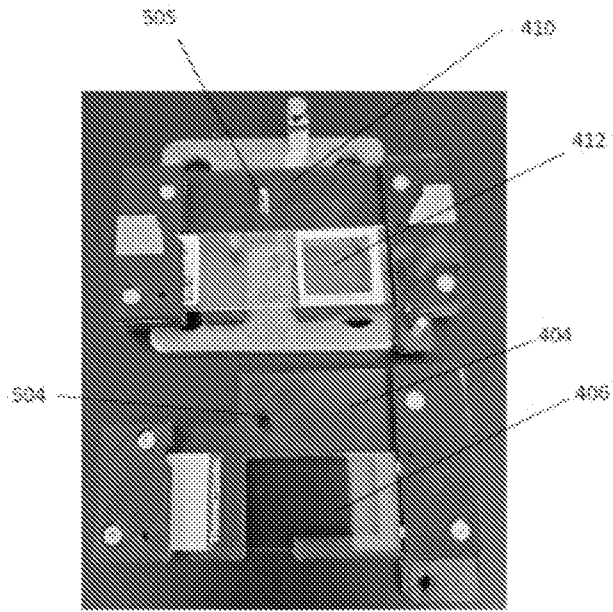


Figura 5A

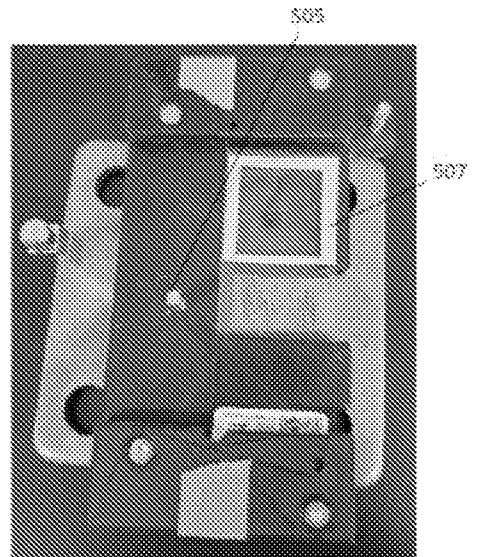


Figura 5B

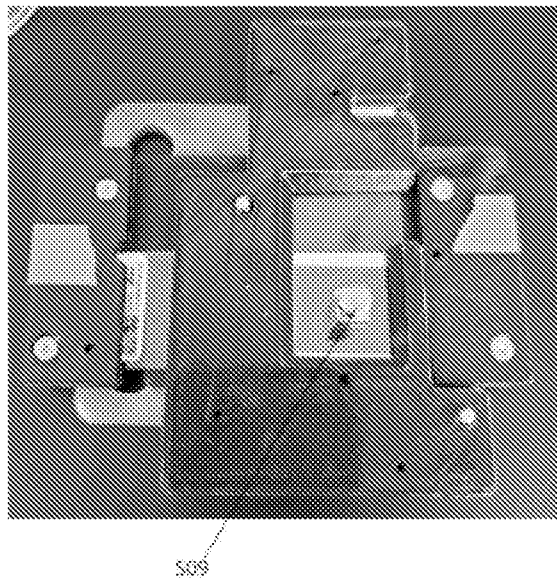


Figura 5C

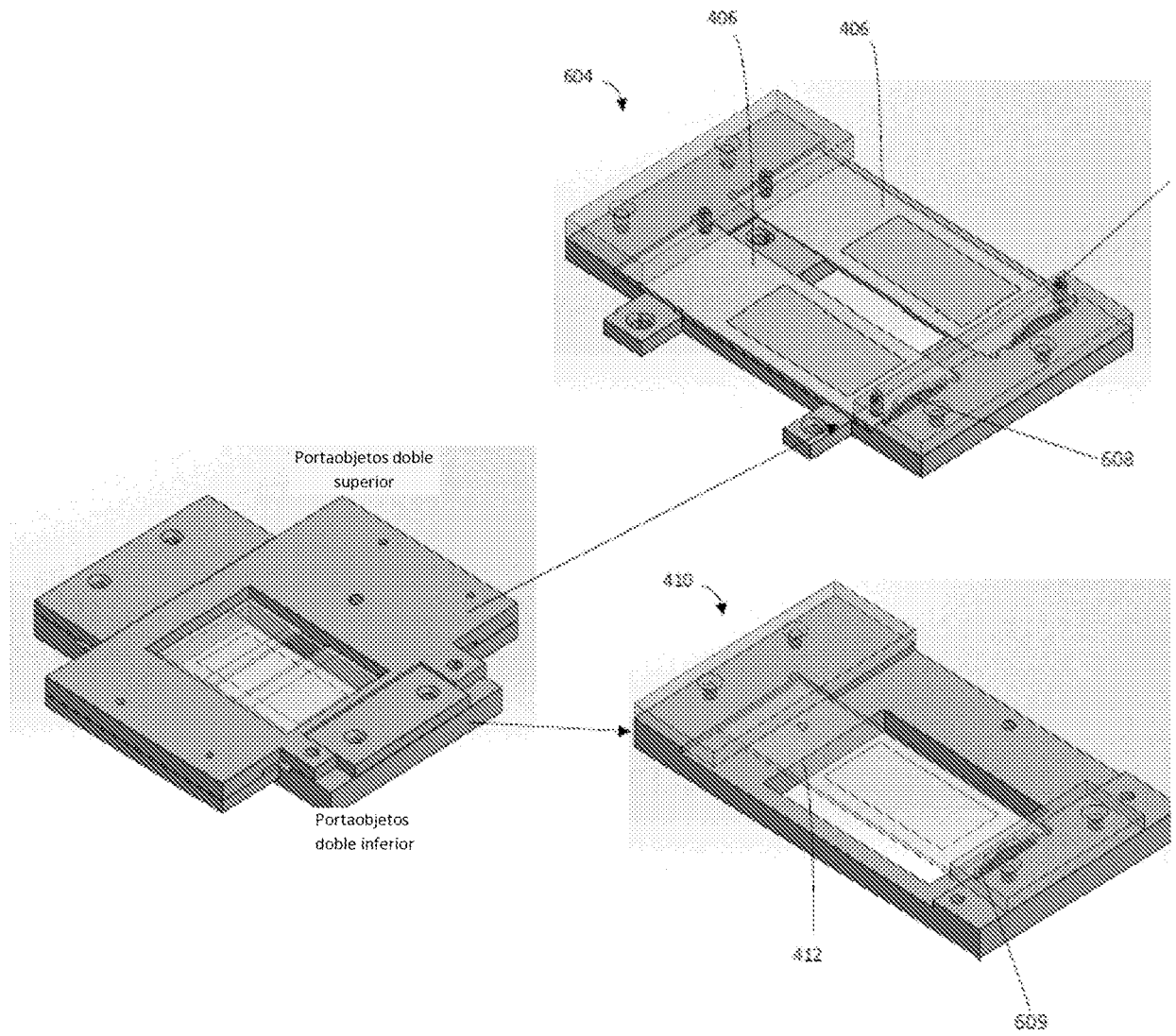


Figura 6

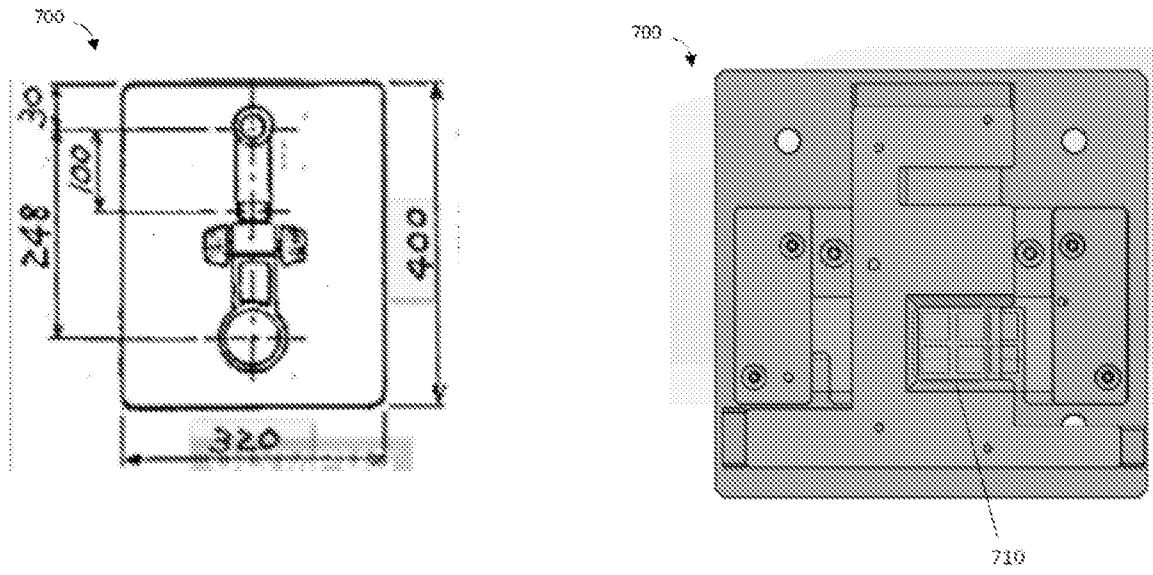


Figura 7

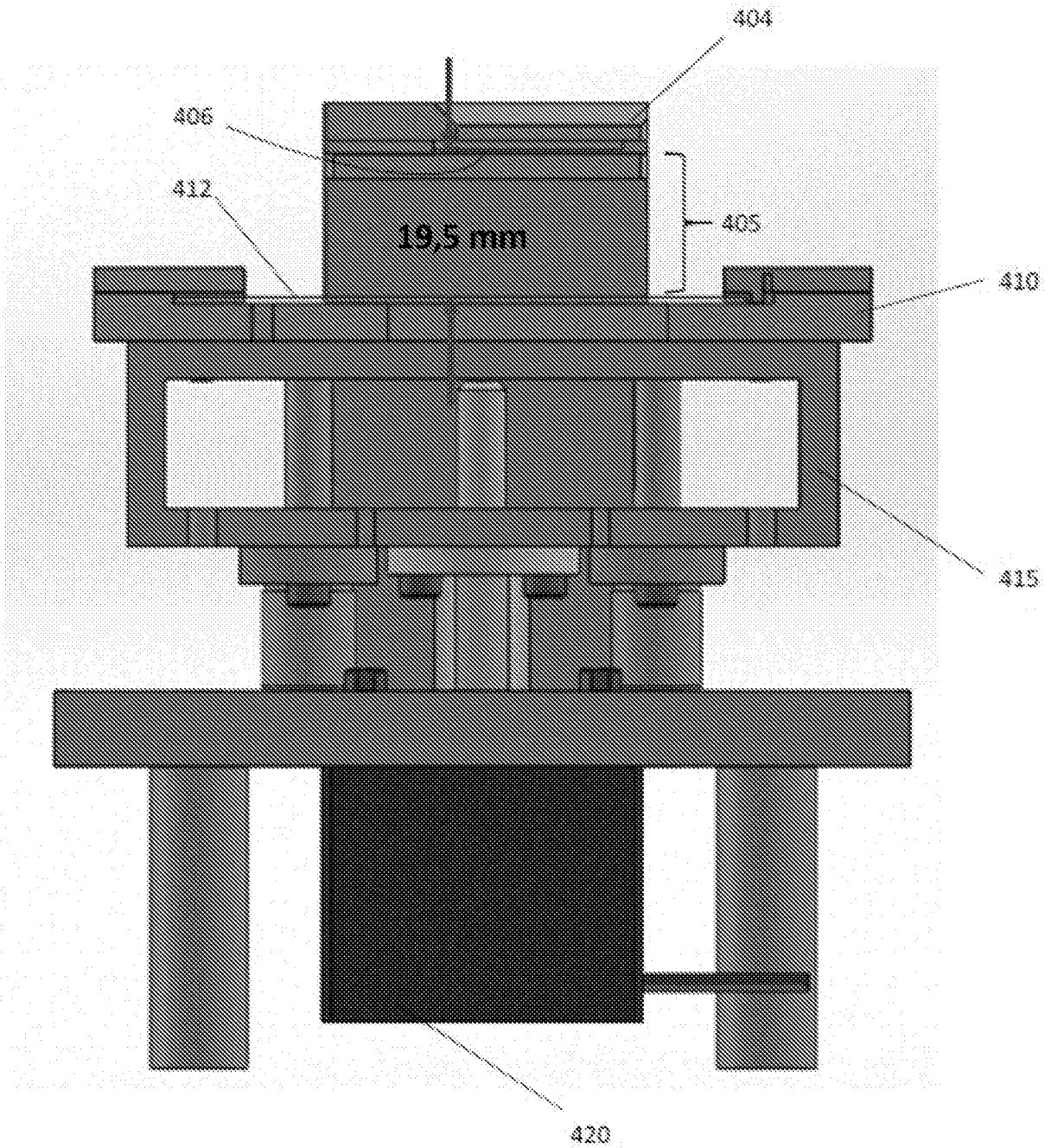


Figura 8

415

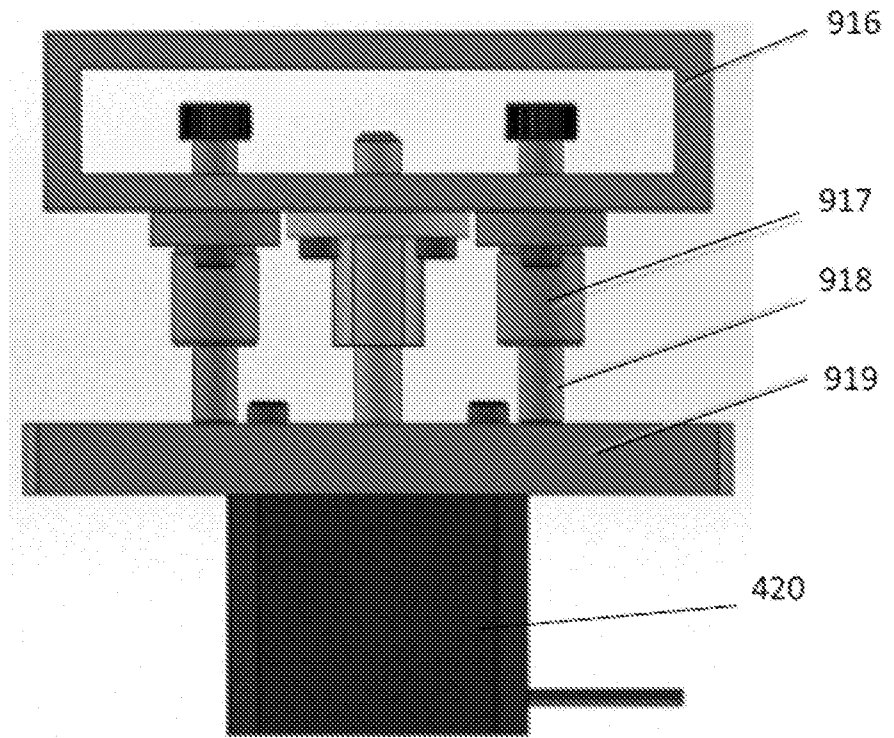


Figura 9

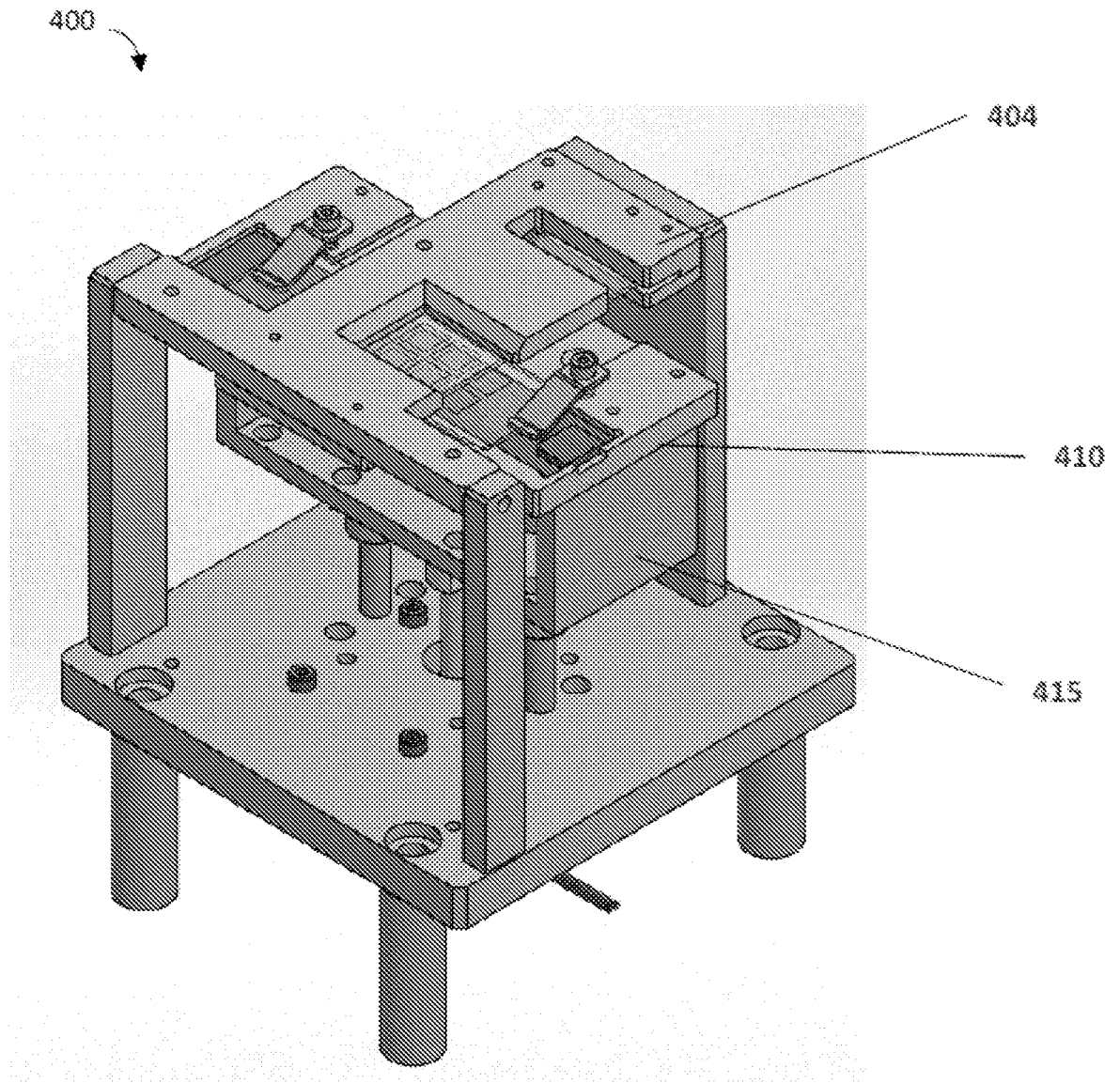


Figura 10

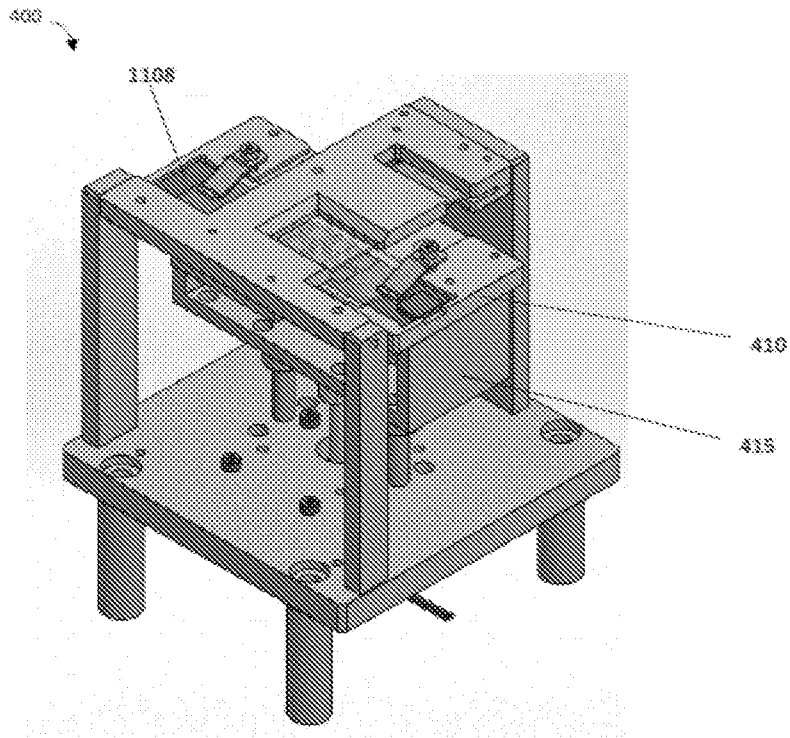


Figura 11A

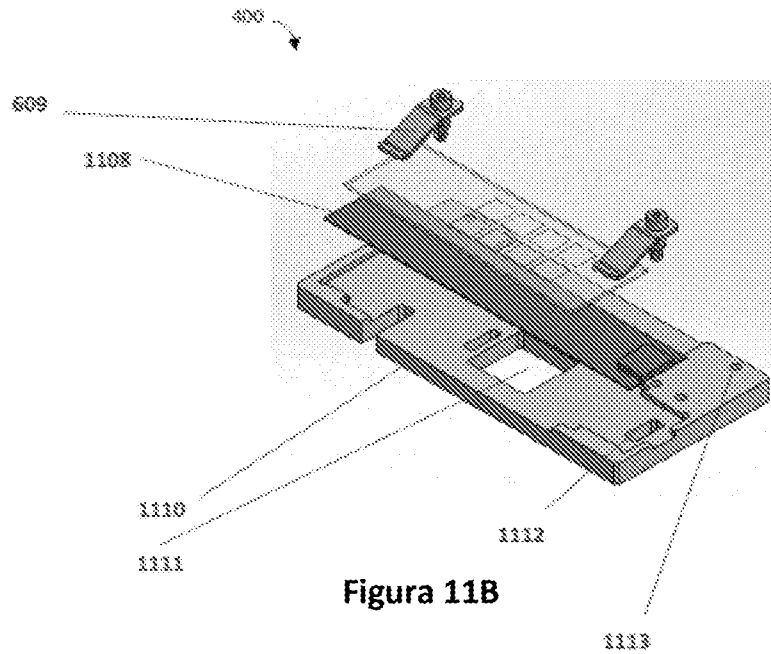


Figura 11B

1150

Perfil de temperatura del portaobjetos deseado

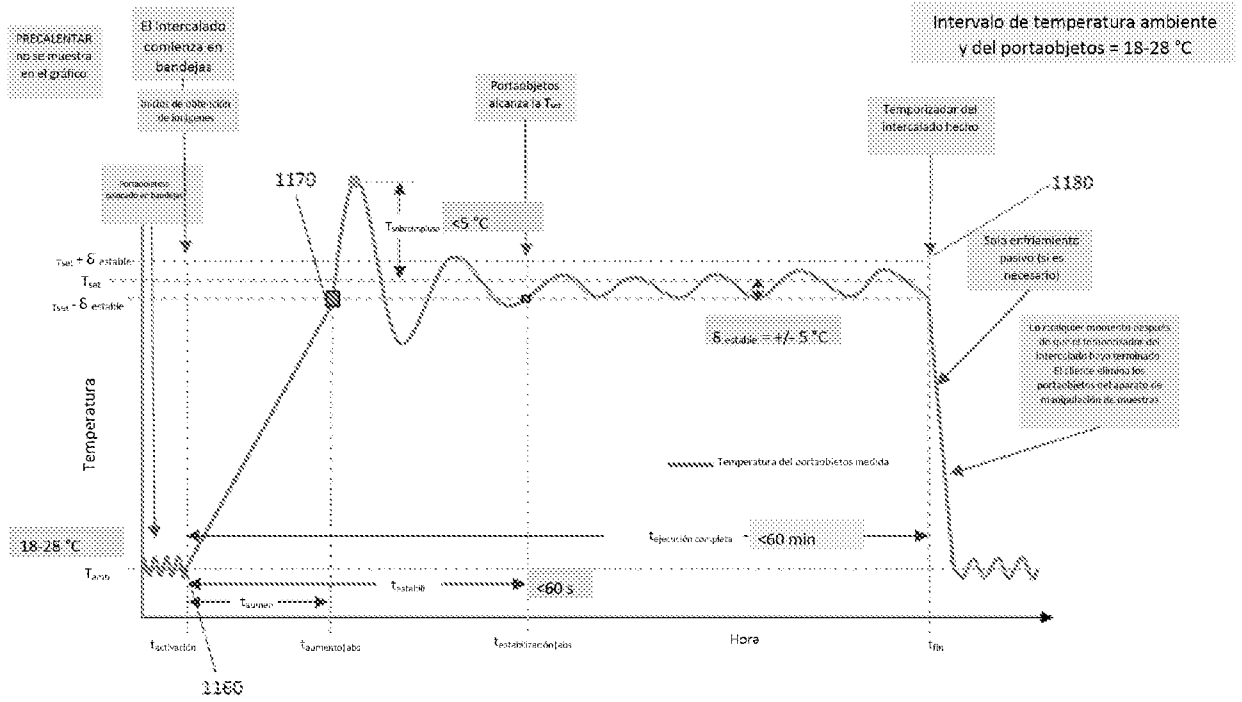


Figura 11C

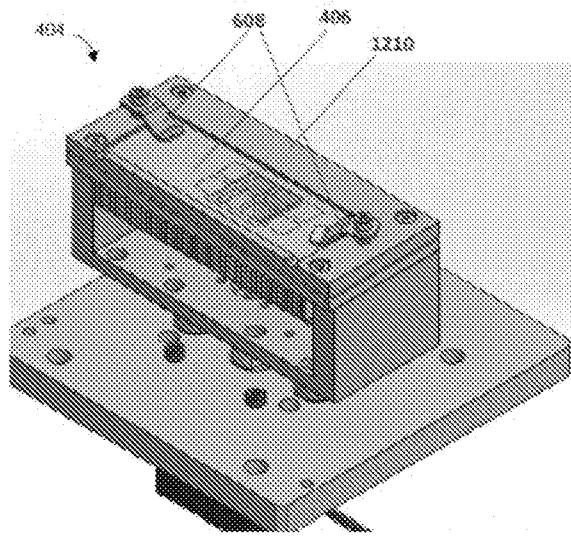


Figura 12A

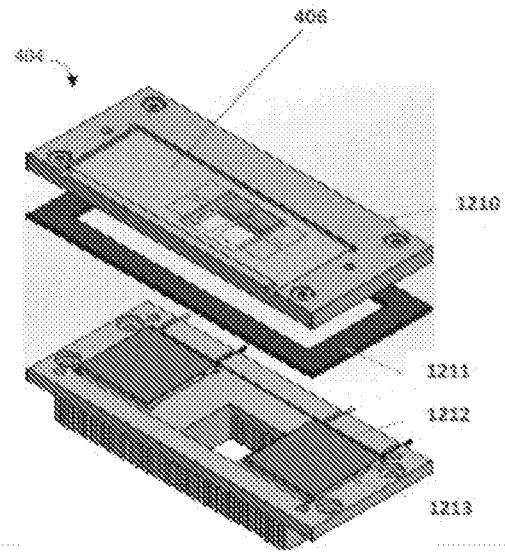


Figura 12B

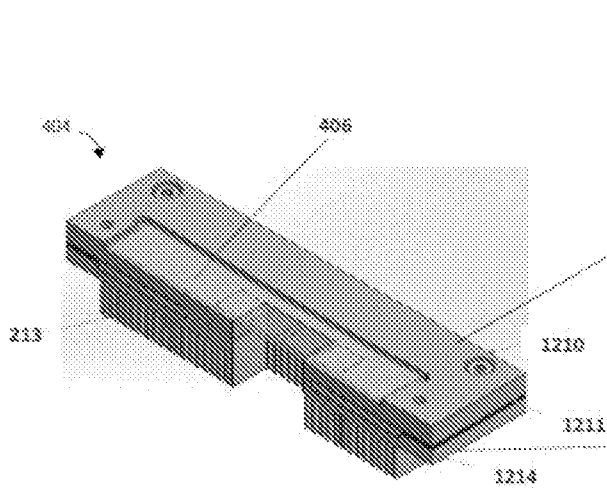


Figura 13A

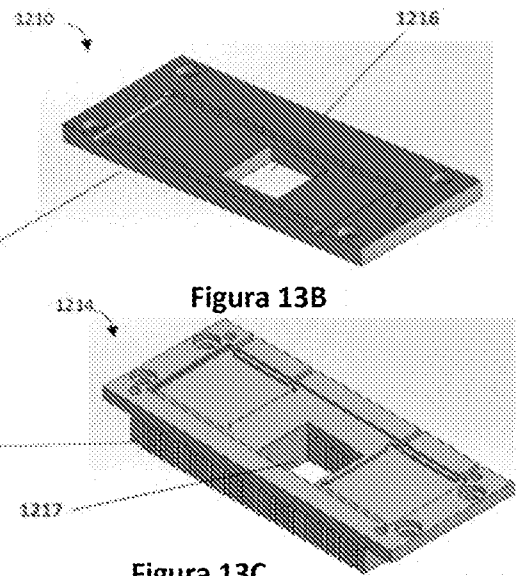


Figura 13B

Figura 13C

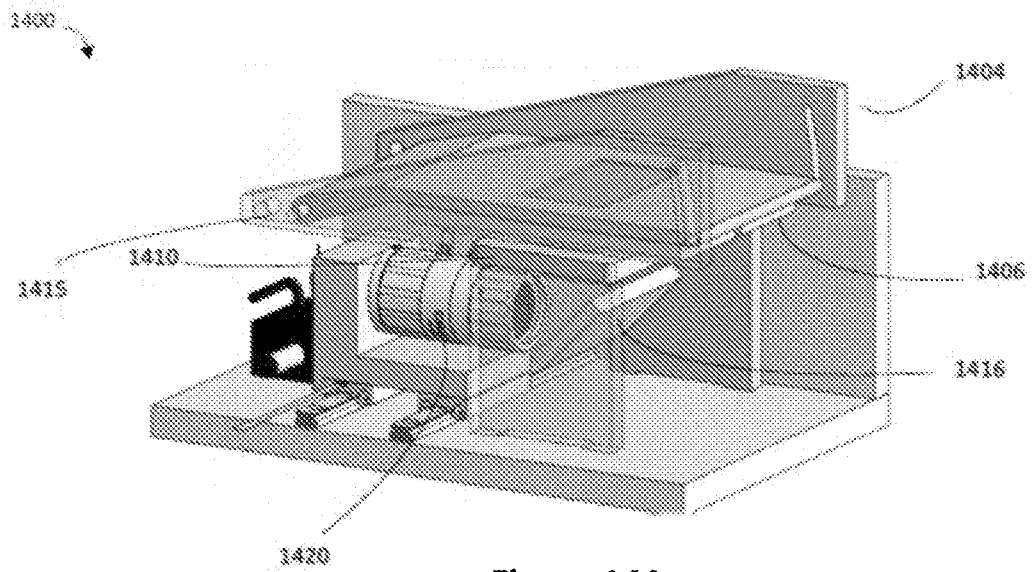


Figura 14A

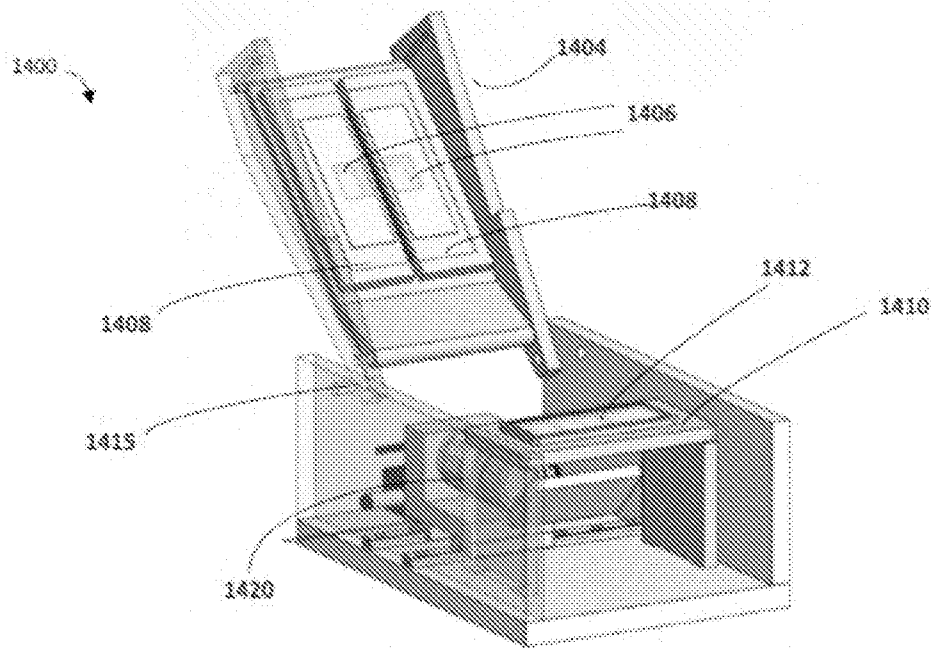


Figura 14B

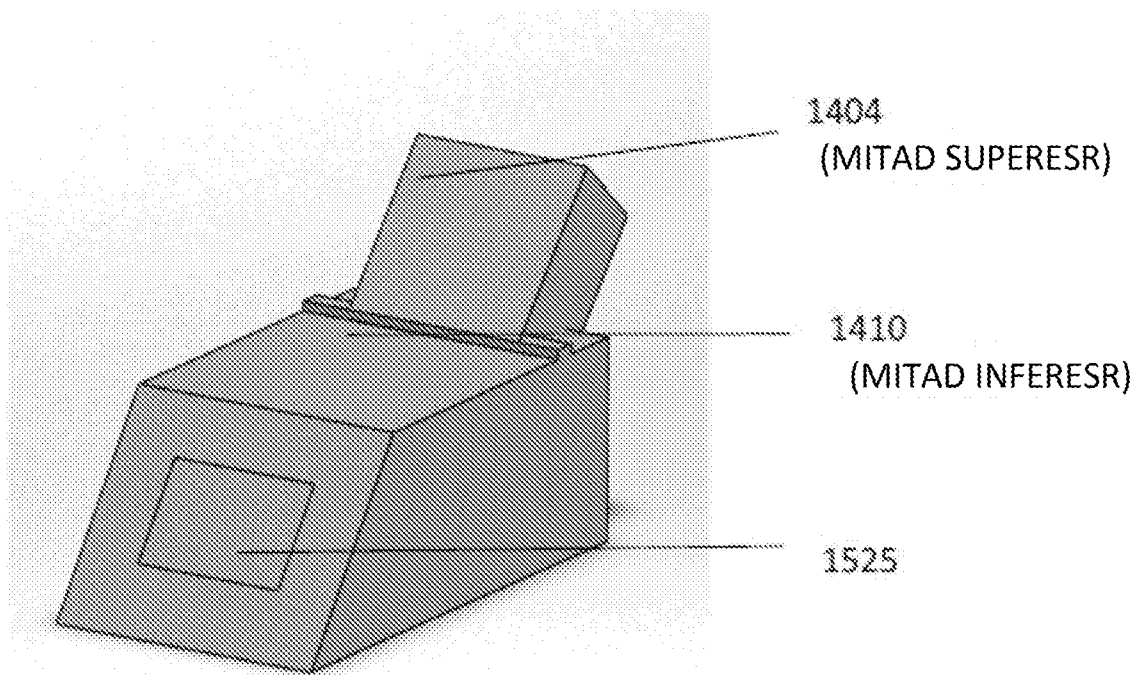


Figura 15

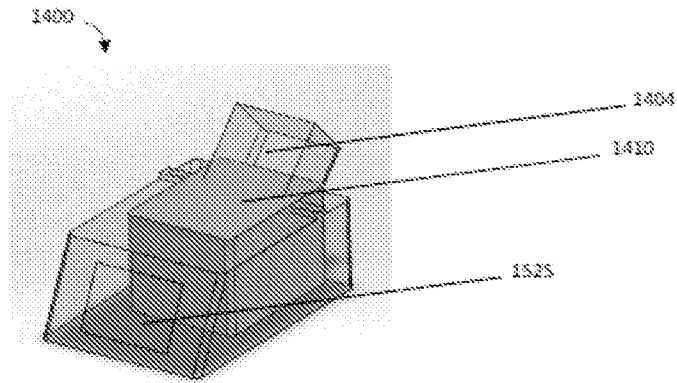


Figura 16A

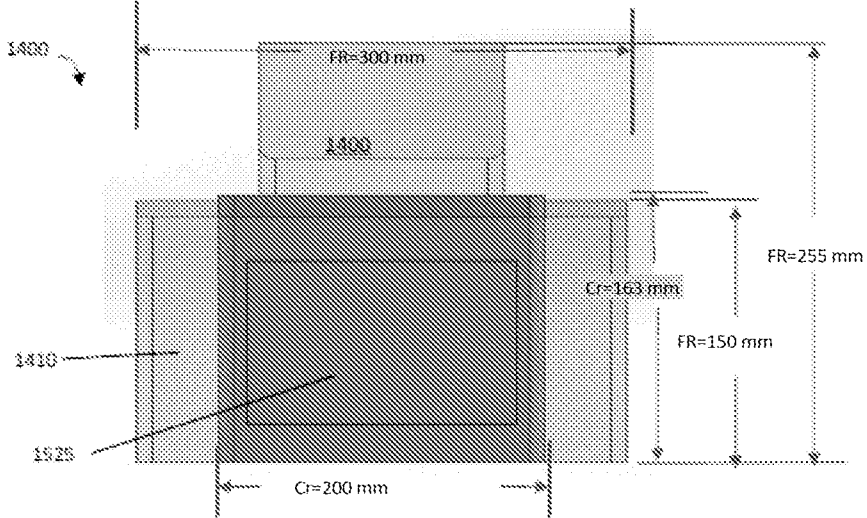


Figura 16B

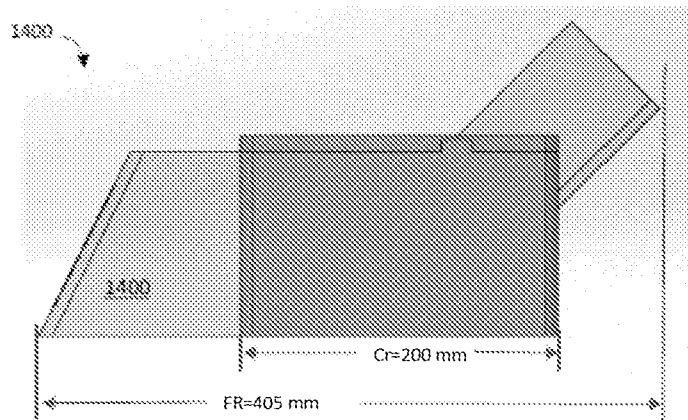


Figura 16C

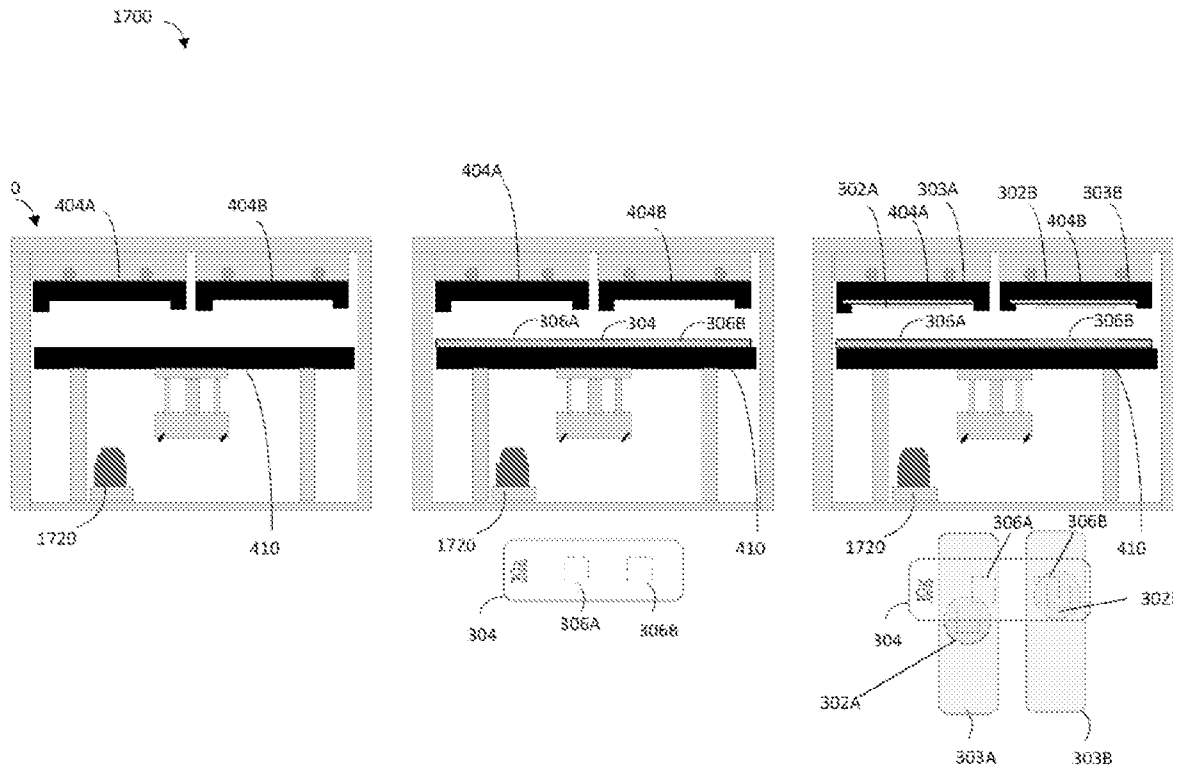
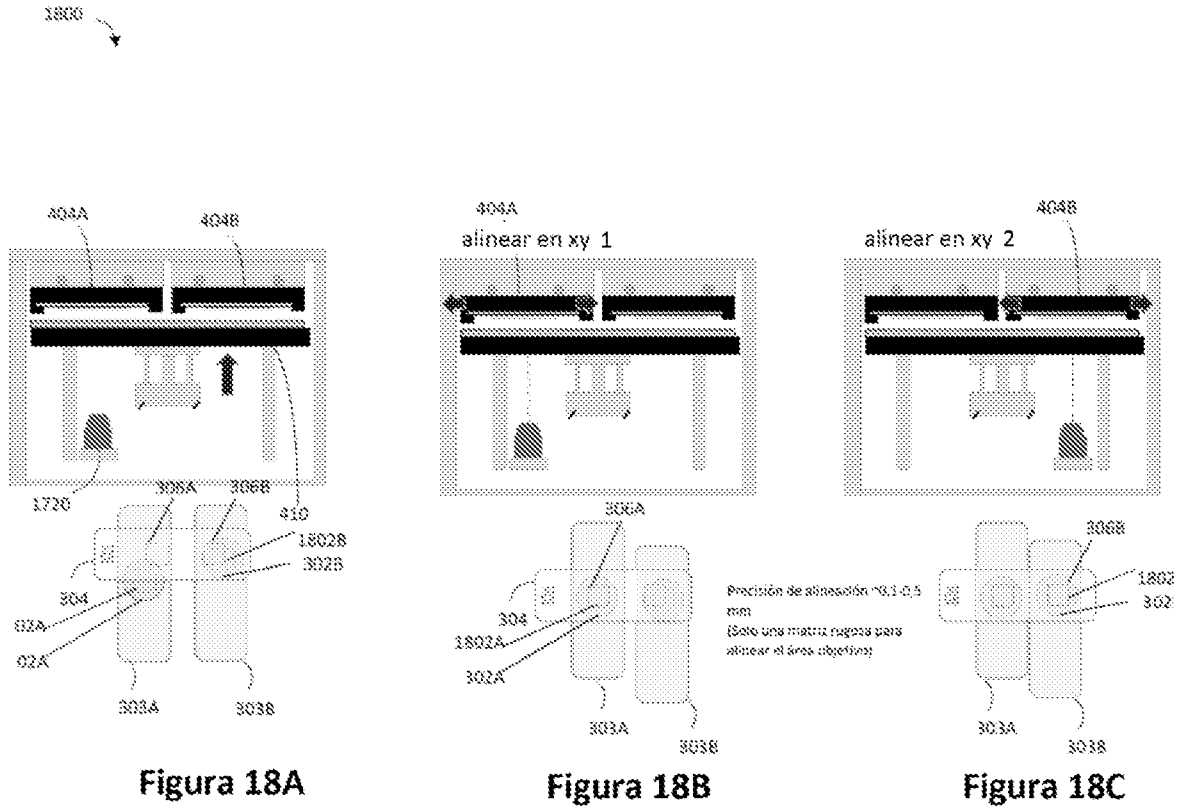


Figura 17A

Figura 17B

Figura 17C



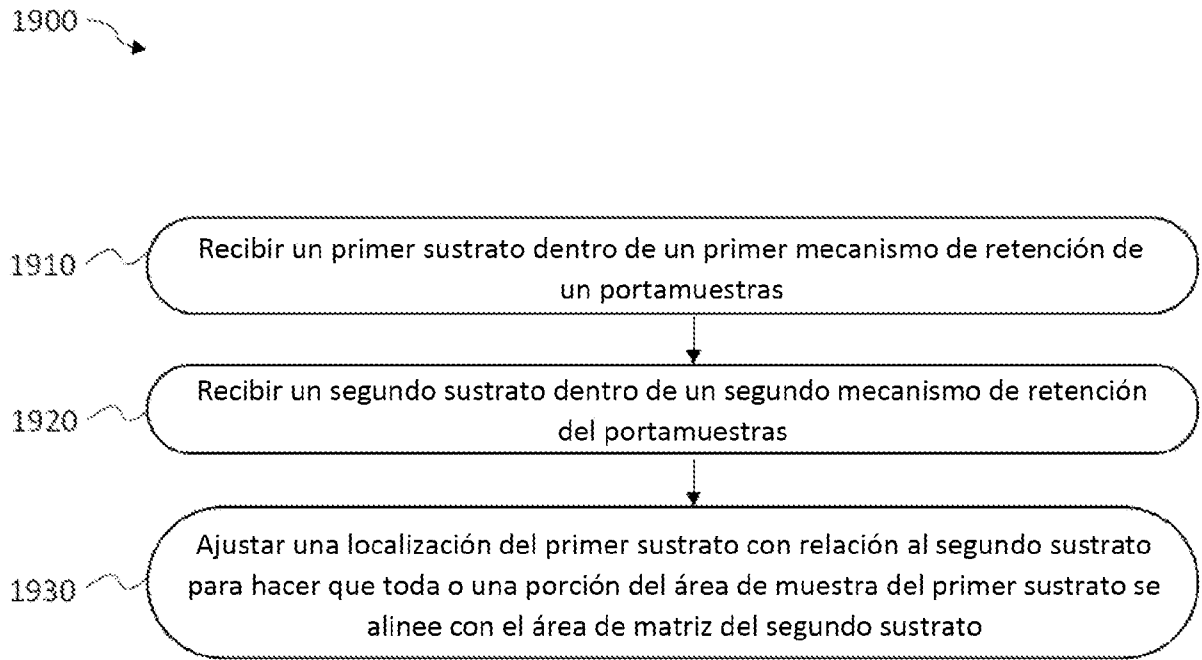


Figura 19

2000

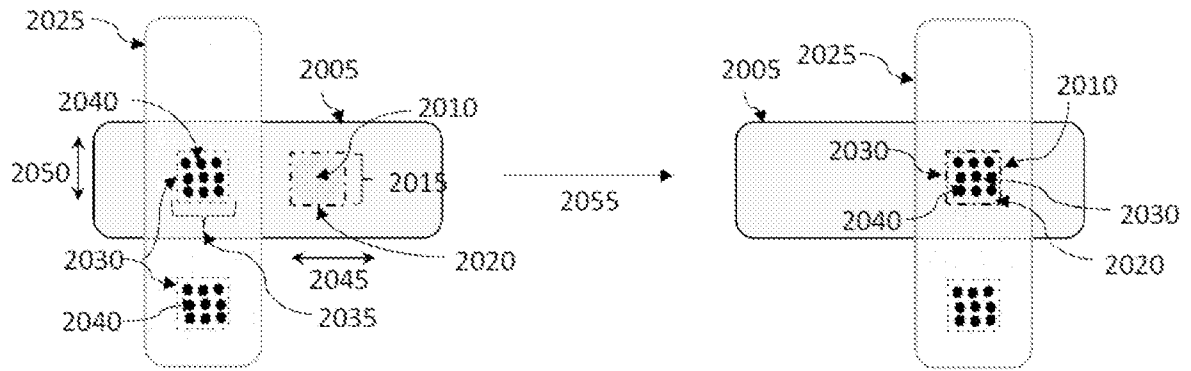


Figura 20

2100

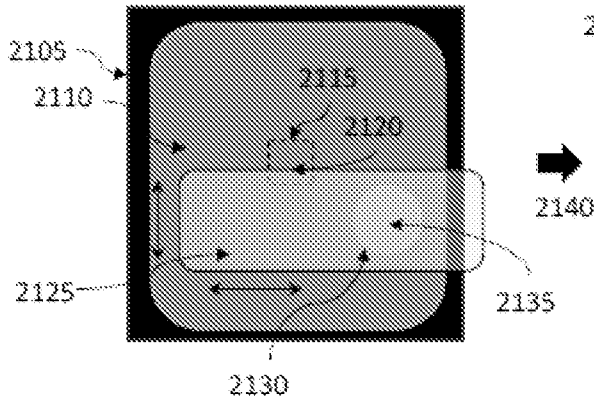


Figura 21A

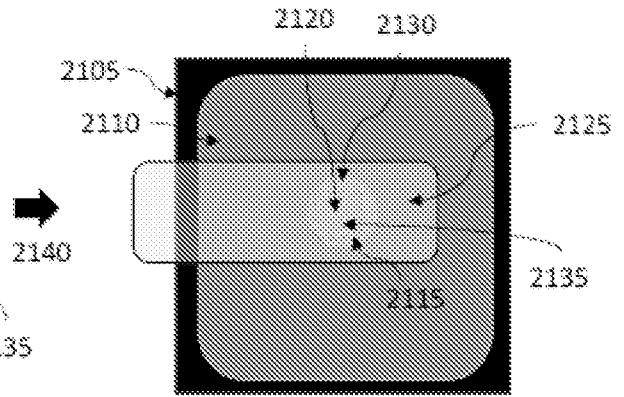


Figura 21B

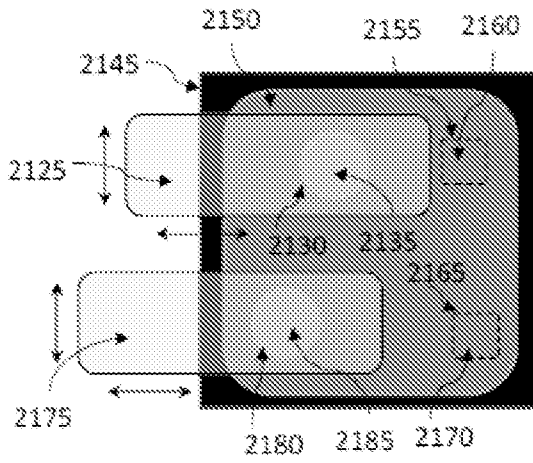


Figura 21C

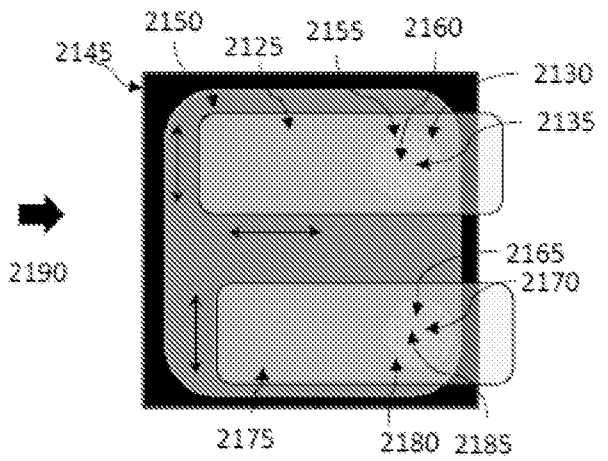


Figura 21D

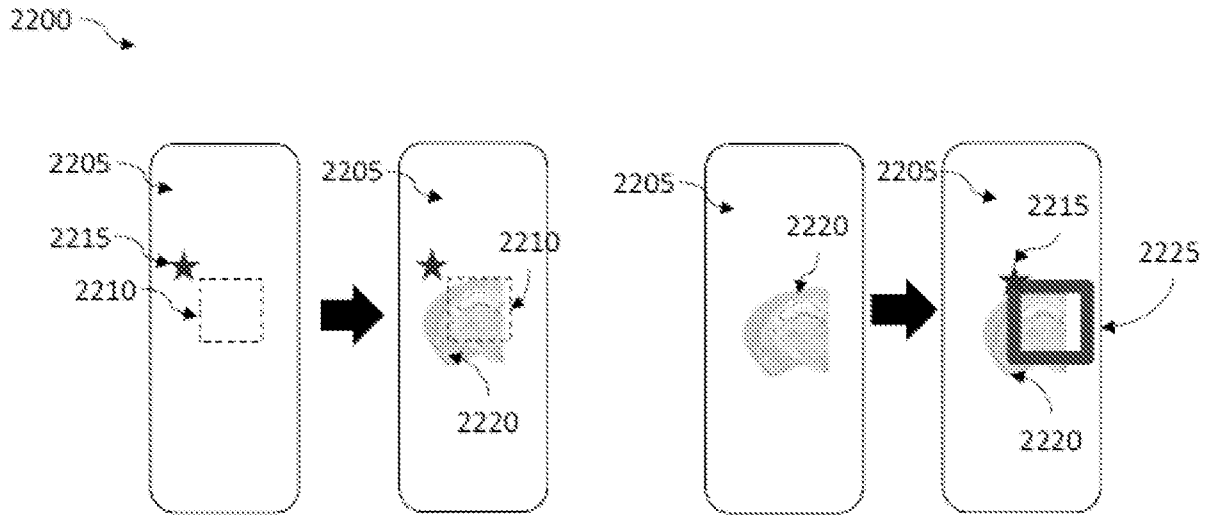


Figura 22A

Figura 22B

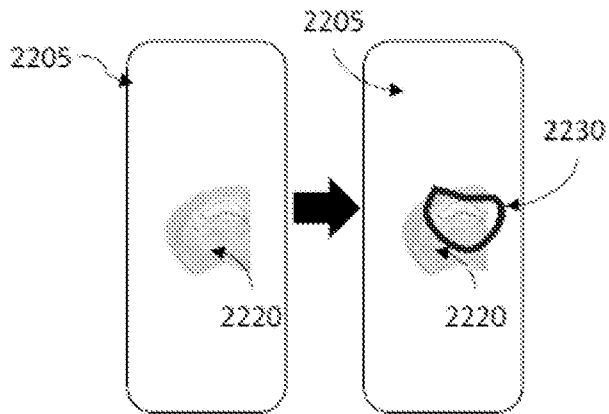


Figura 22C

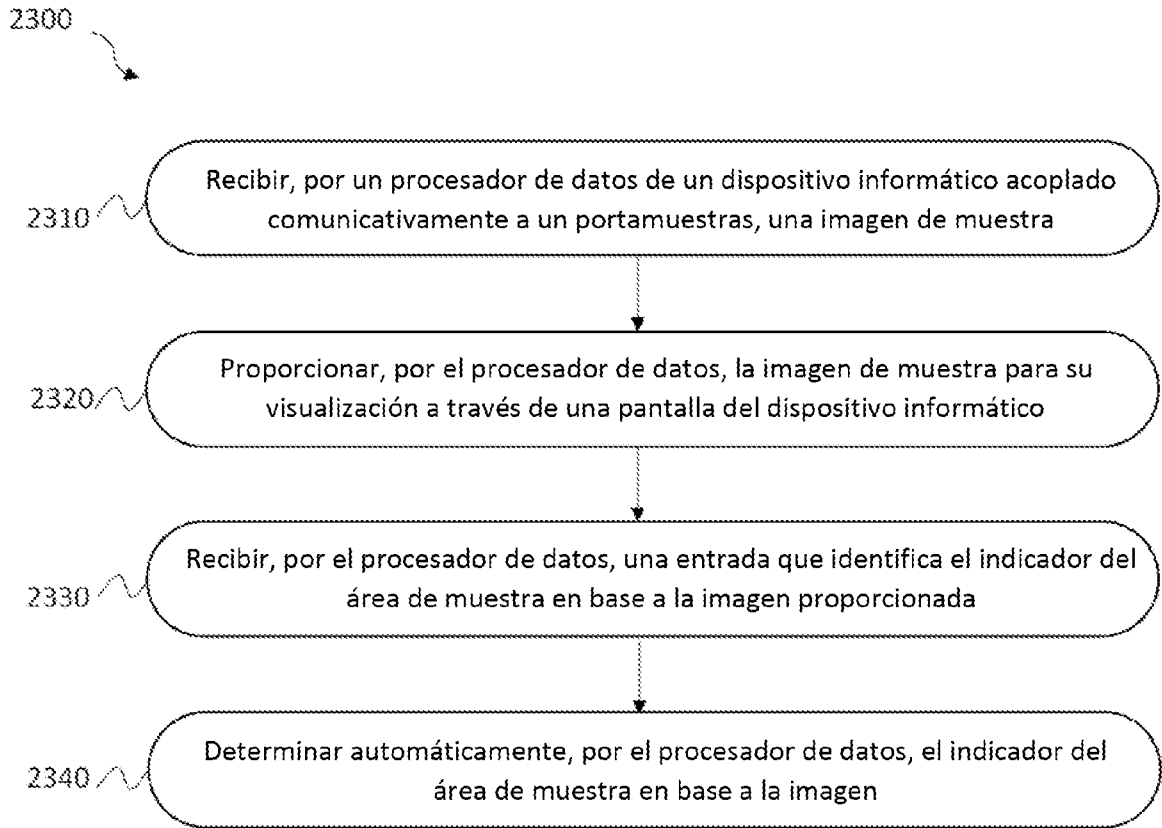


Figura 23

2400

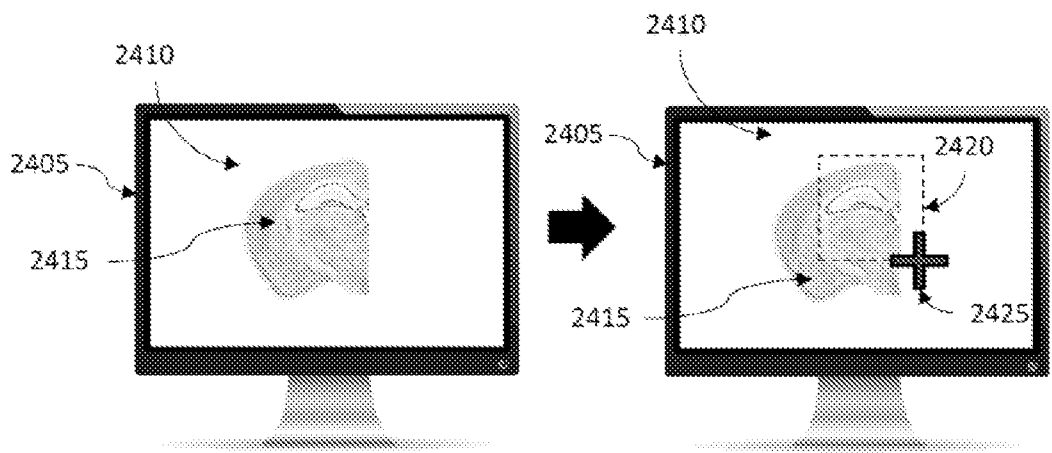


Figura 24A

Figura 24B

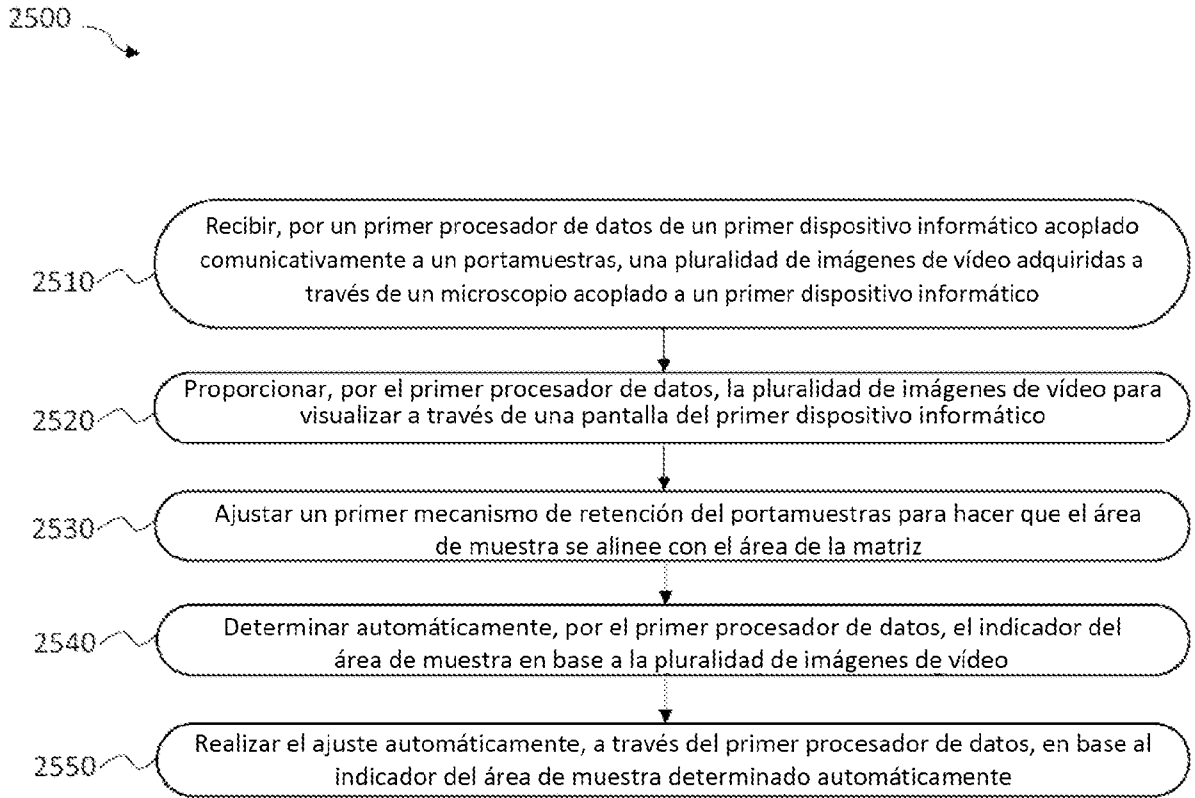


Figura 25

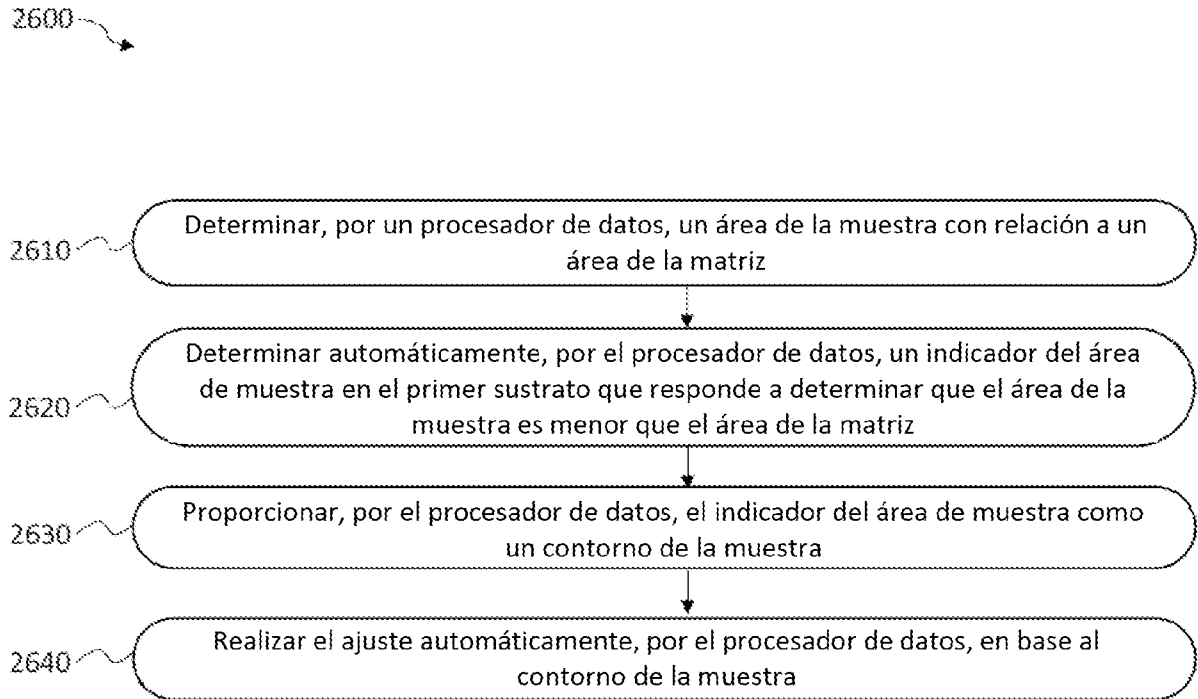


Figura 26

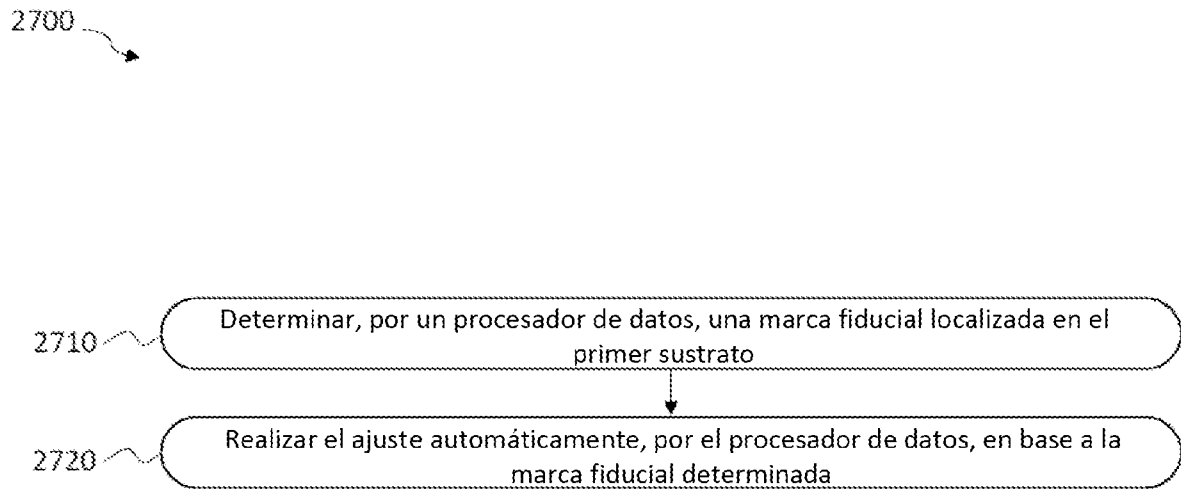


Figura 27

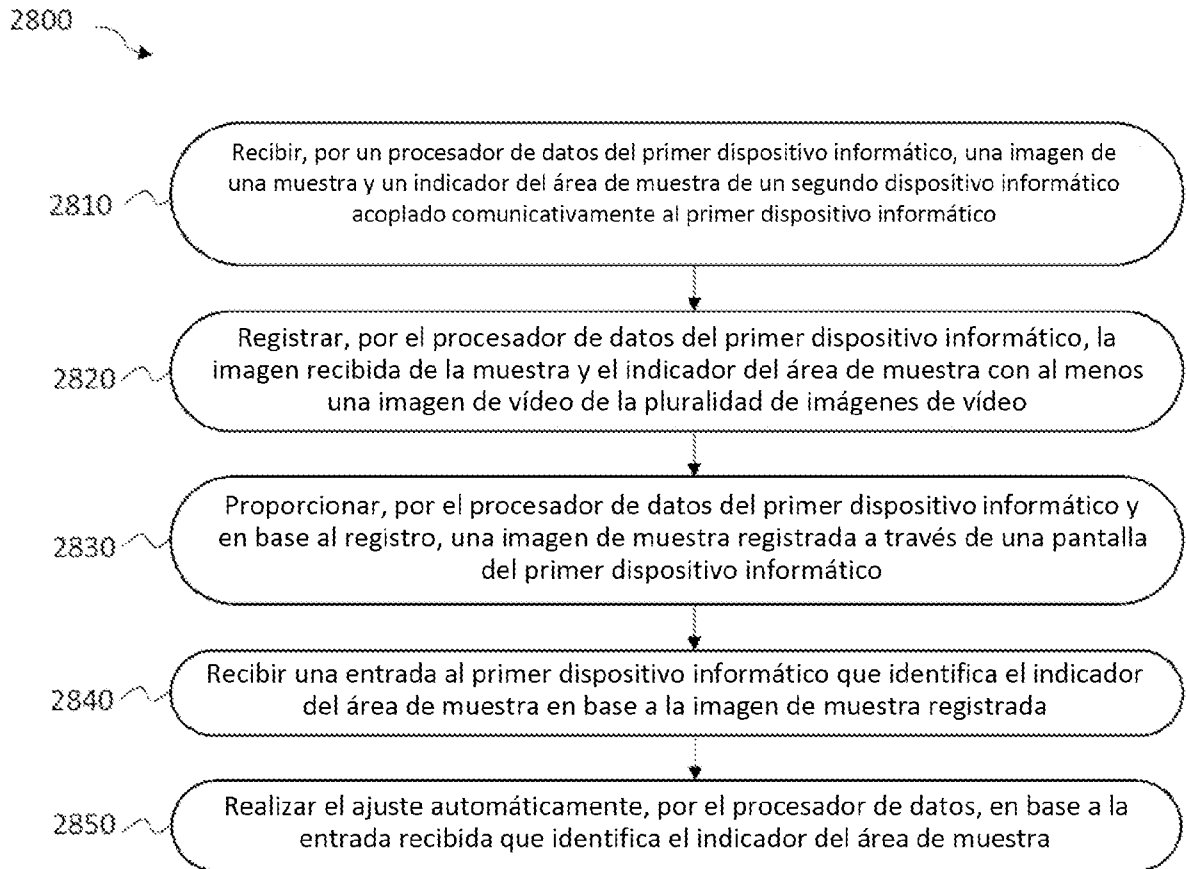


Figura 28

2900

Permeabilización durante la formación de intercalado

Portaobjetos GEx inferior

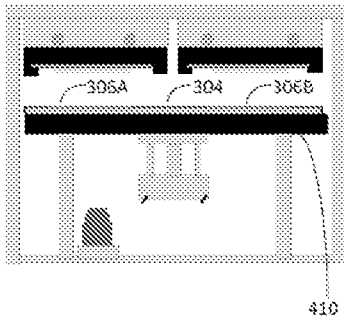


Figura 29A

El usuario dispensa manualmente la solución de permeabilización

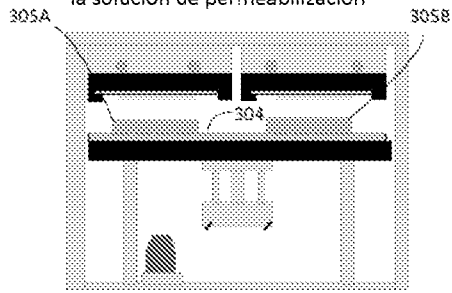


Figura 29B

Se forma el intercalado

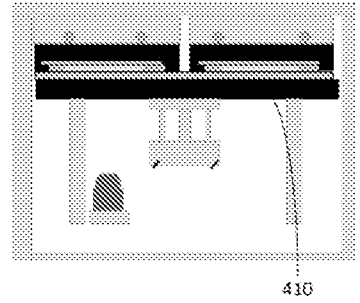


Figura 29C

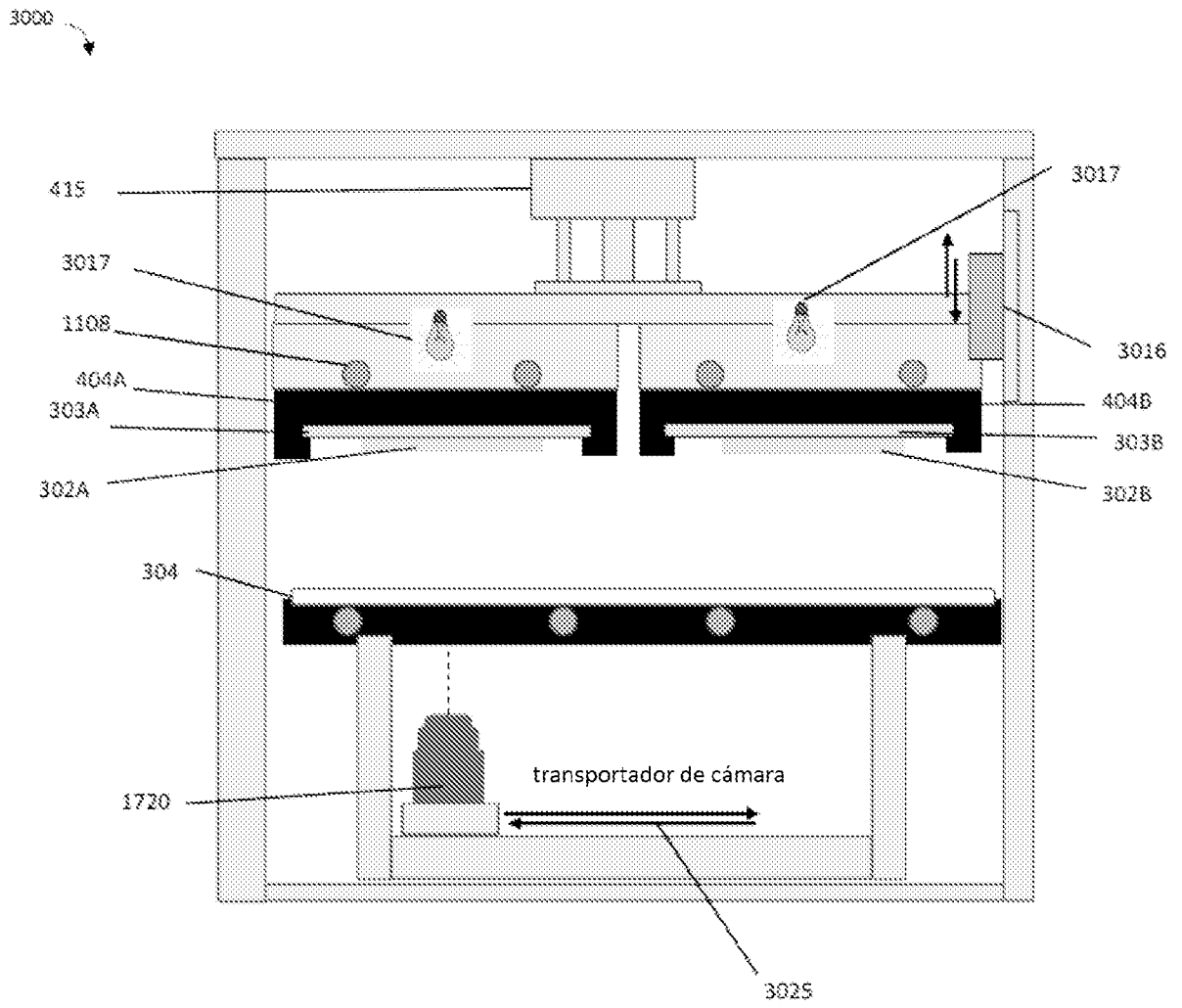
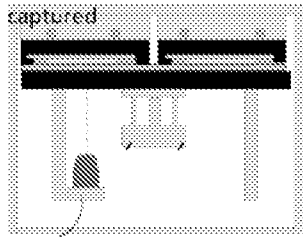


Figura 30

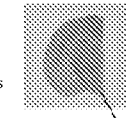
3150

Captura de imagen de registro (durante la permeabilización de 1 min)

Se captura la imagen de registro #1

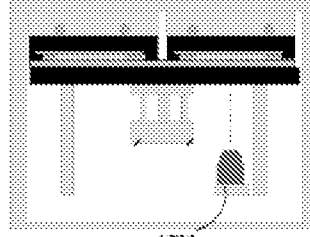


Precisión de alineación <math>< 10</math> micras
Es necesario registrar la alineación de los fiduciales en el portaobjetos GEx con el tejido

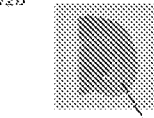


3121

Se captura la imagen de registro #2

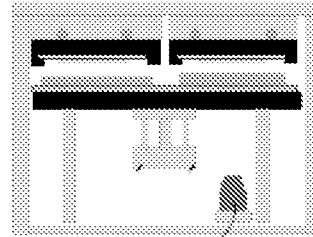


1720



3122

intercalado abierto



1720

El portaobjetos GEx debe retirarse rápidamente para lavar o lavar la solución cargada en el instrumento para lavar

Figura 31A

Figura 31B

Figura 31C

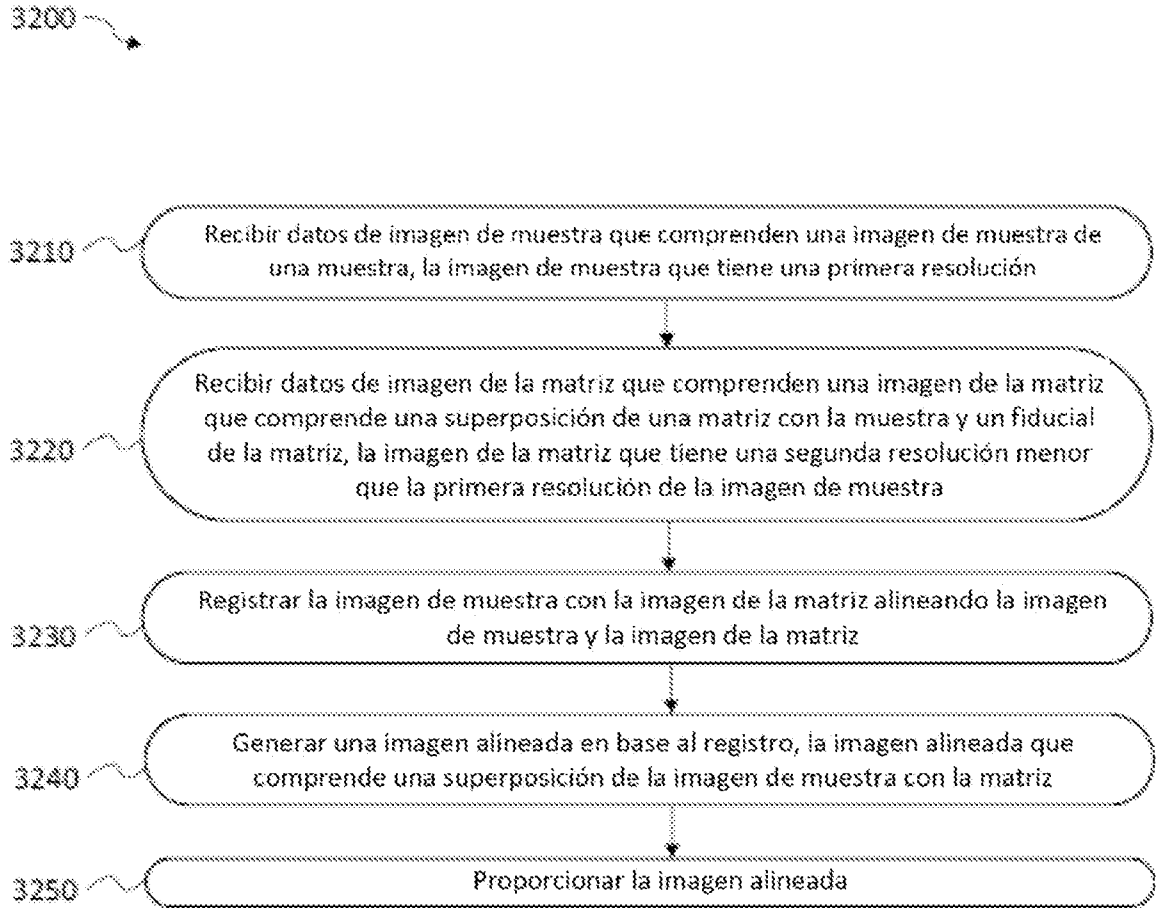
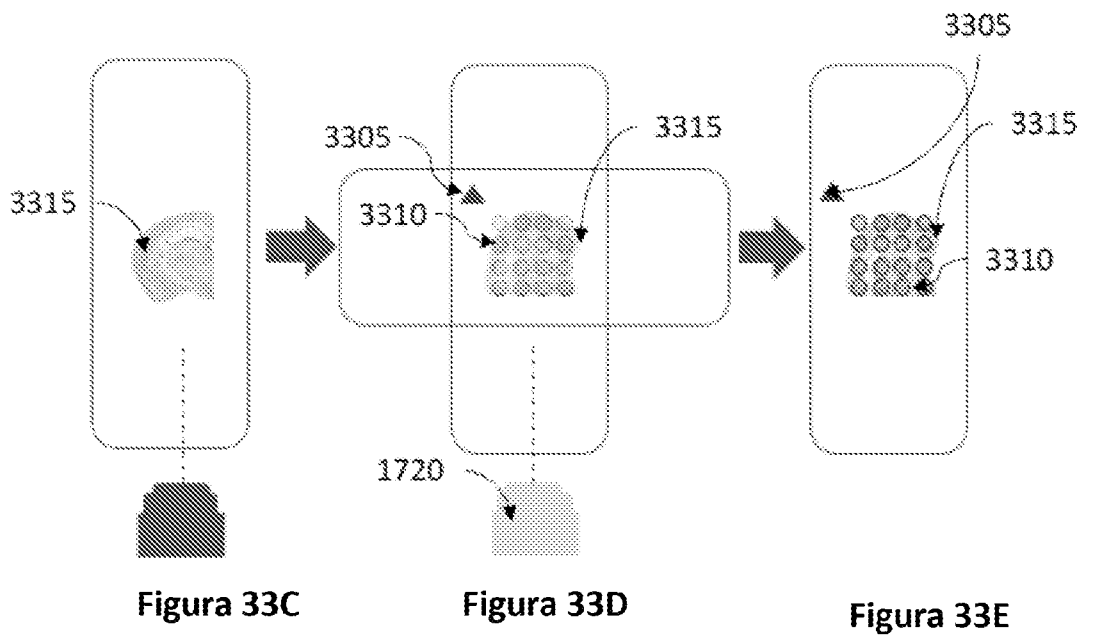
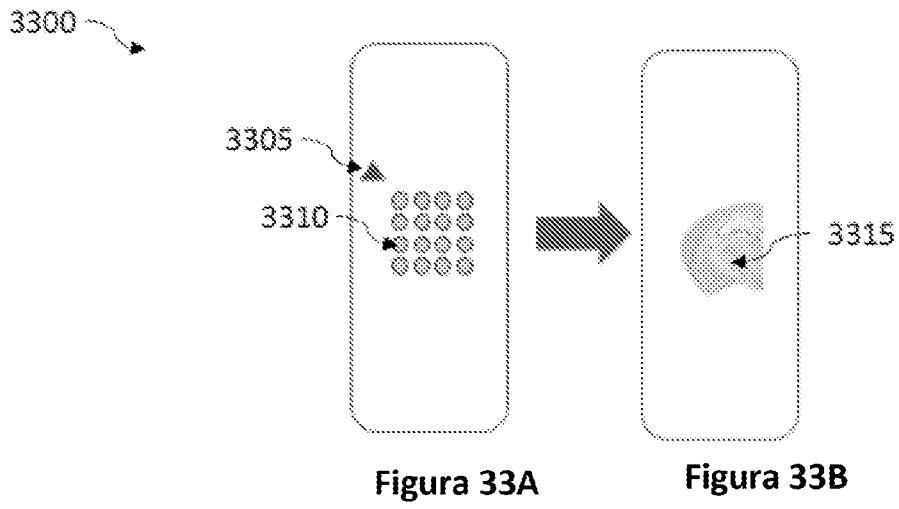


Figura 32



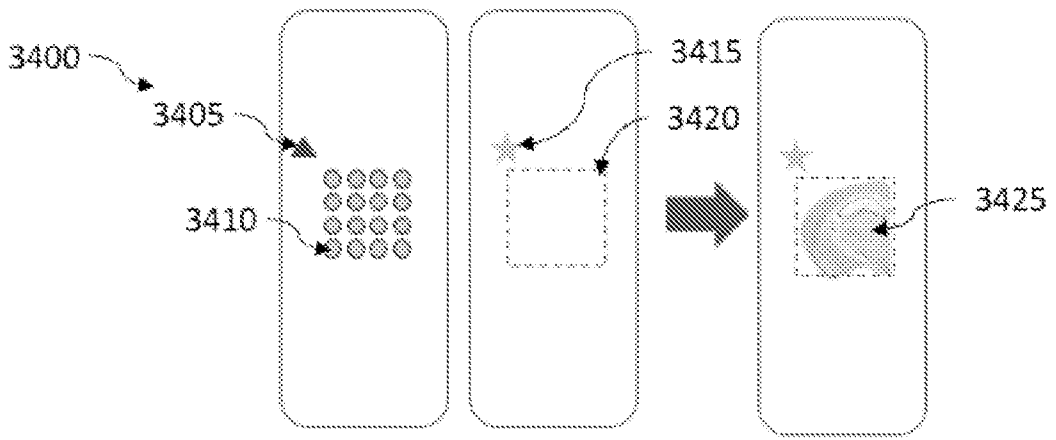


Figura 34A

Figura 34B

Figura 34C

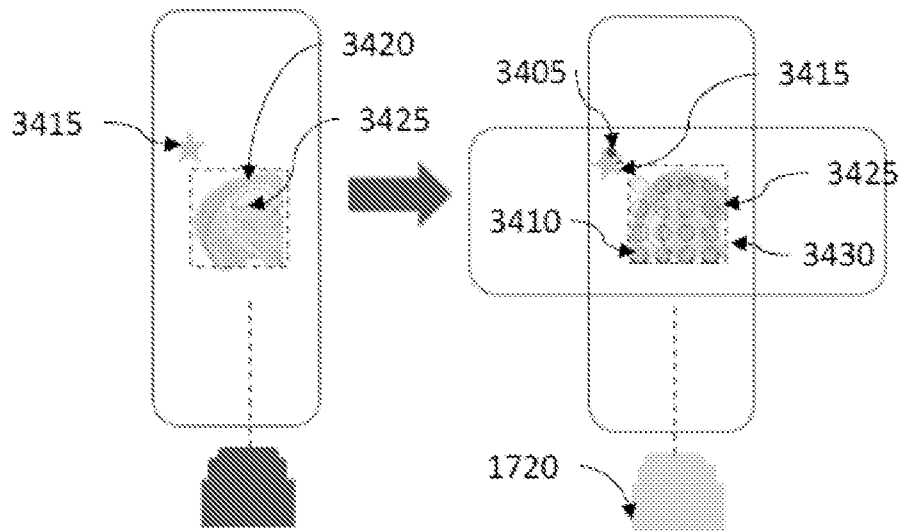
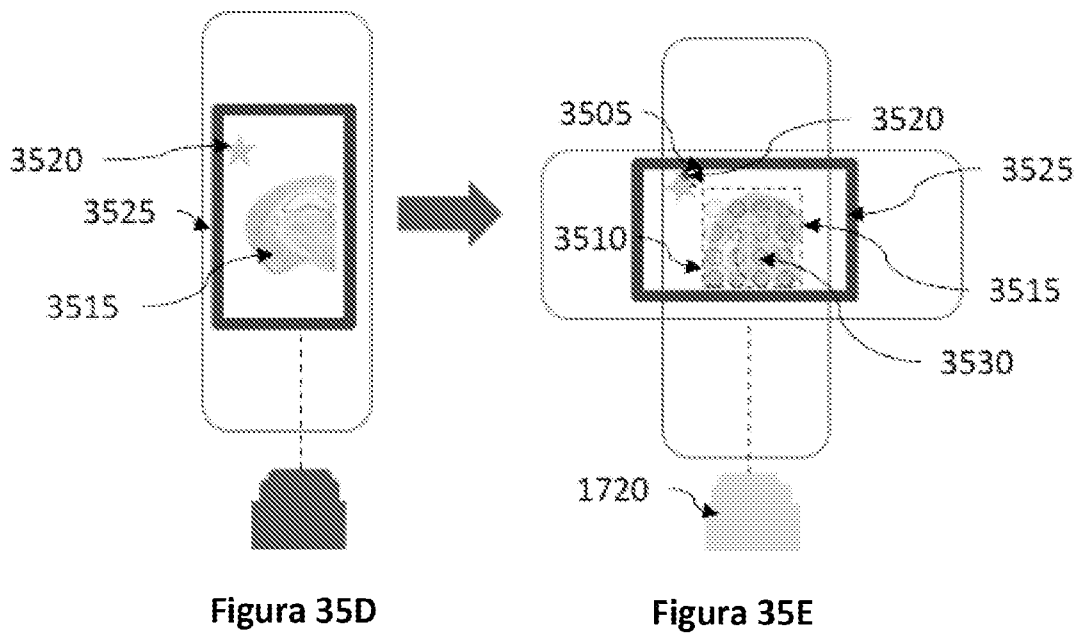
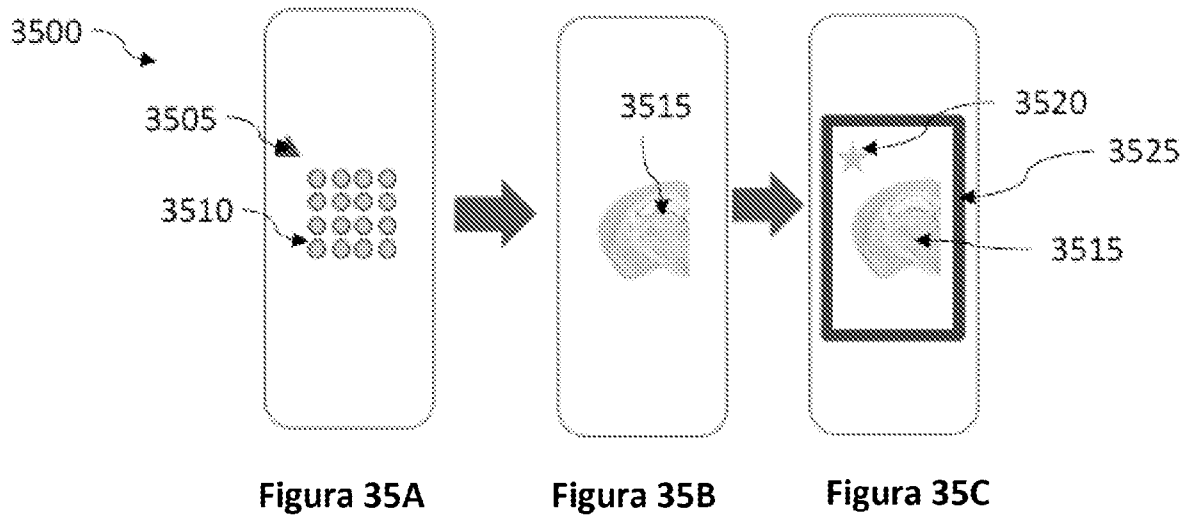


Figura 34D

Figura 34E



3600

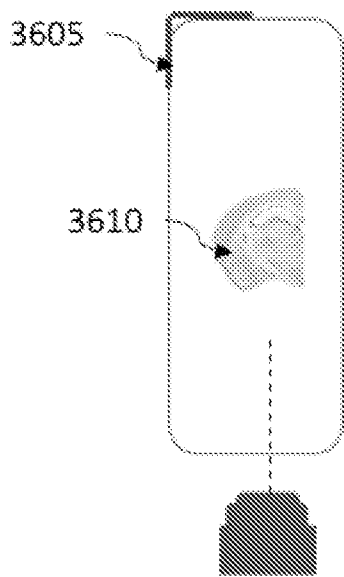


Figura 36A

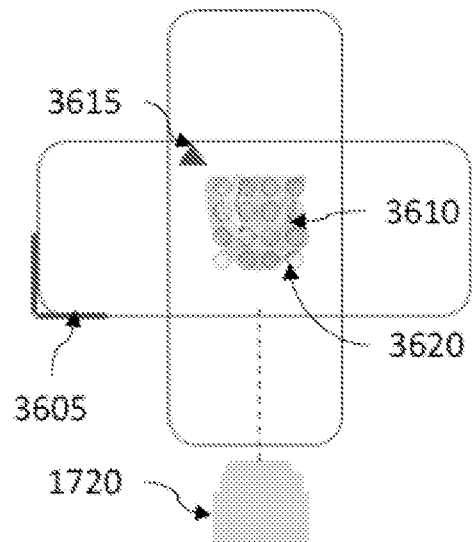


Figura 36B

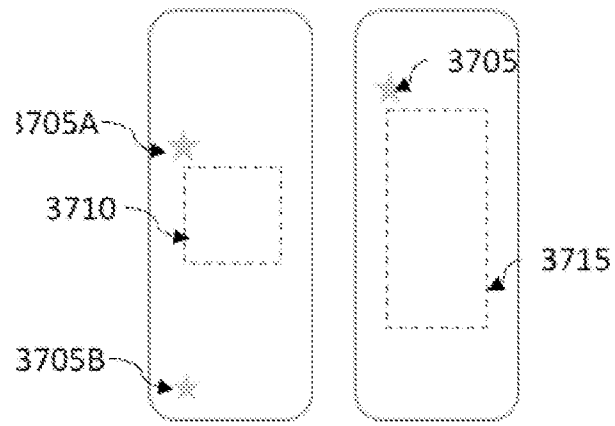


Figura 37A

Figura 37B

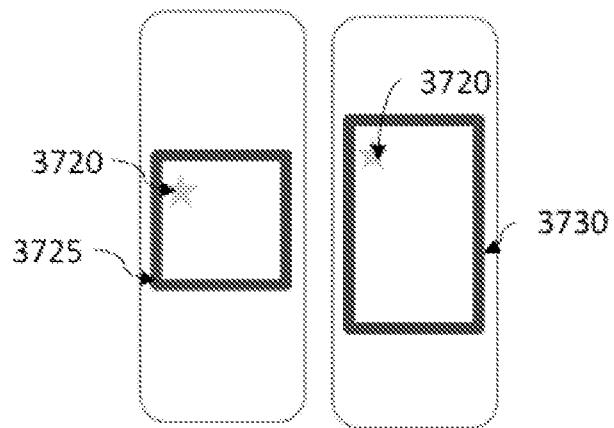


Figura 37C

Figura 37D

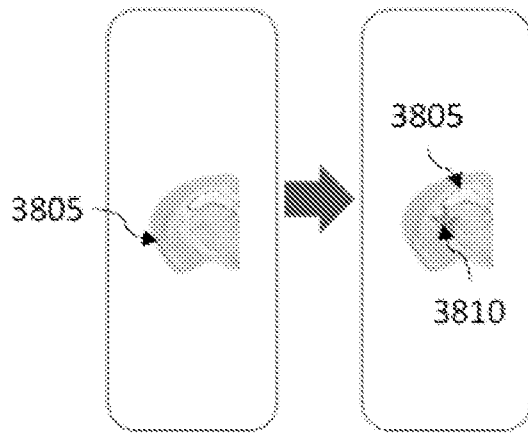


Figura 38A

Figura 38B

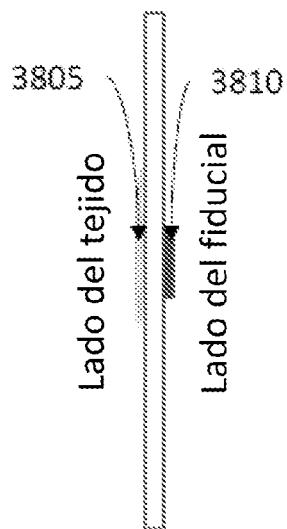


Figura 38C

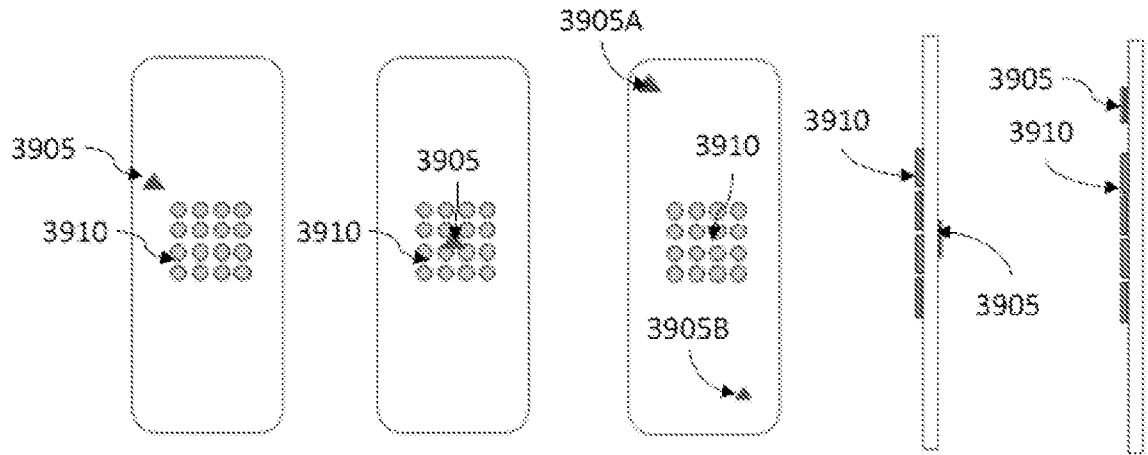


Figura 39A

Figura 39B

Figura 39C

Figura 39D

Figura 39E

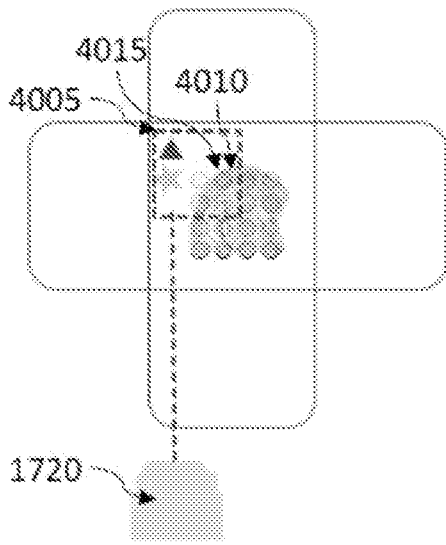


Figura 40A

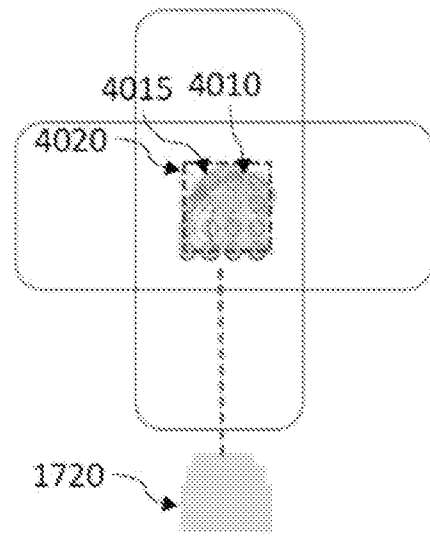


Figura 40B

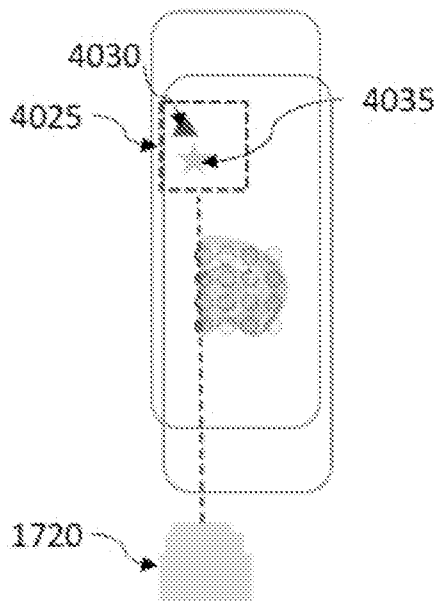


Figura 40C

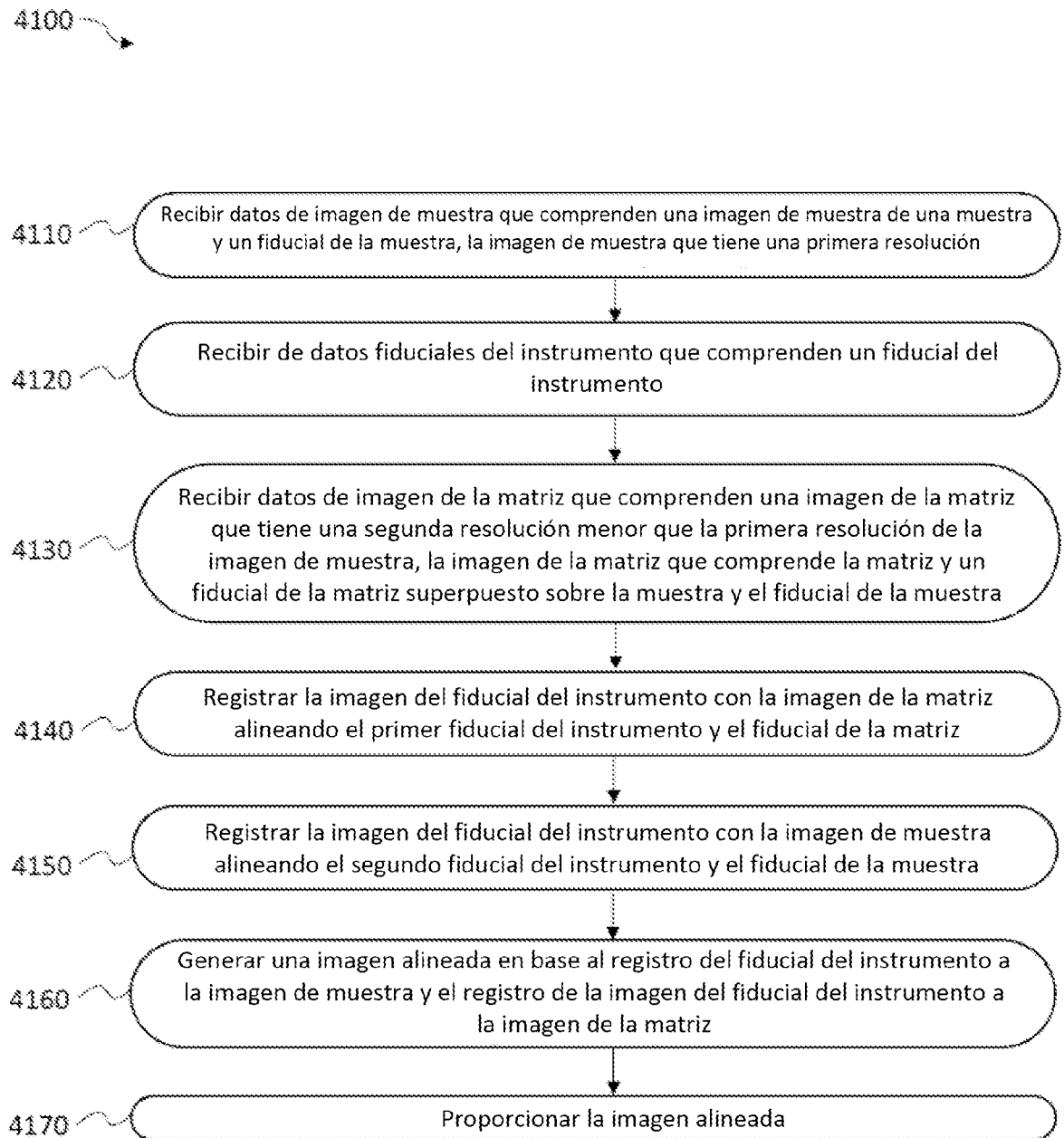


Figura 41

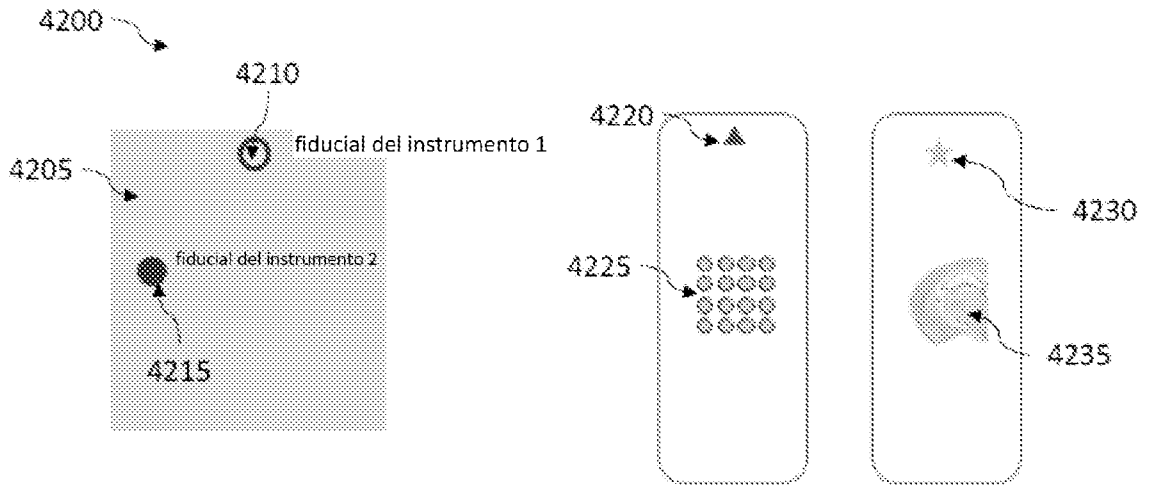


Figura 42A

Figura 42B

Figura 42C

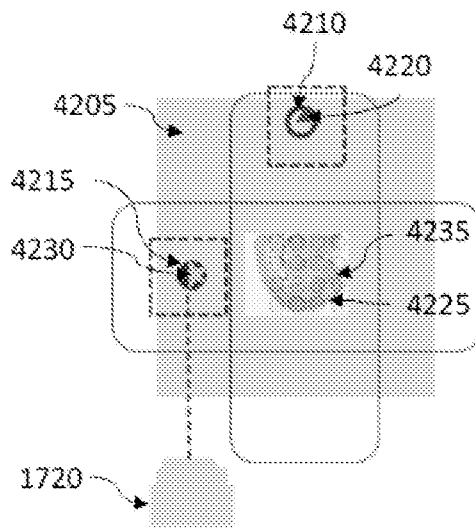


Figura 42D

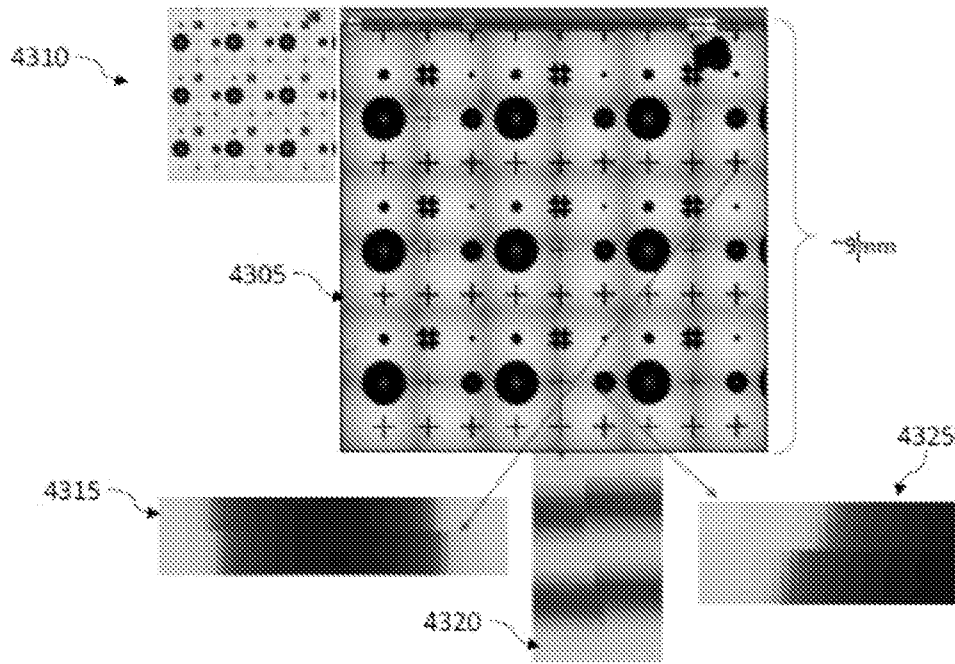


Figura 43A

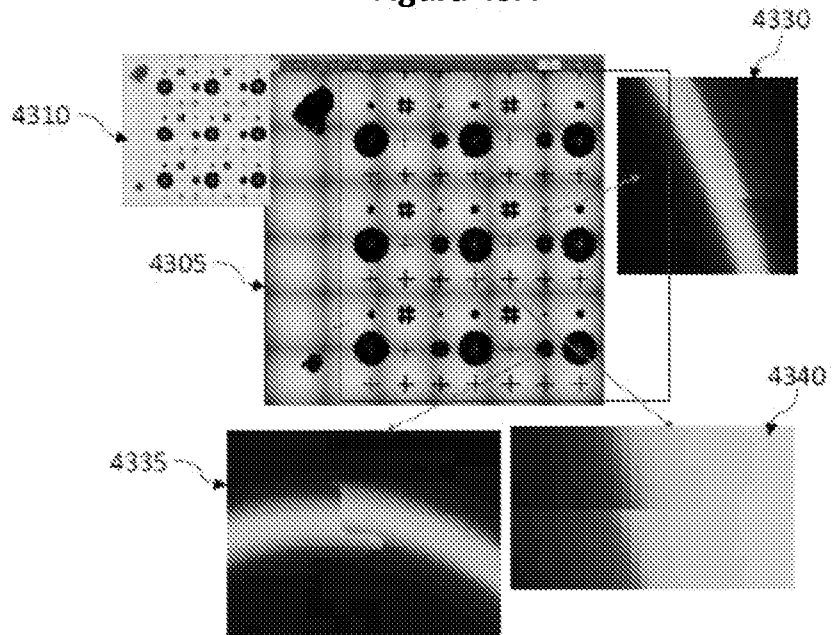


Figura 43B

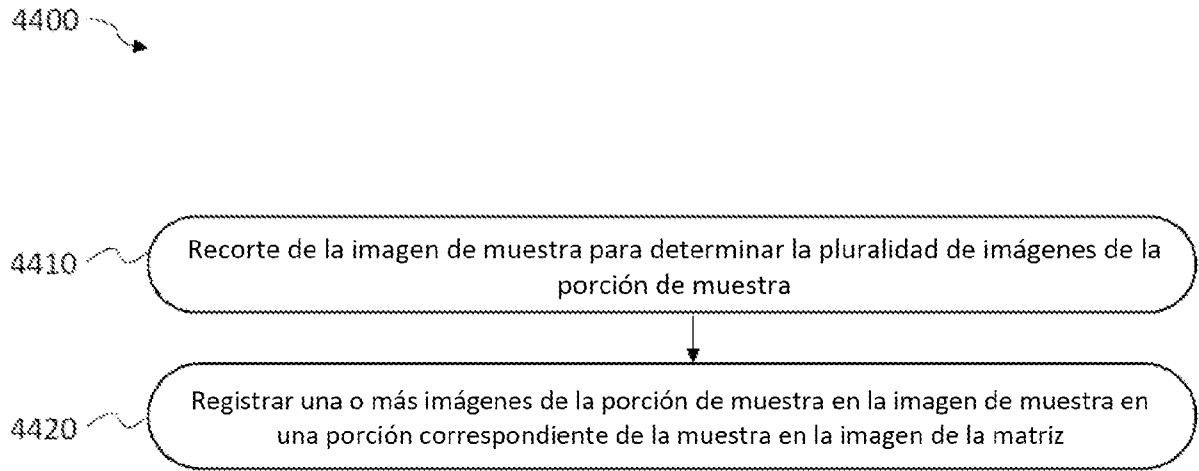


Figura 44

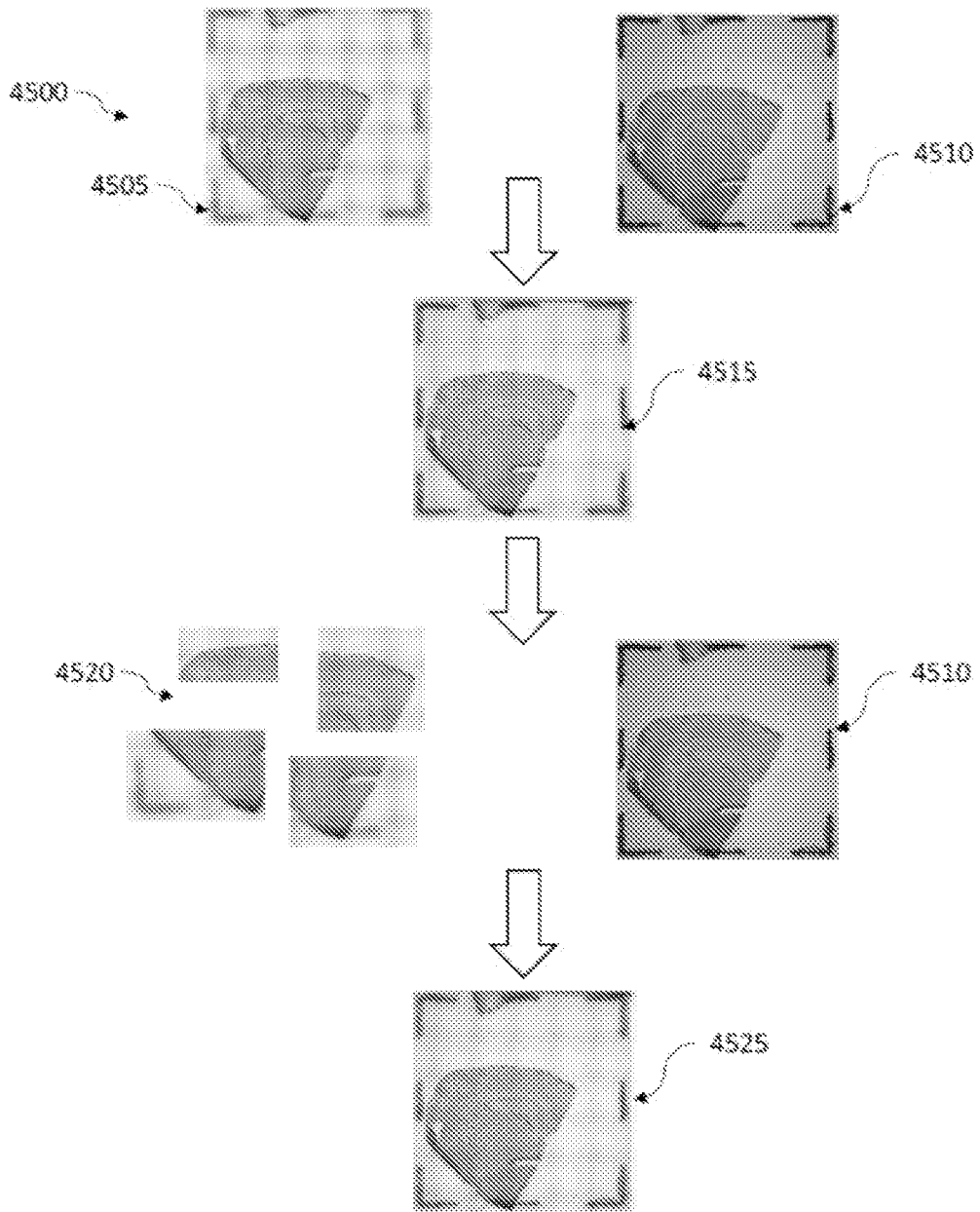


Figura 45

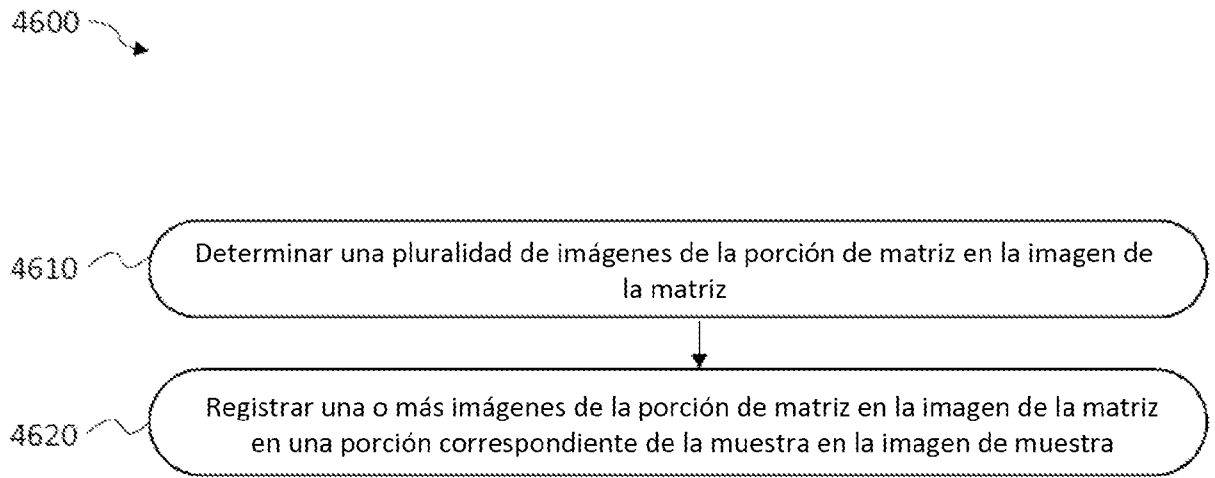


Figura 46

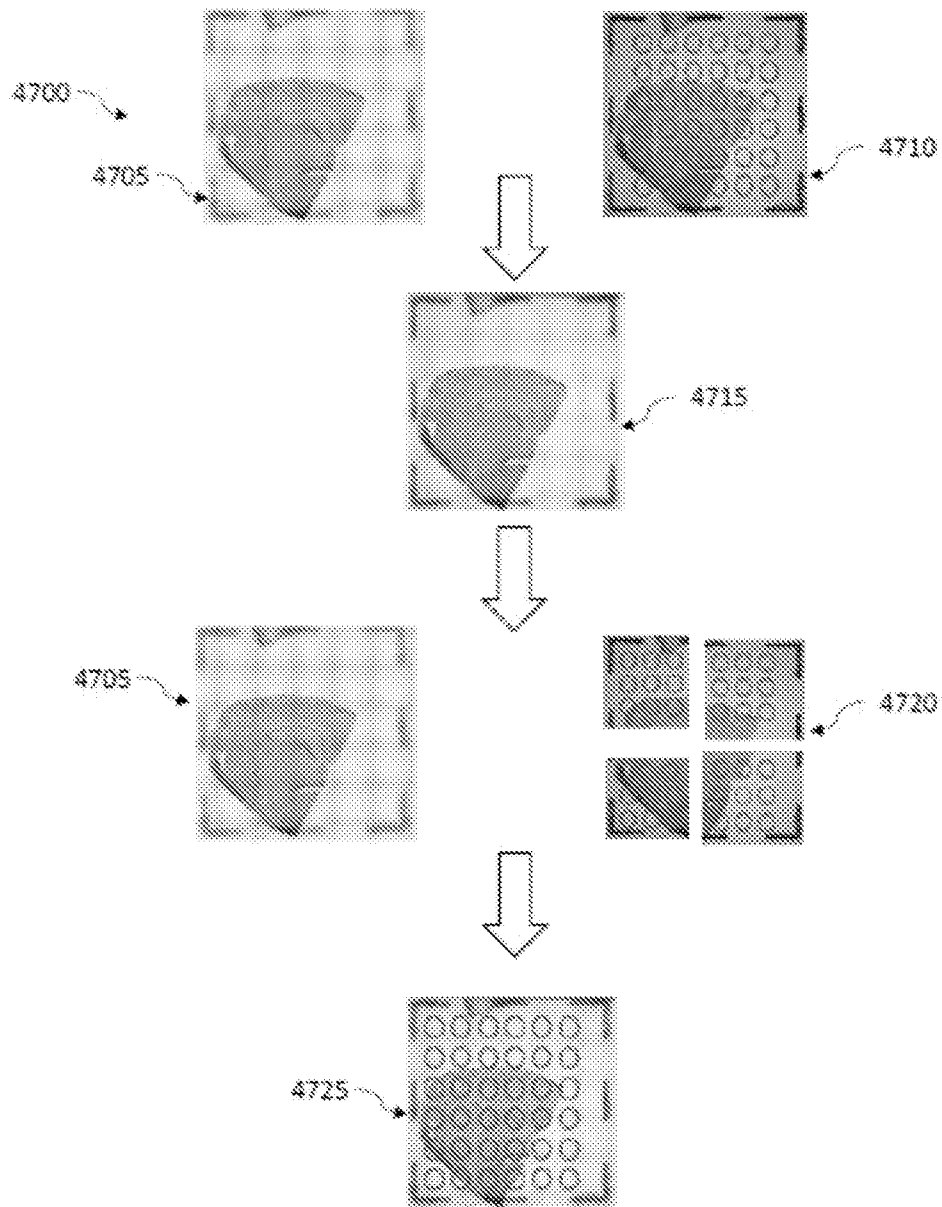


Figura 47

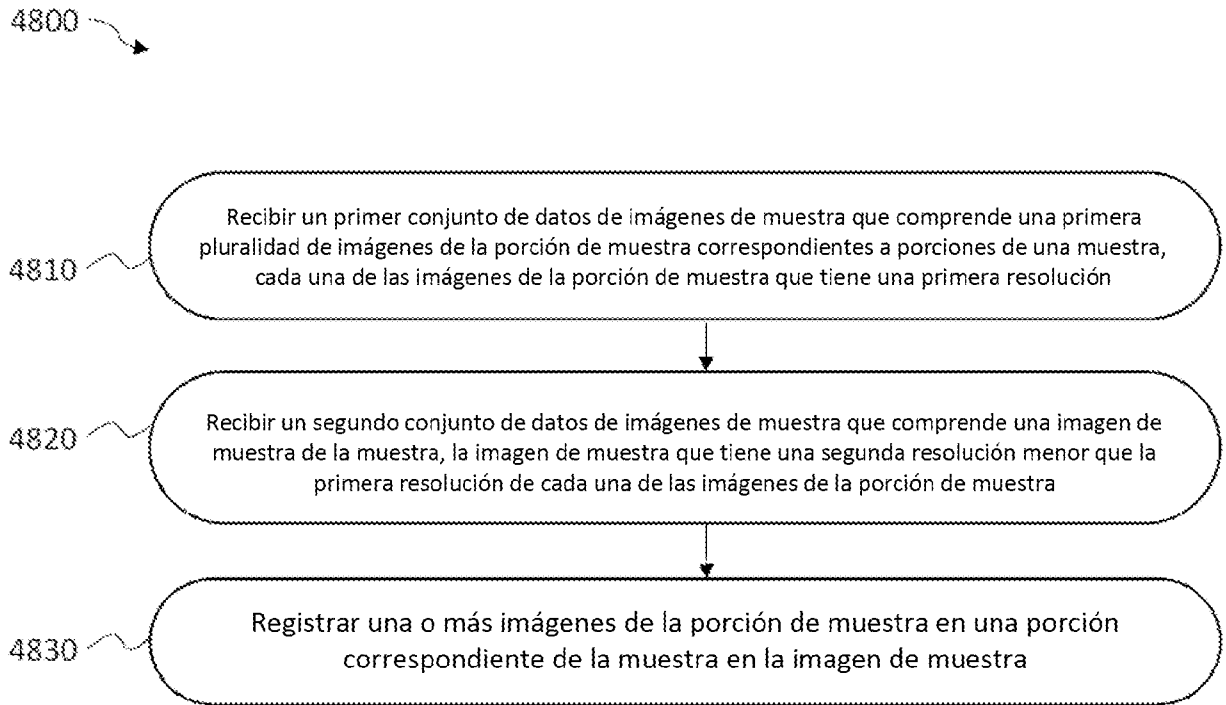


Figura 48

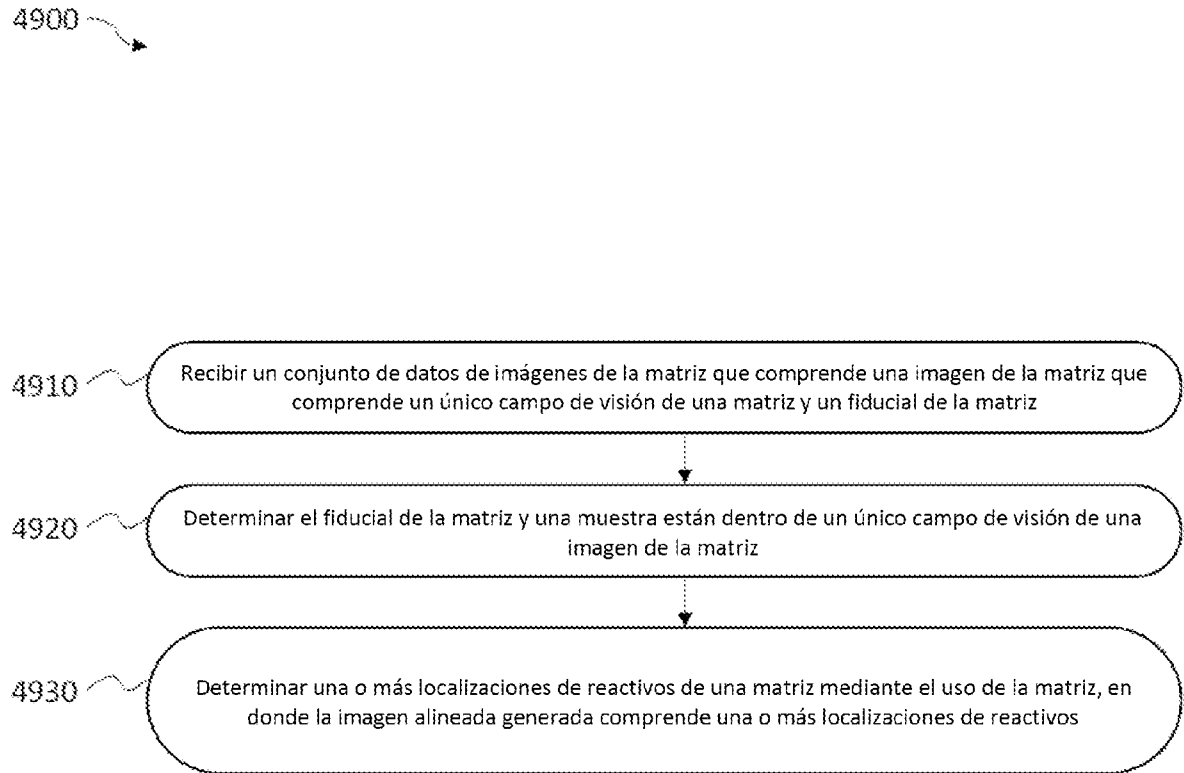


Figura 49

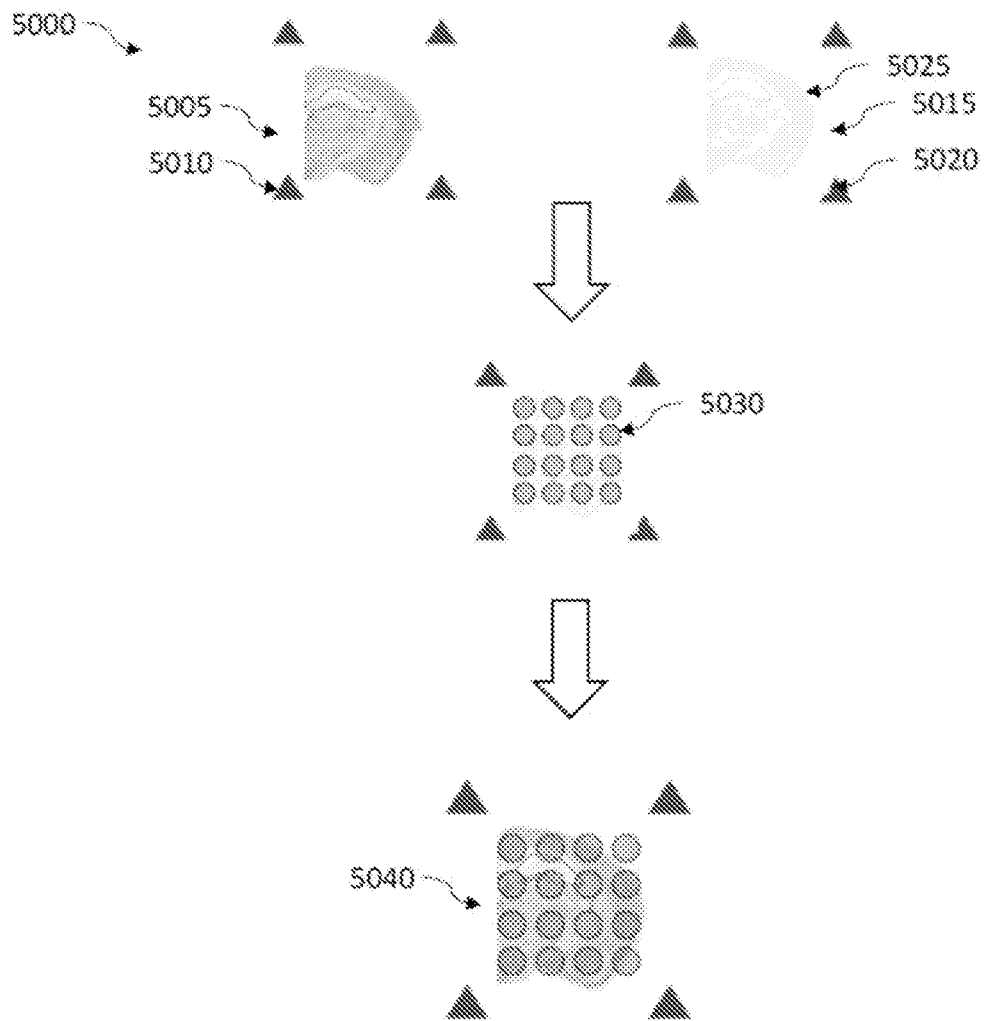


Figura 50

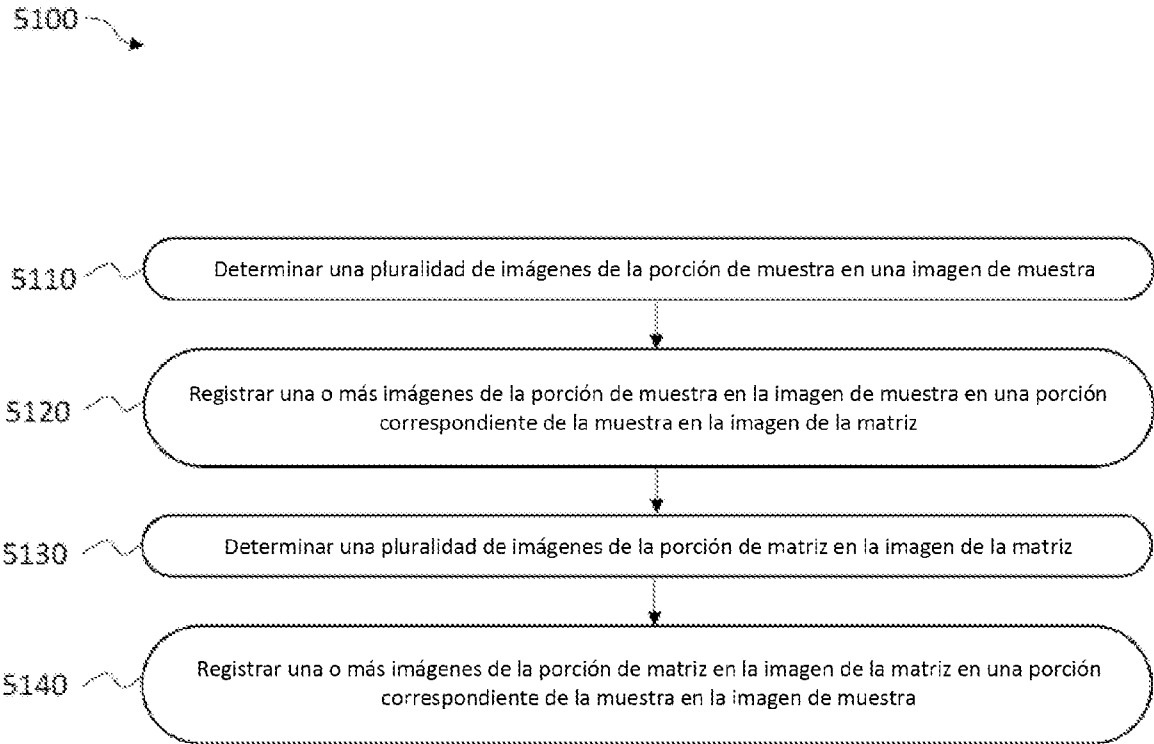


Figura 51

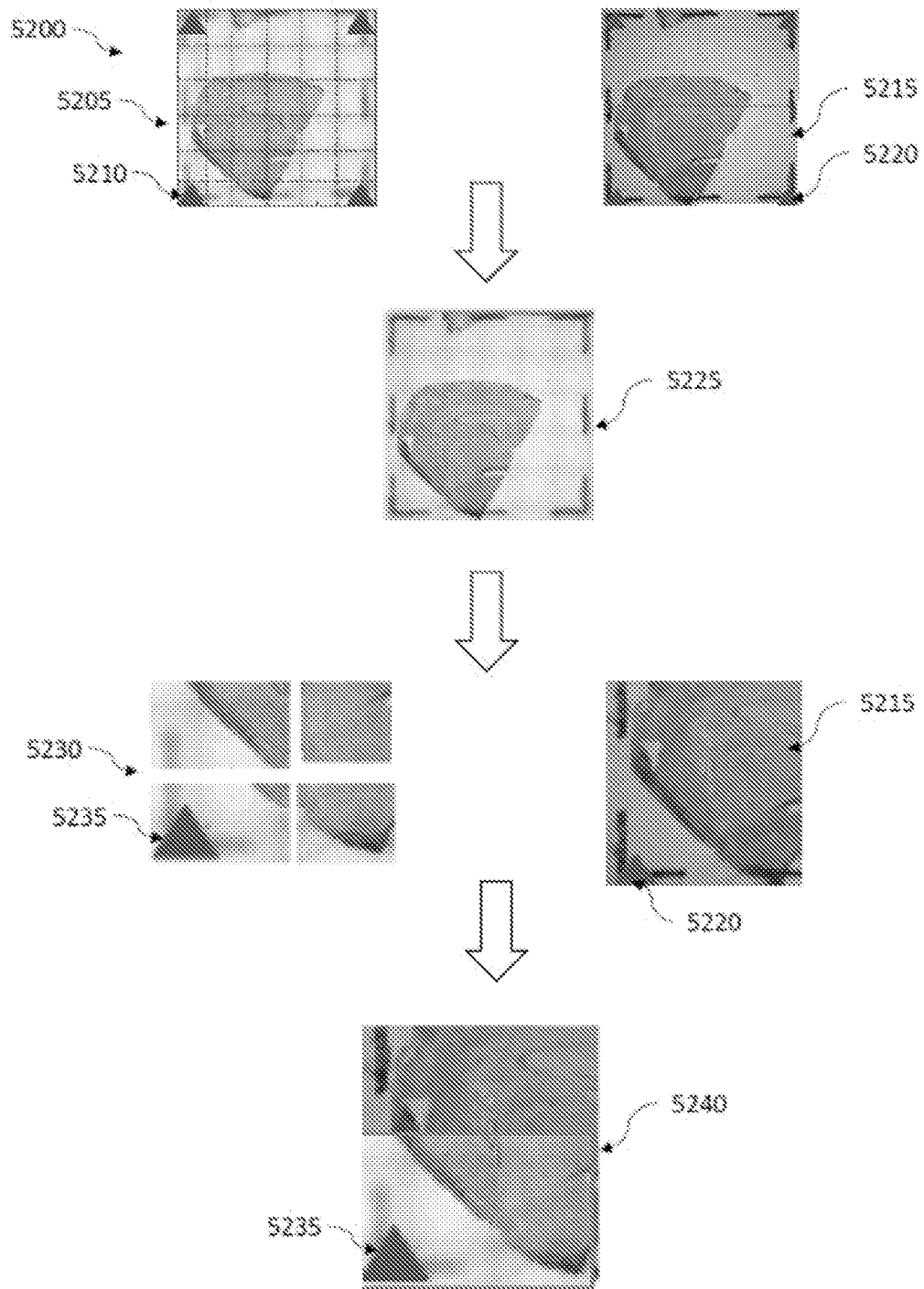


Figura 52

5300

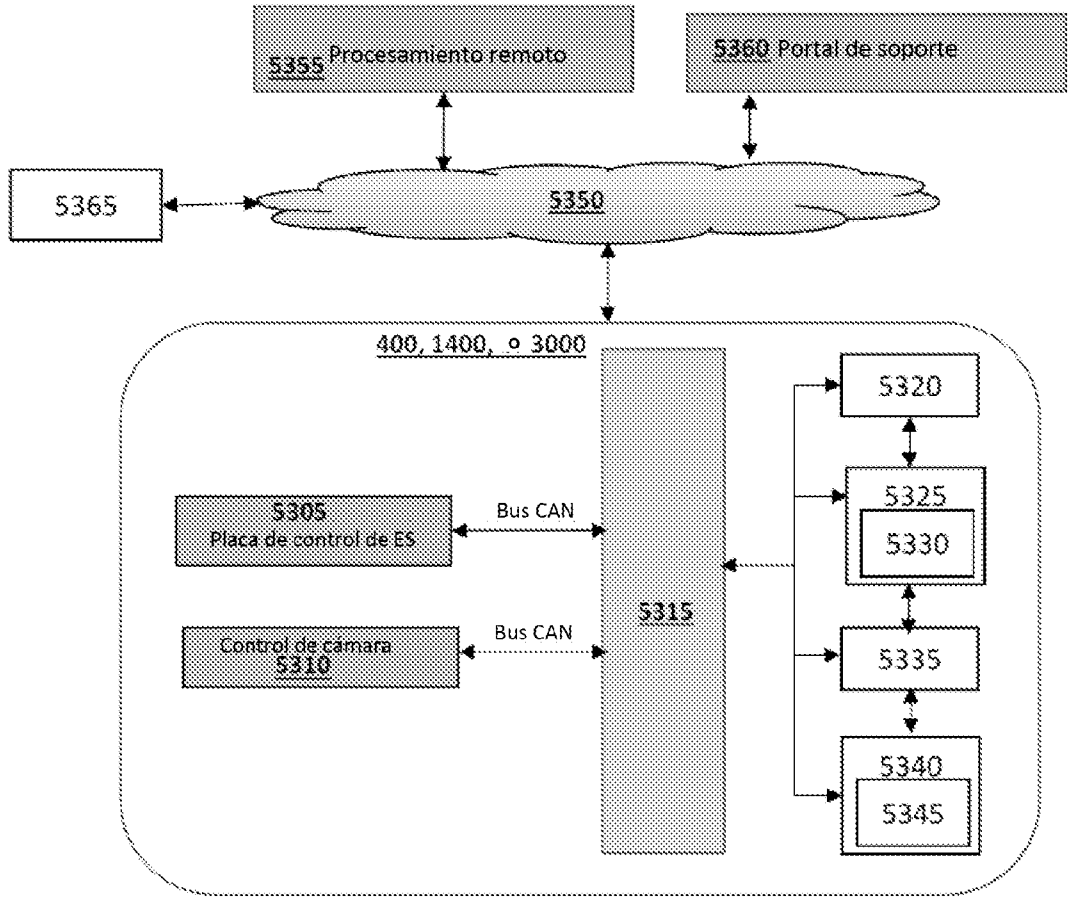


Figura 53

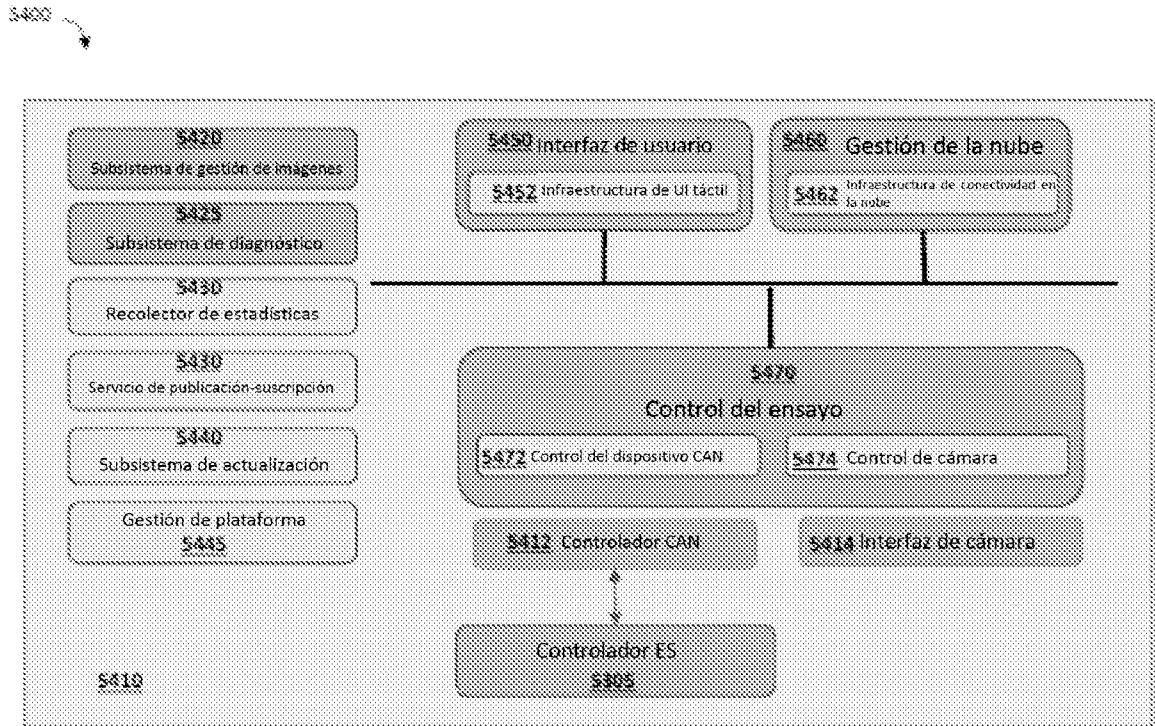


Figura 54

5500

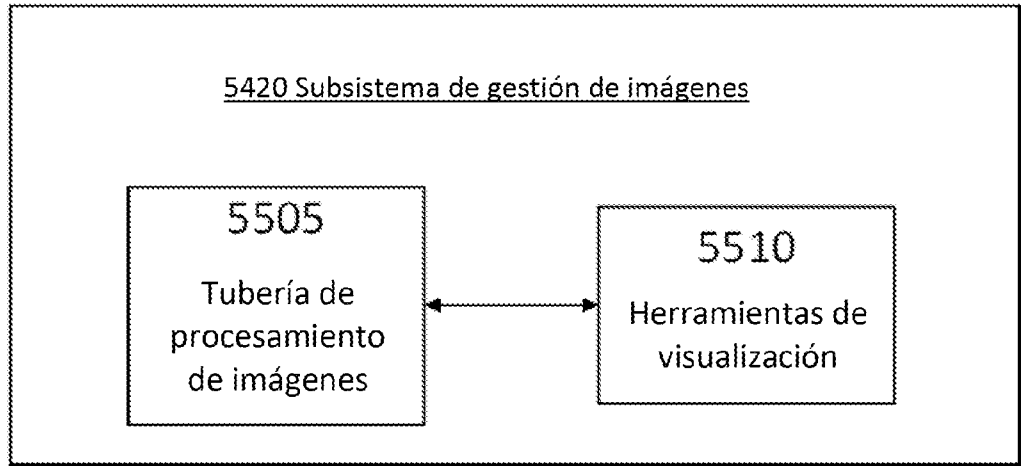


Figura 55

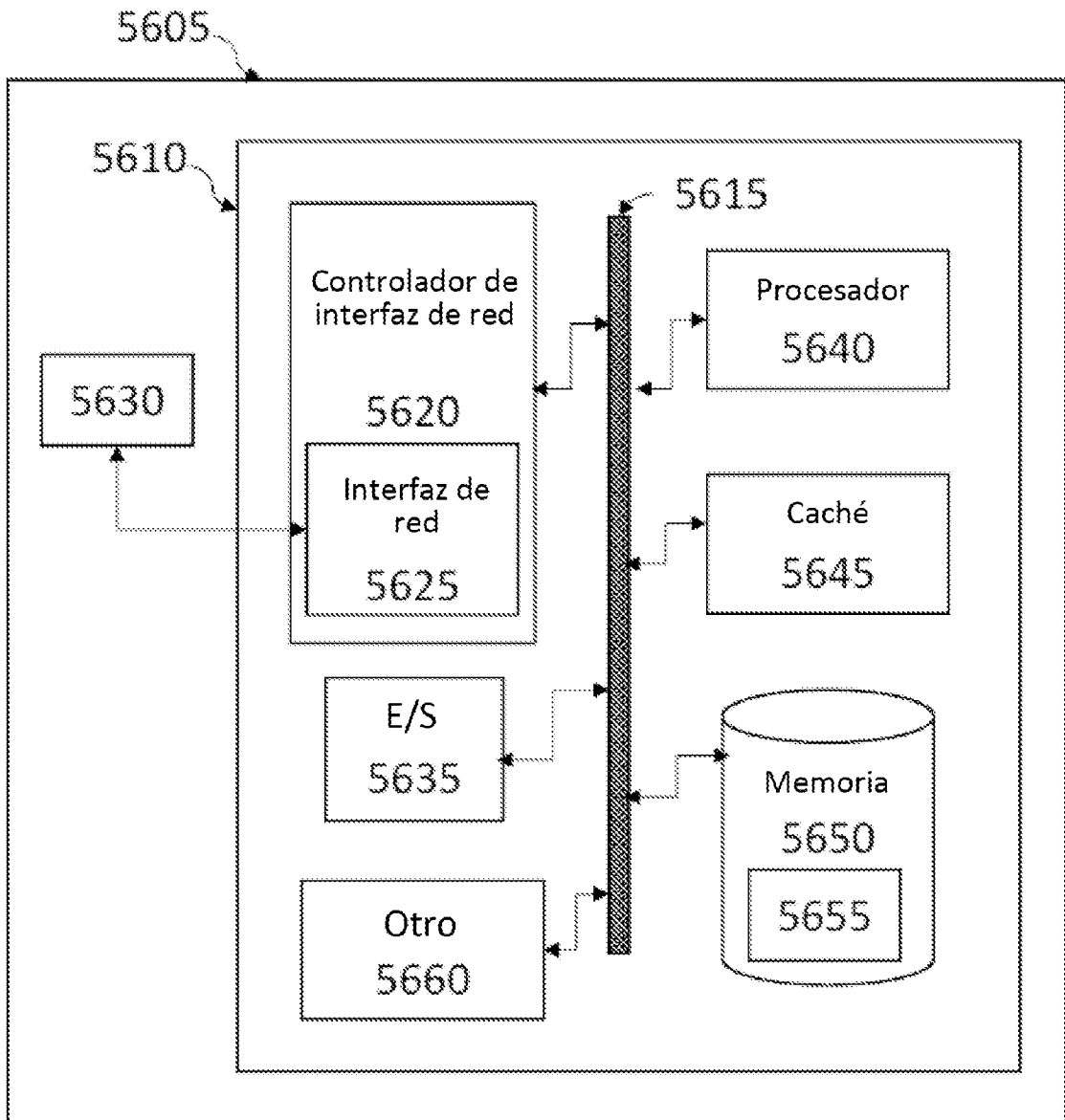


Figura 56

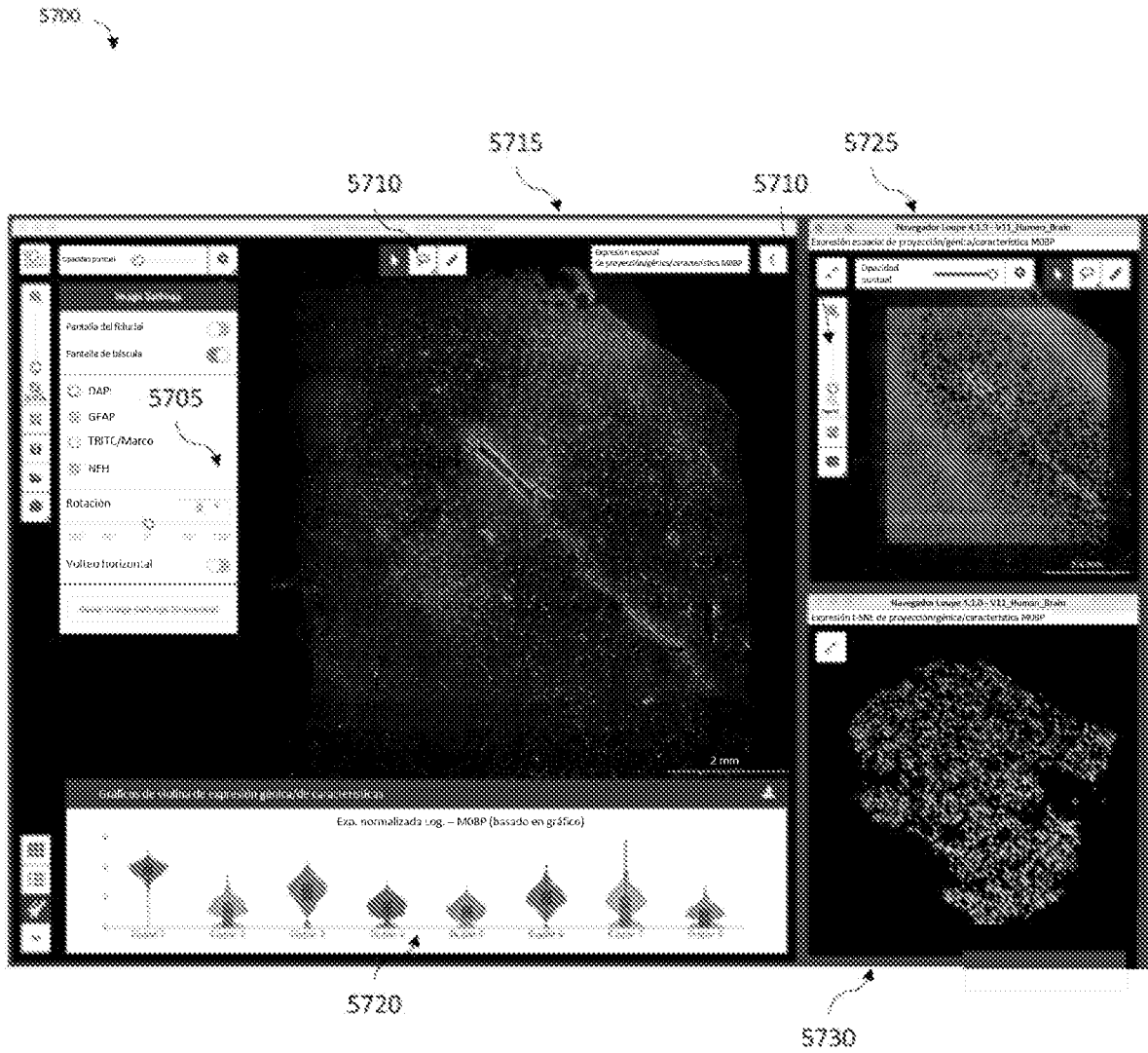


Figura 57

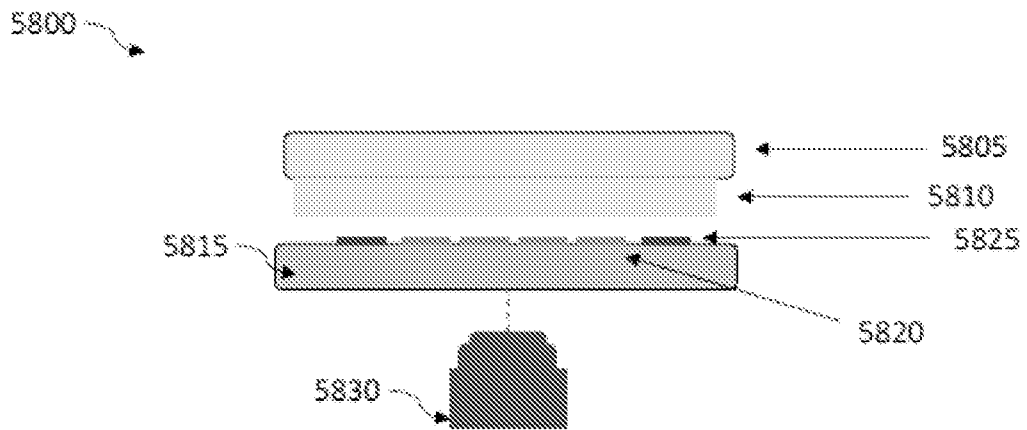


Figura 58A

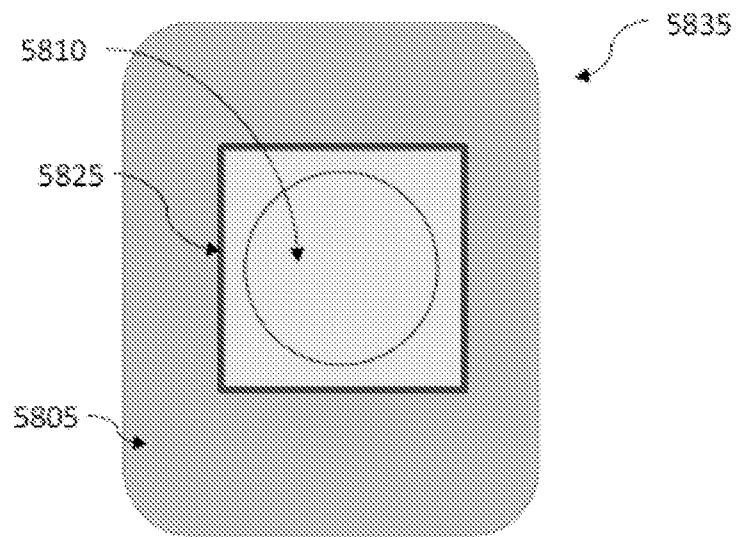


Figura 58B

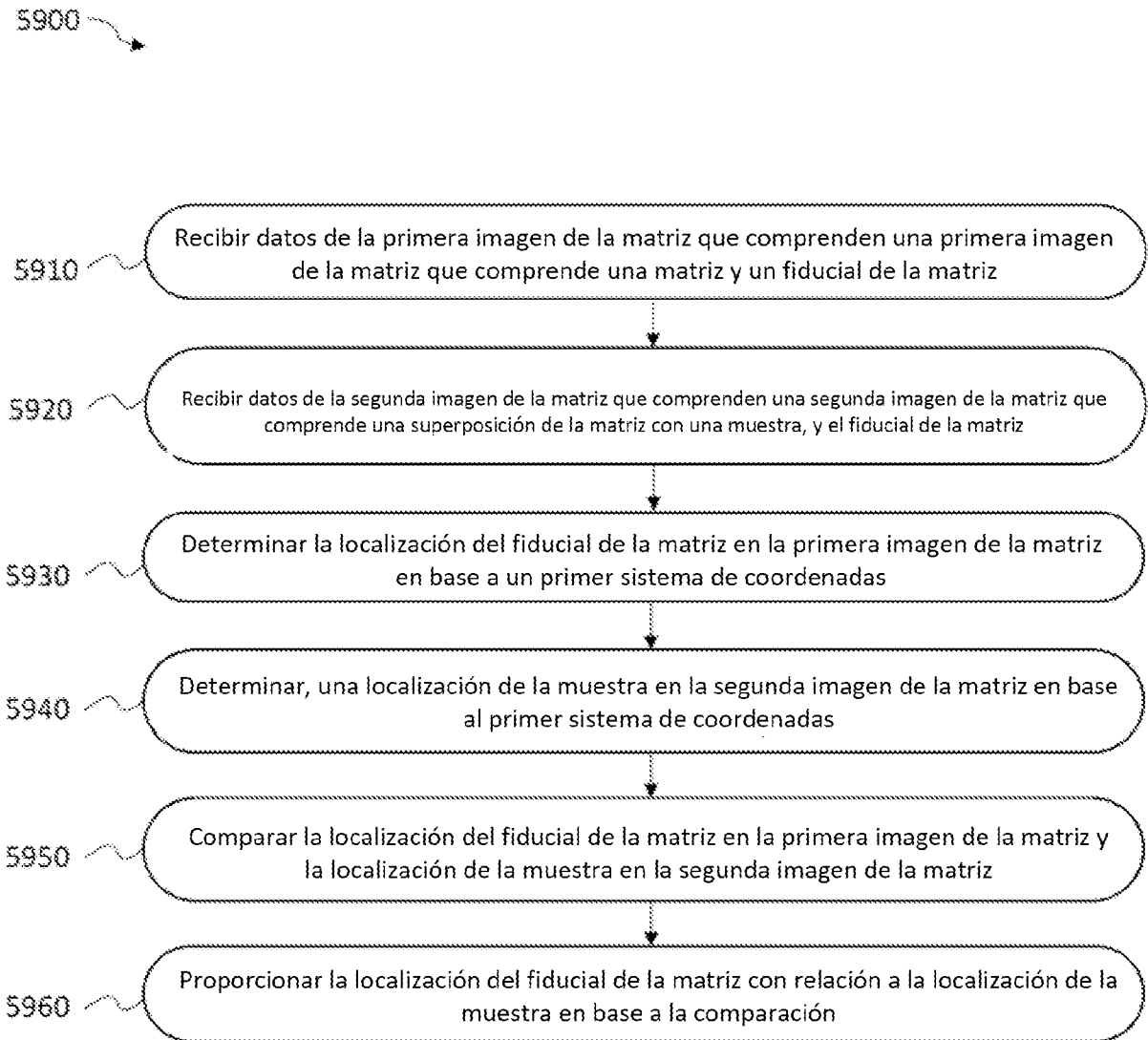


Figura 59

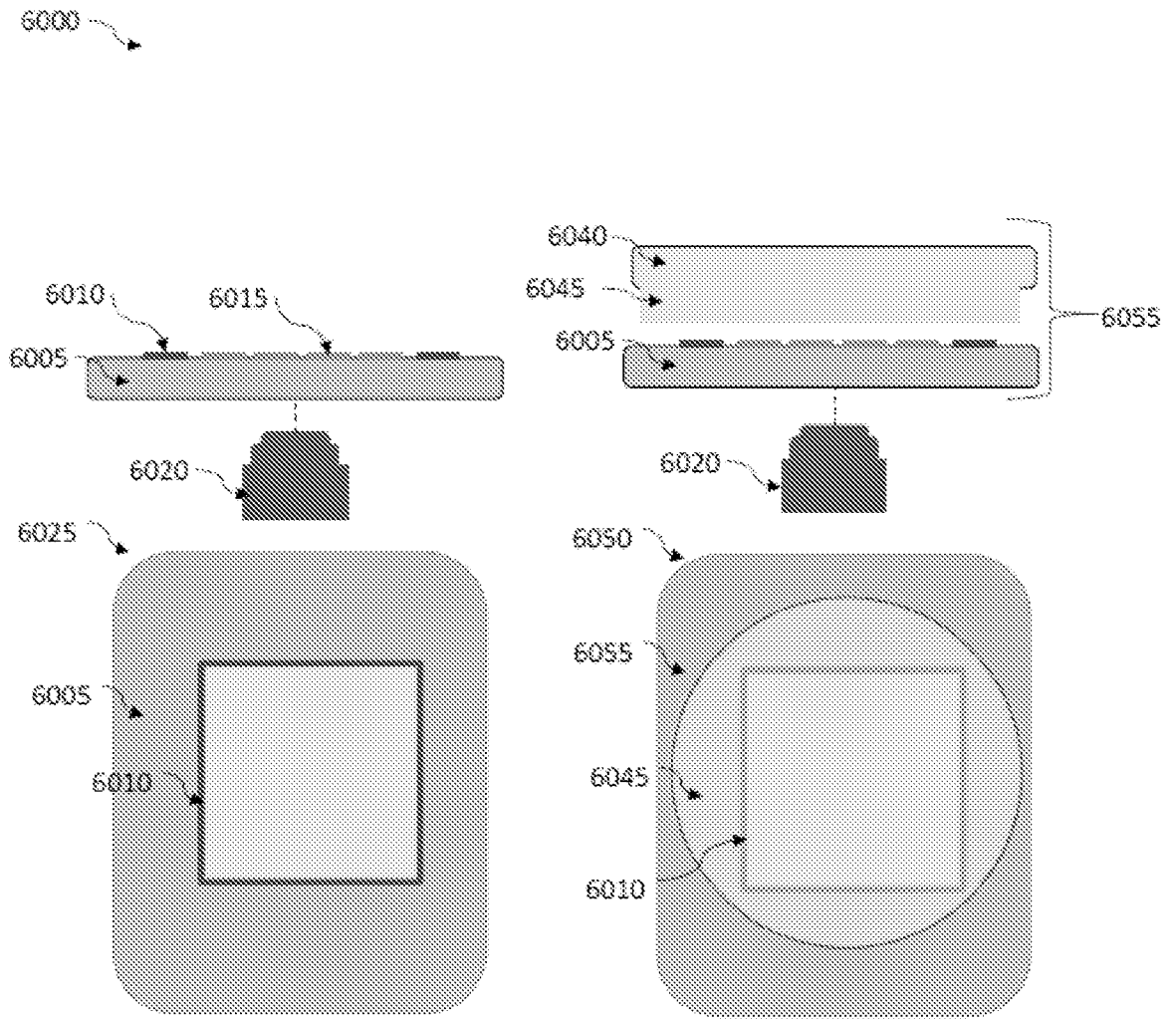


Figura 60A

Figura 60B

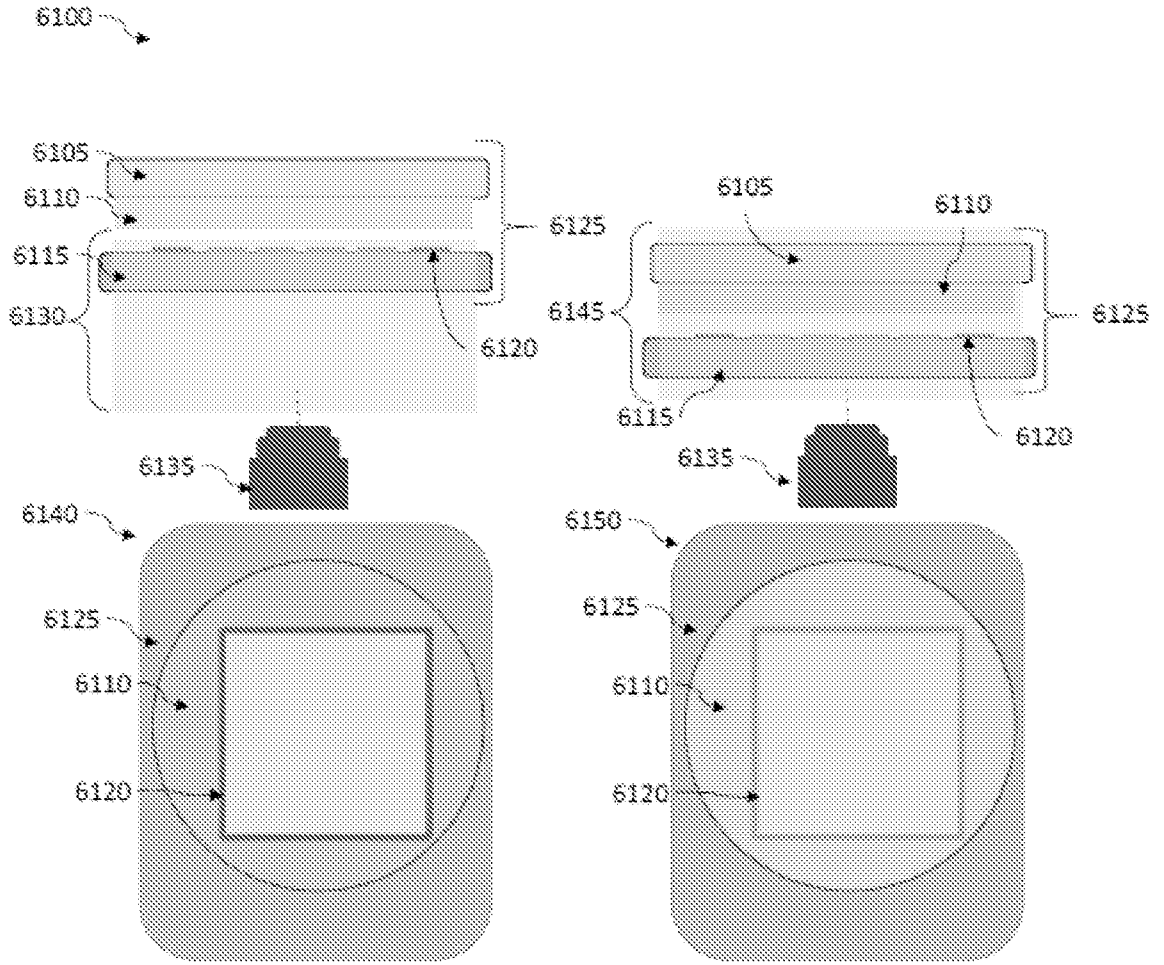


Figura 61A

Figura 61B

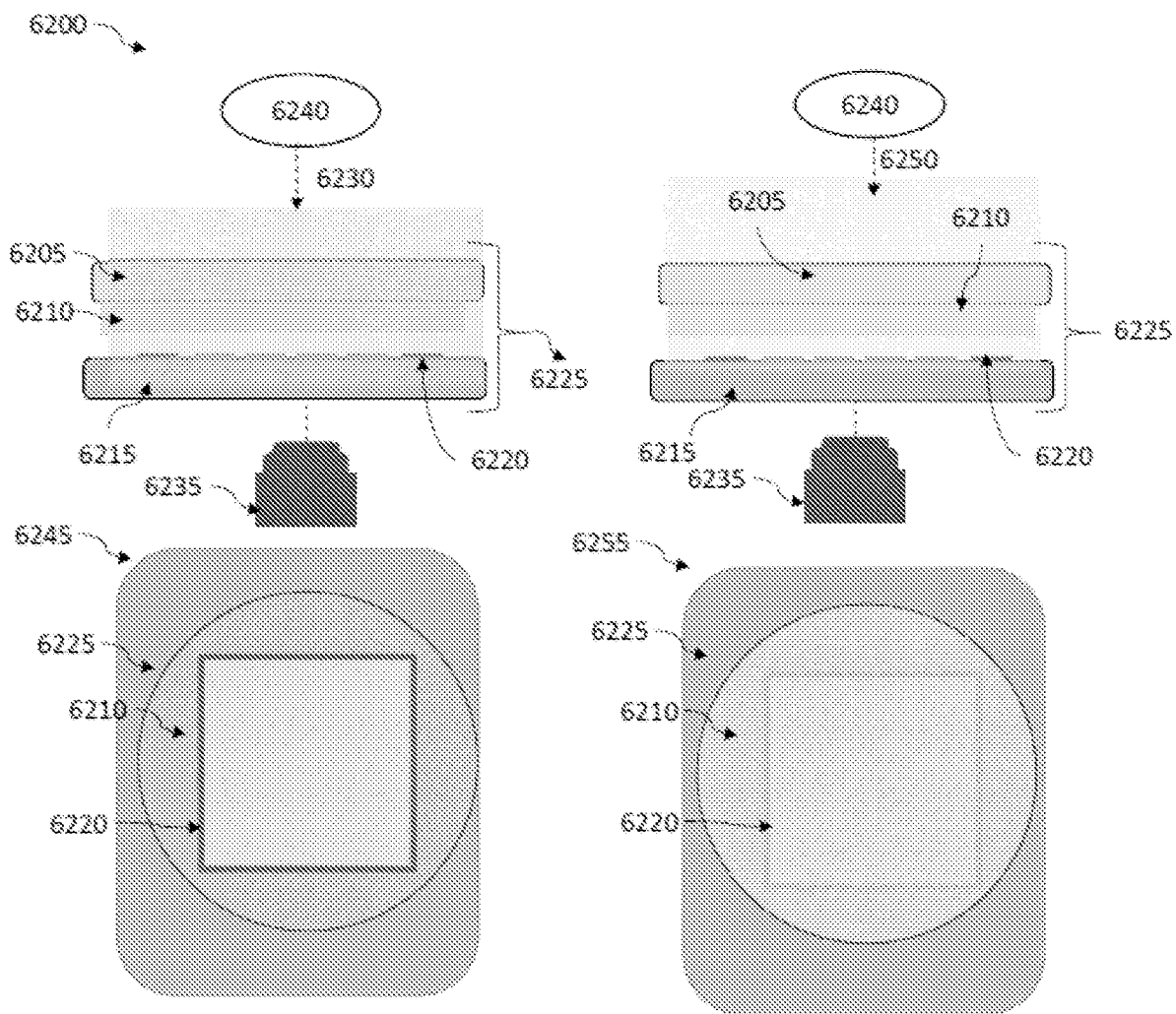


Figura 62A

Figura 62B

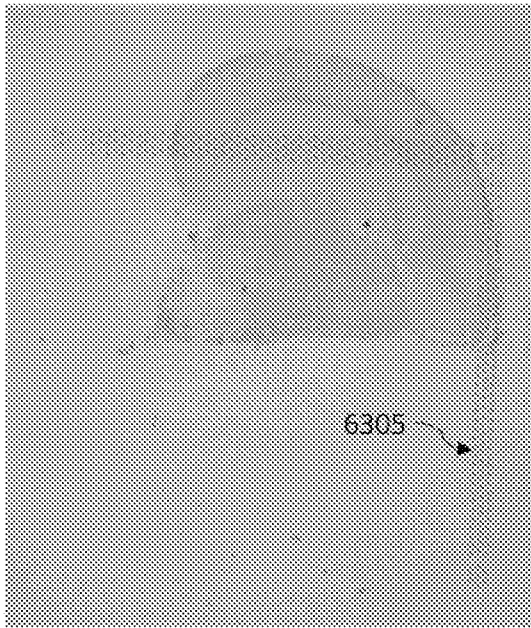


Figura 63A

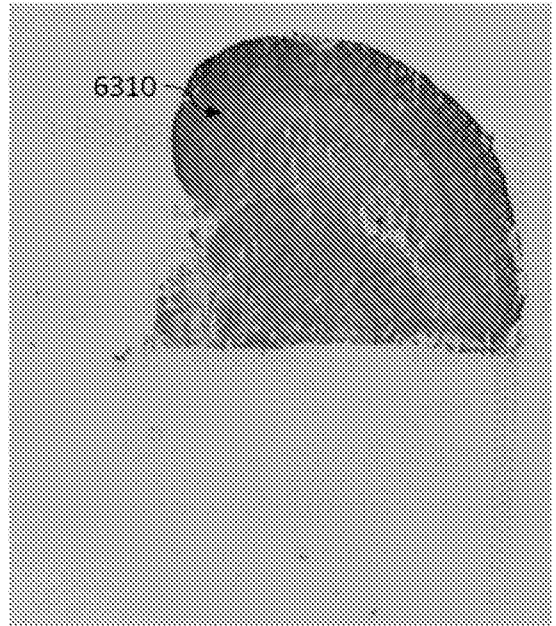


Figura 63B

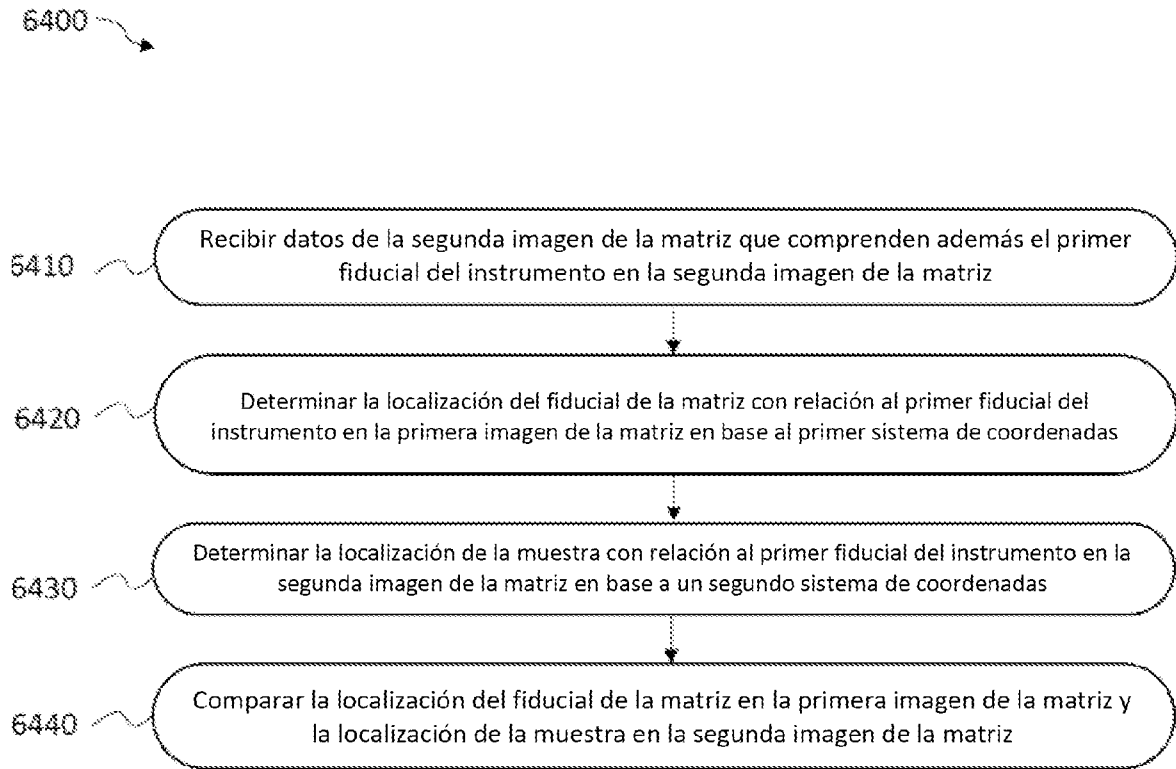


Figura 64

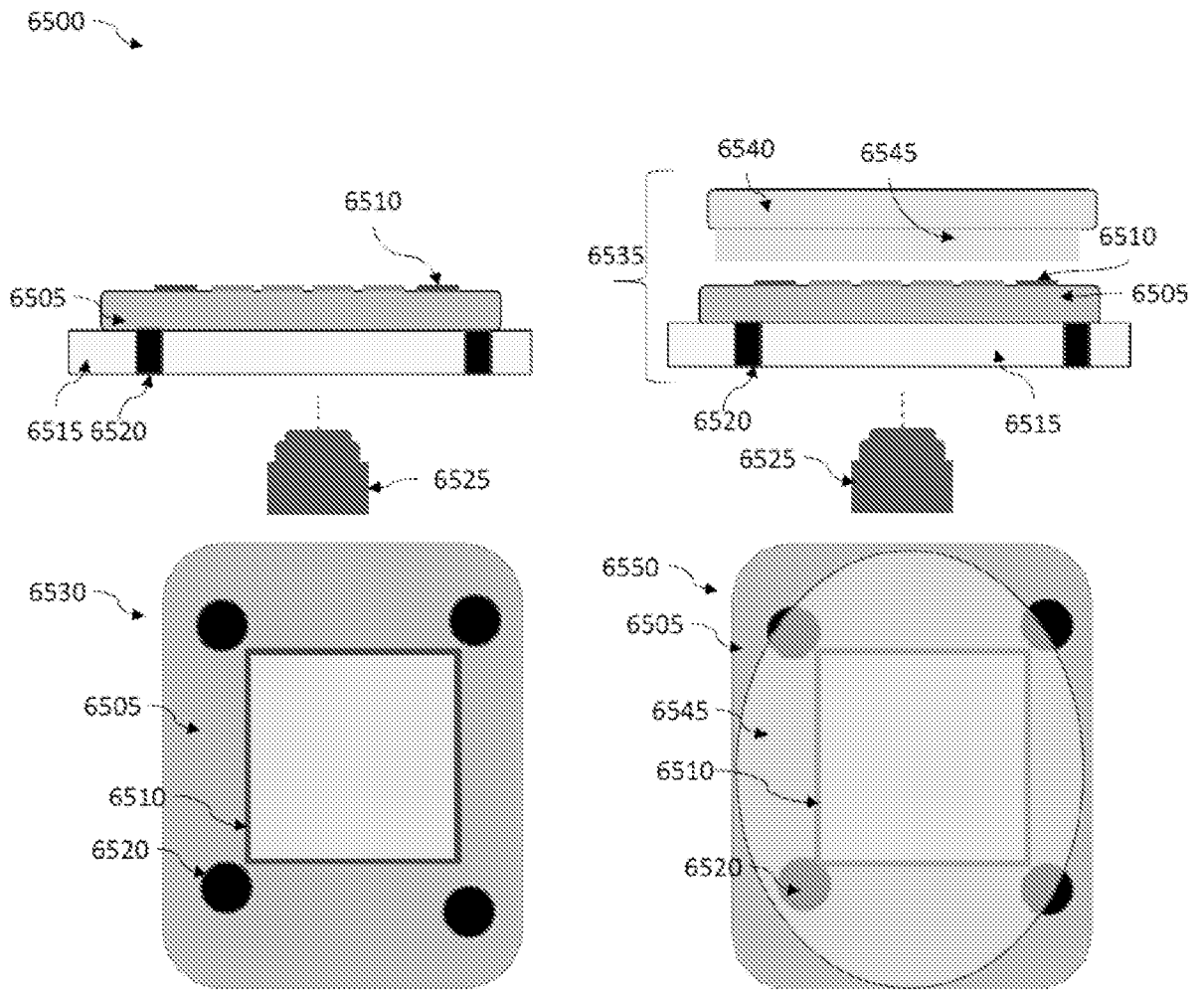


Figura 65A

Figura 65B

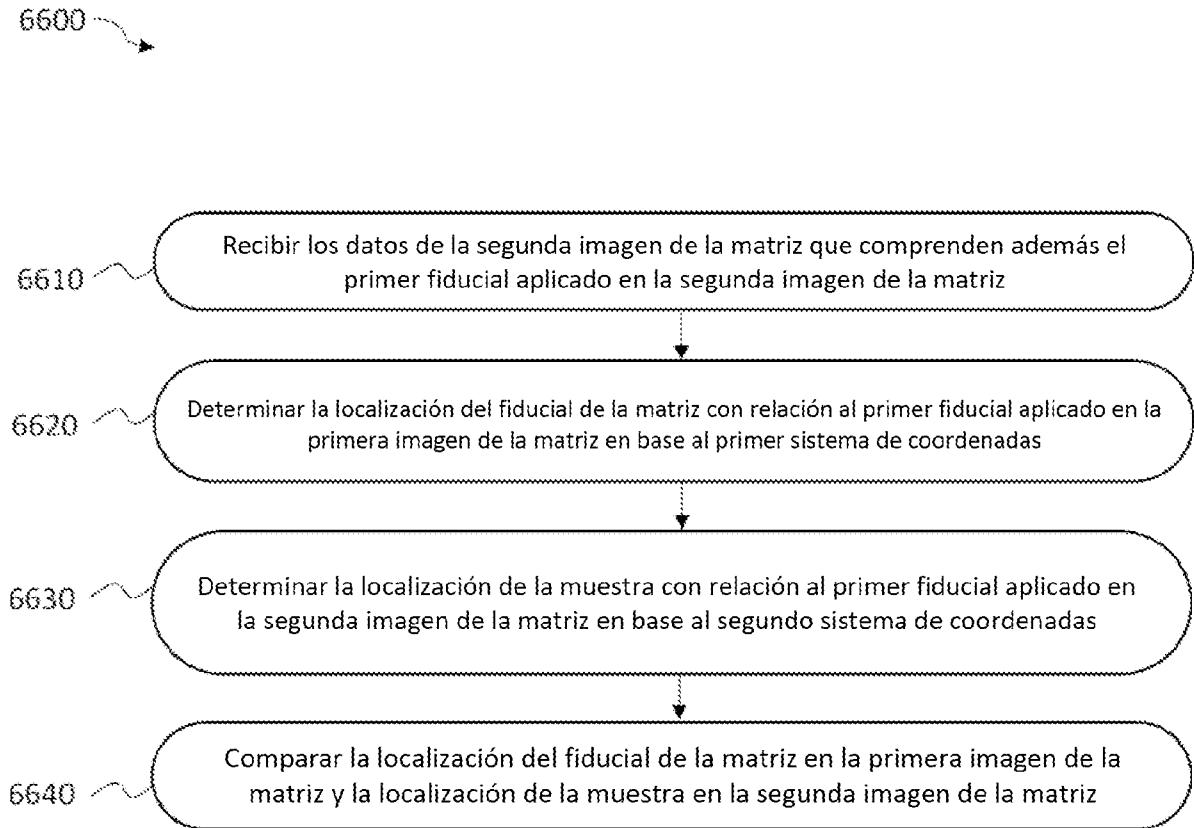


Figura 66

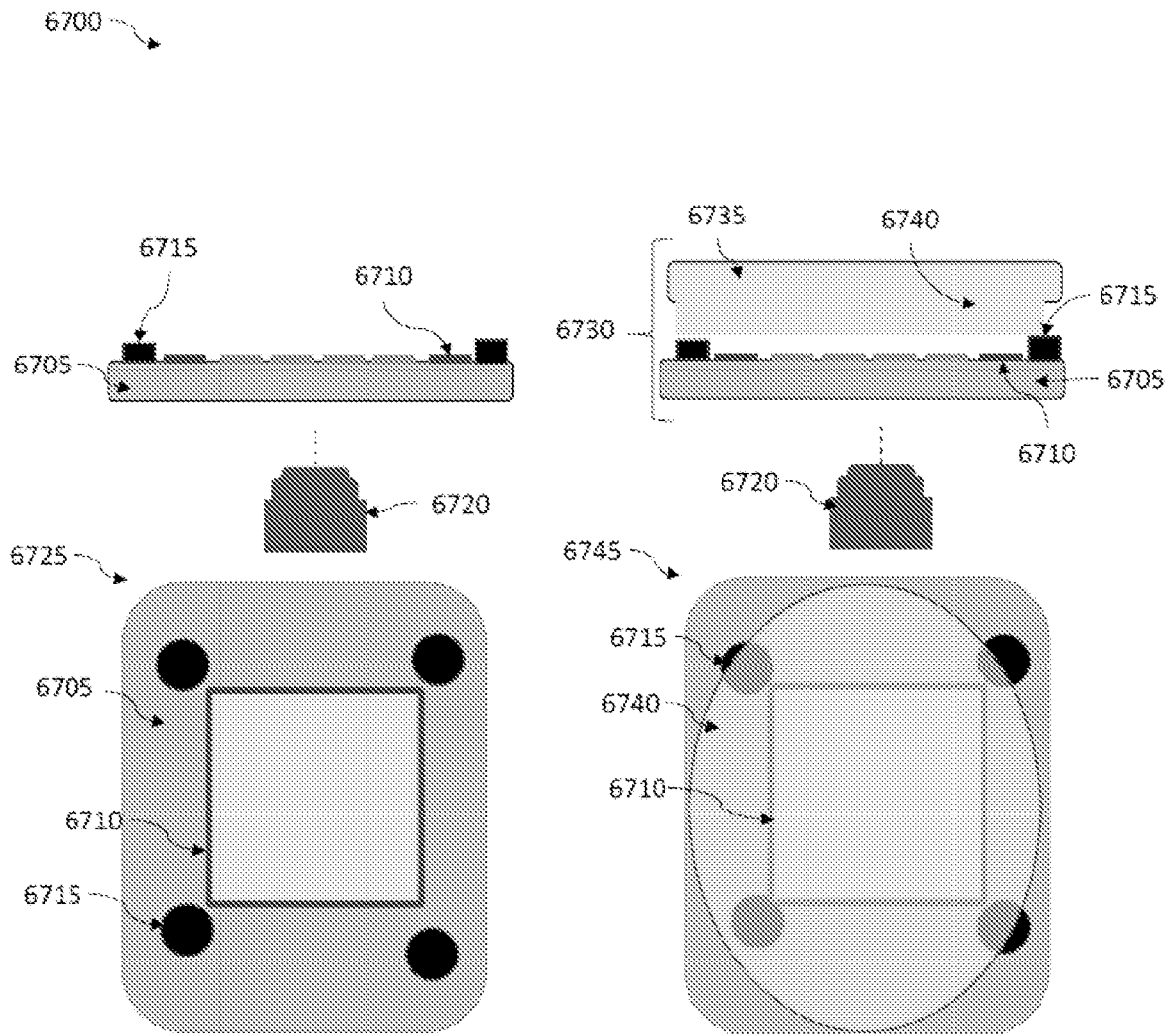


Figura 67A

Figura 67B

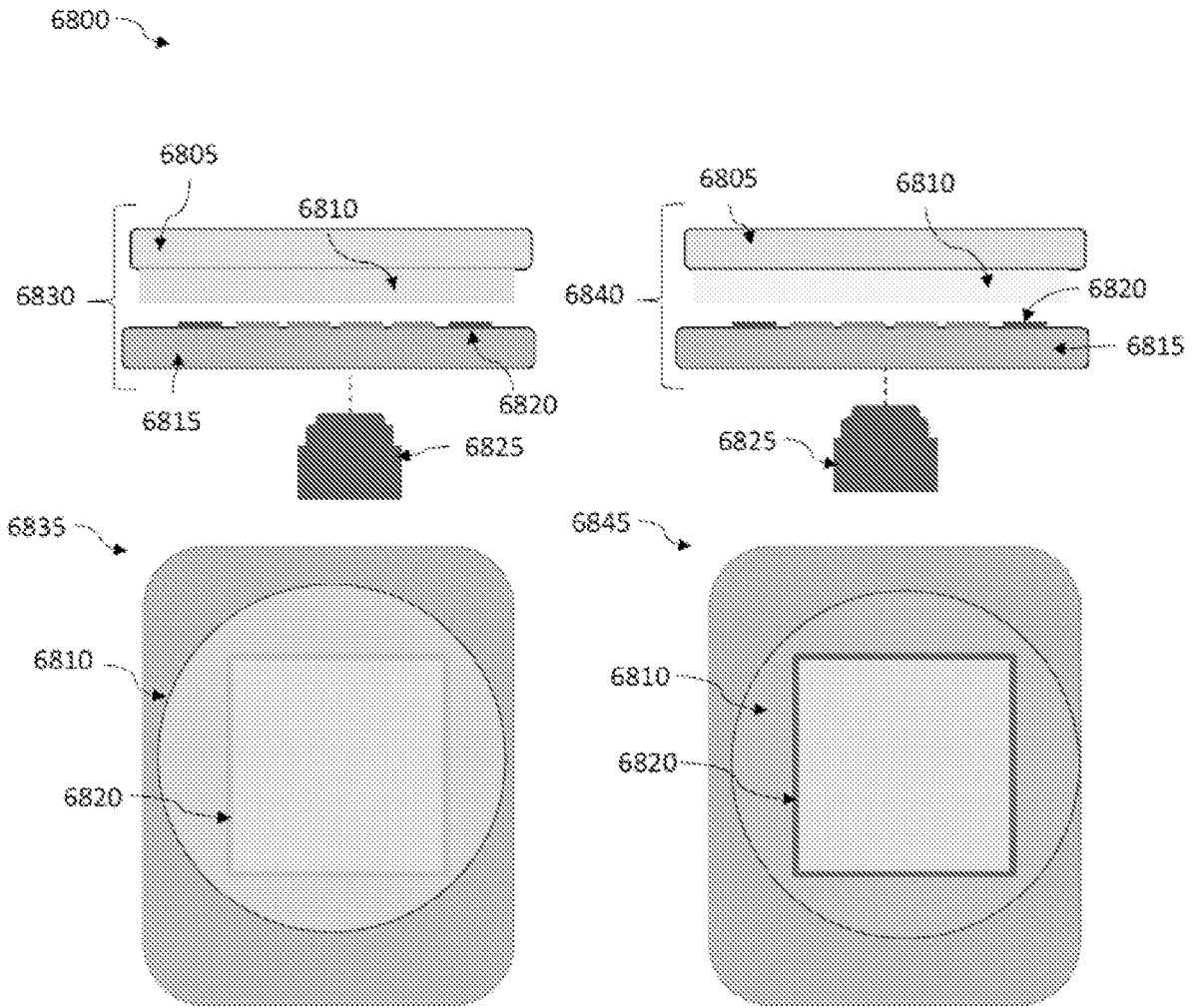


Figura 68A

Figura 68B

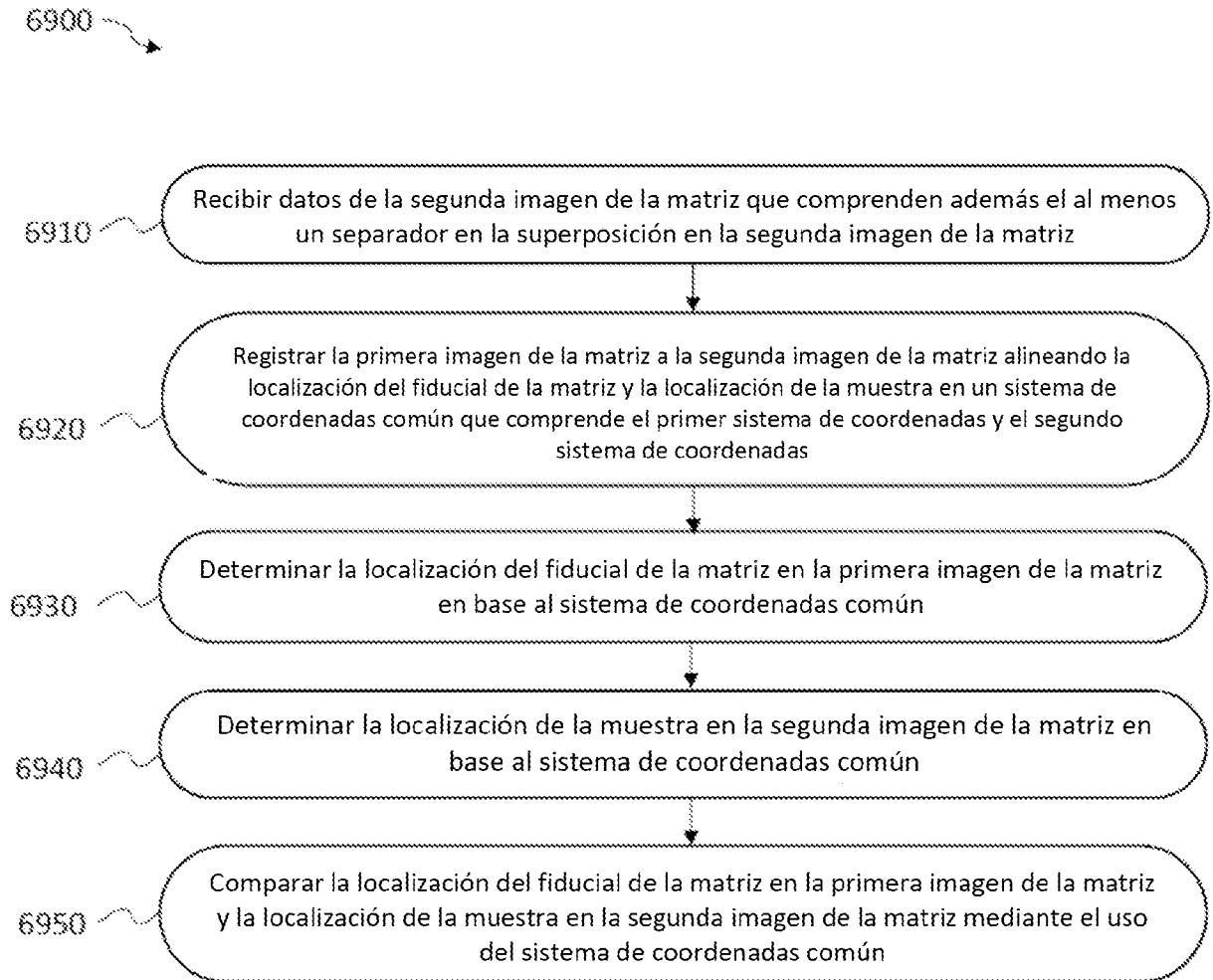


Figura 69

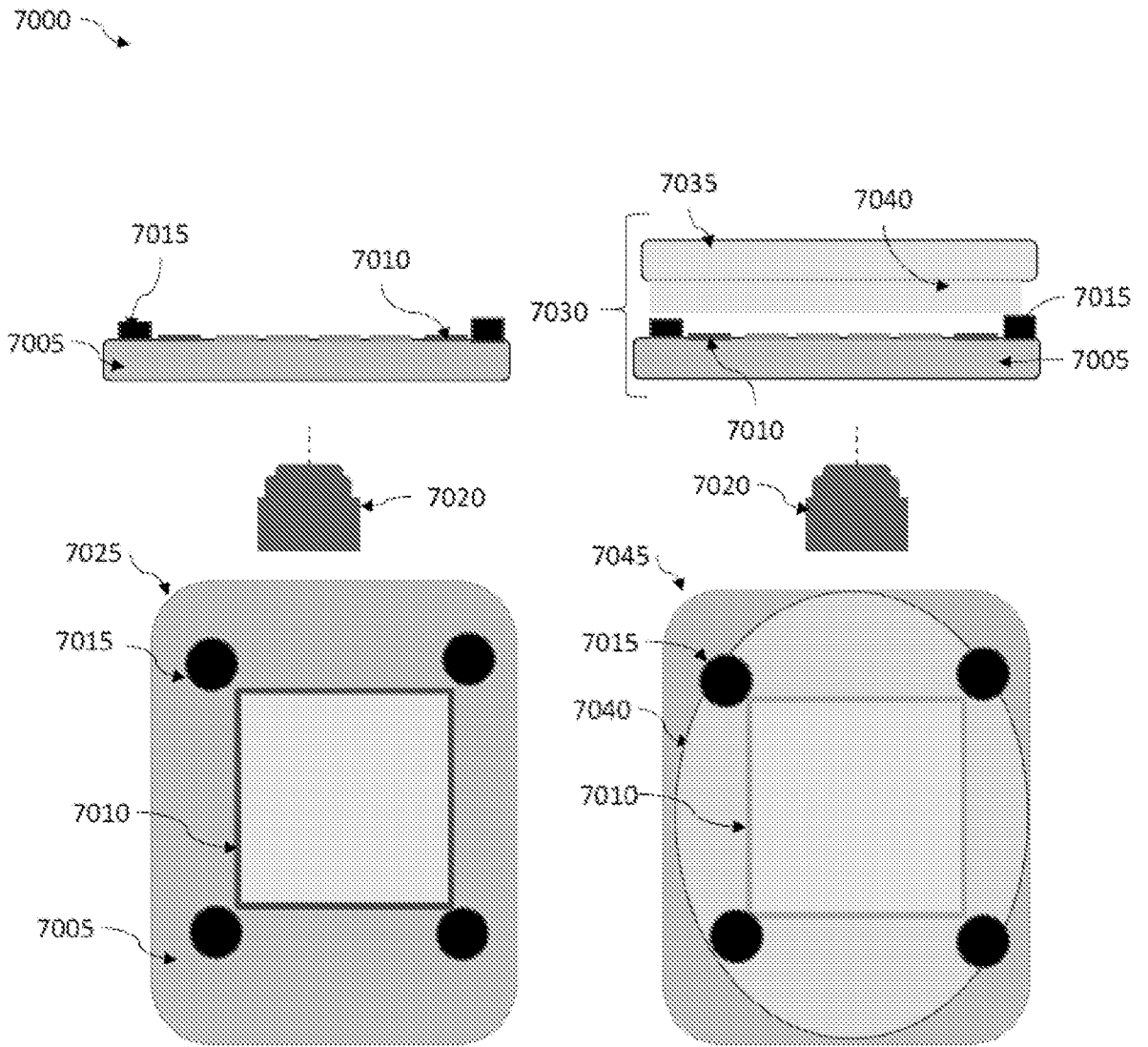


Figura 70A

Figura 70B

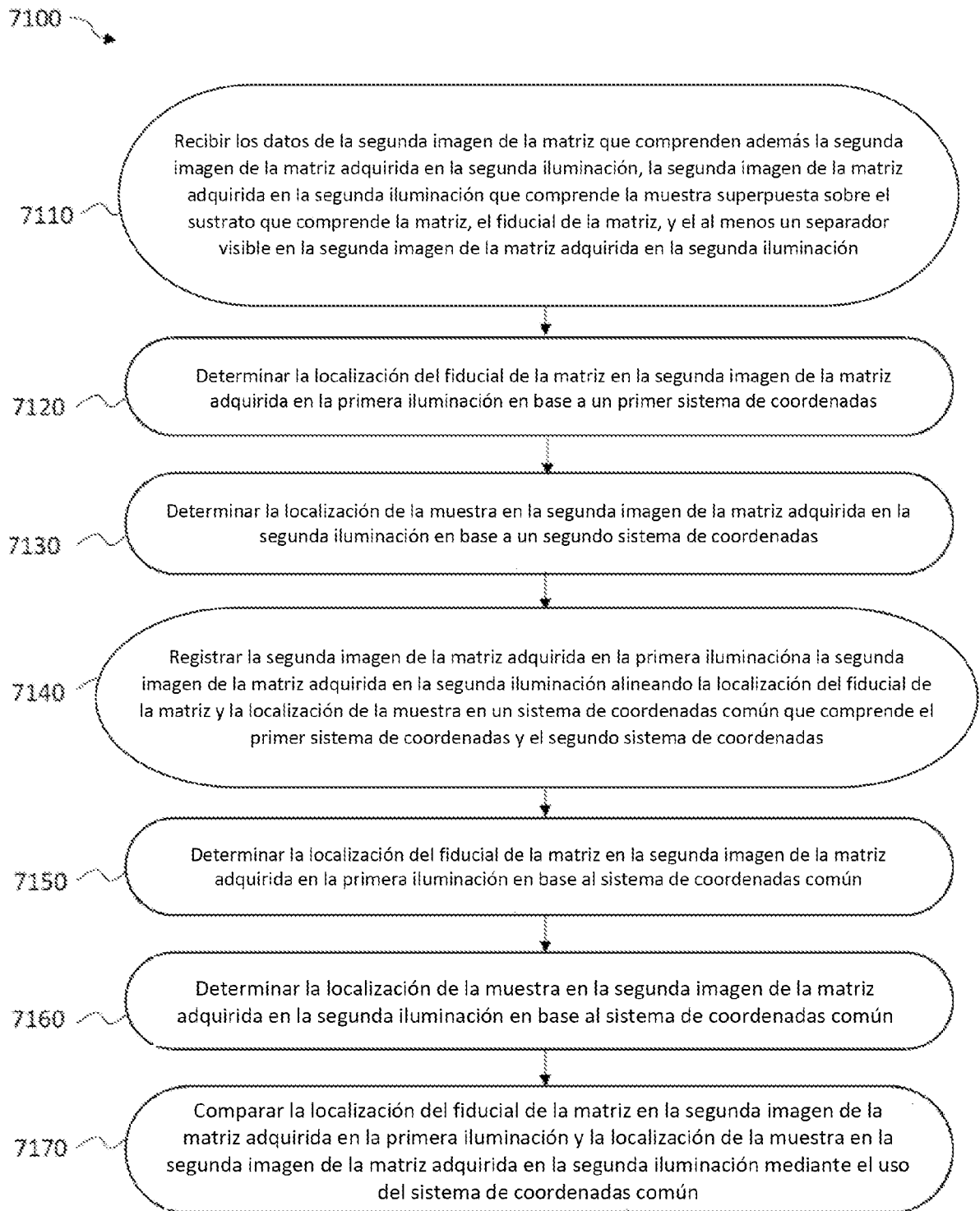


Figura 71

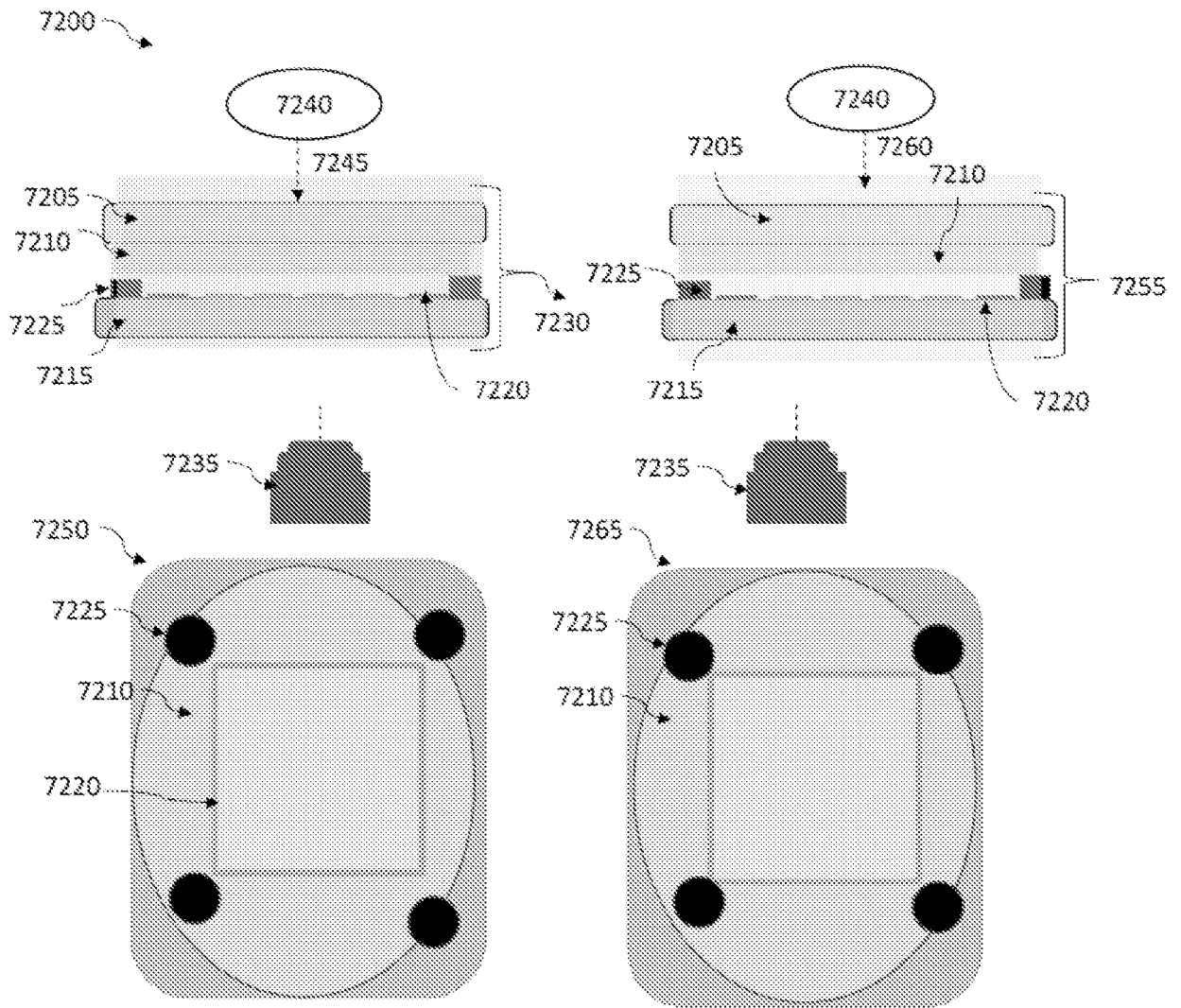


Figura 72A

Figura 72B

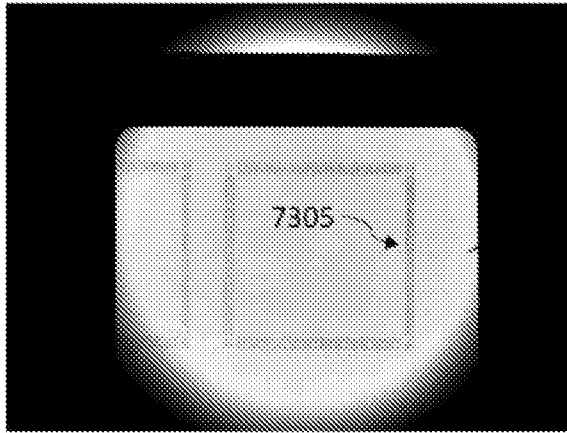


Figura 73A

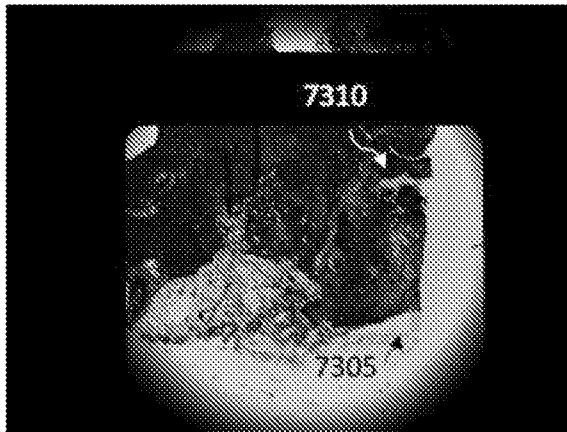


Figura 73B

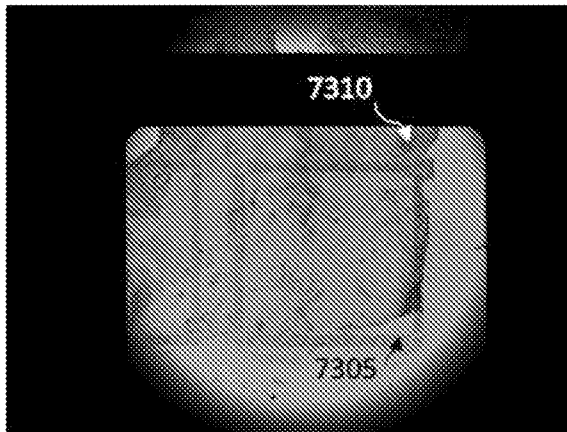


Figura 73C

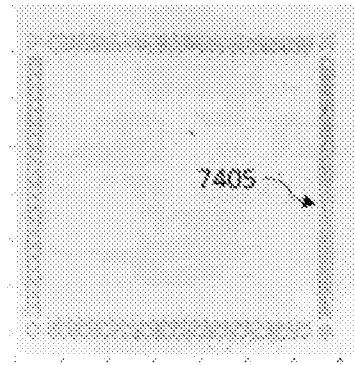


Figura 74A

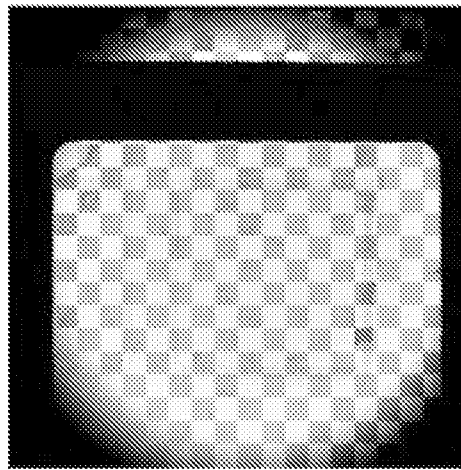


Figura 74B

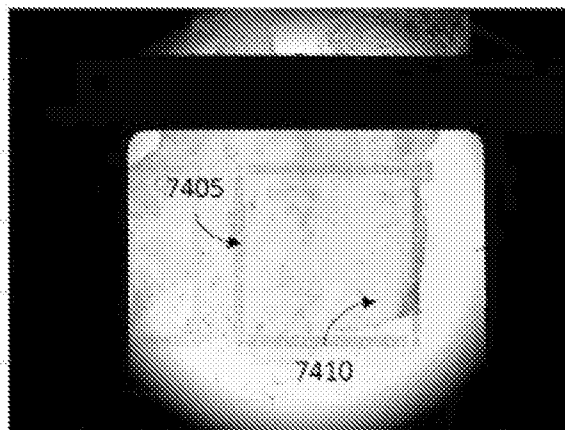


Figura 74C

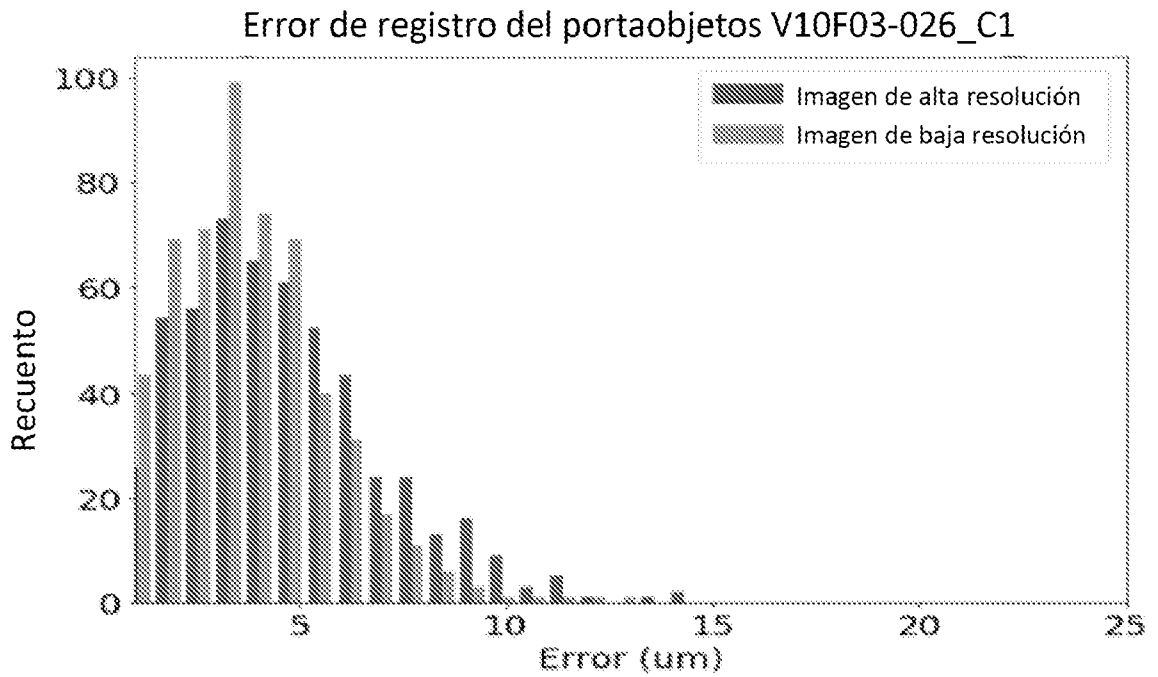


Figura 75A

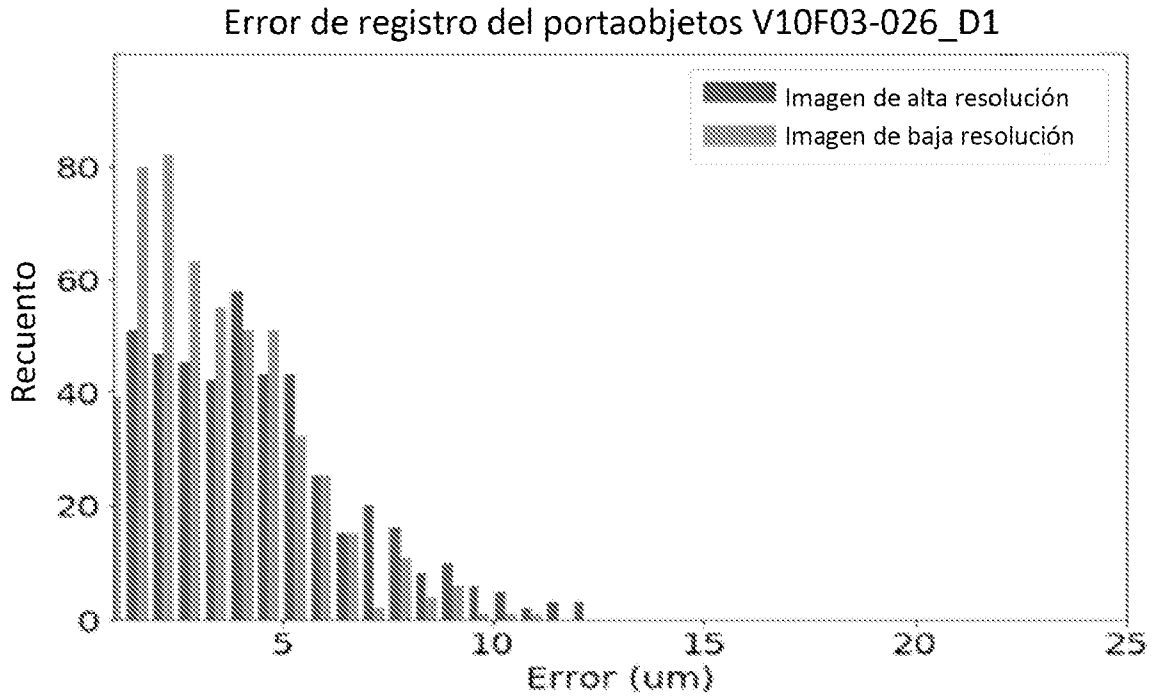


Figura 75B

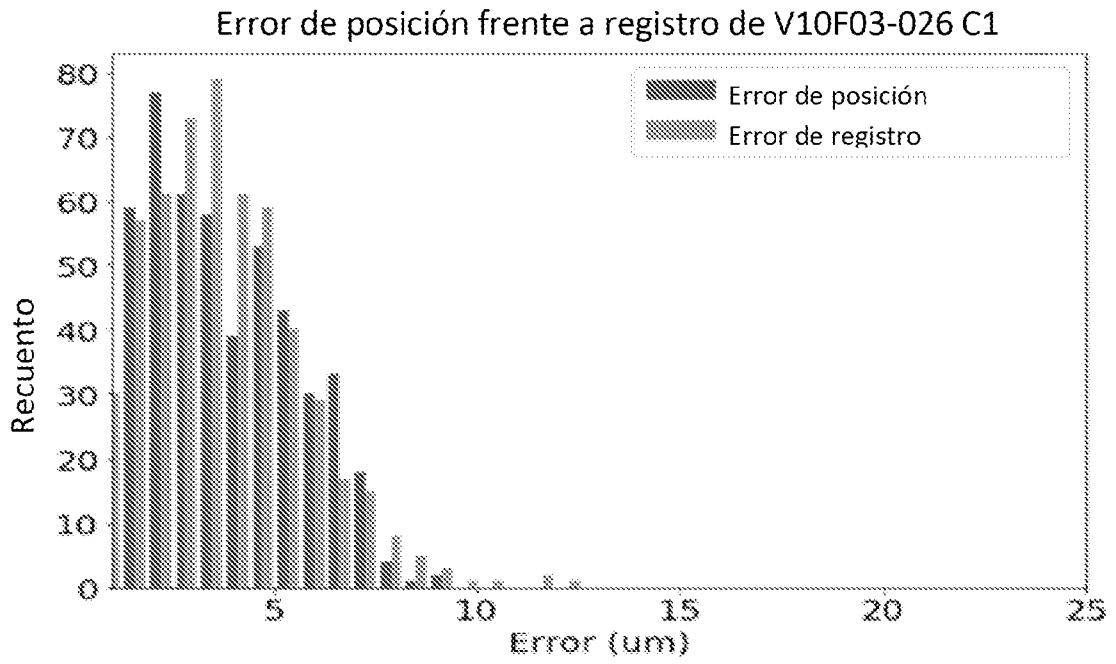


Figura 75C

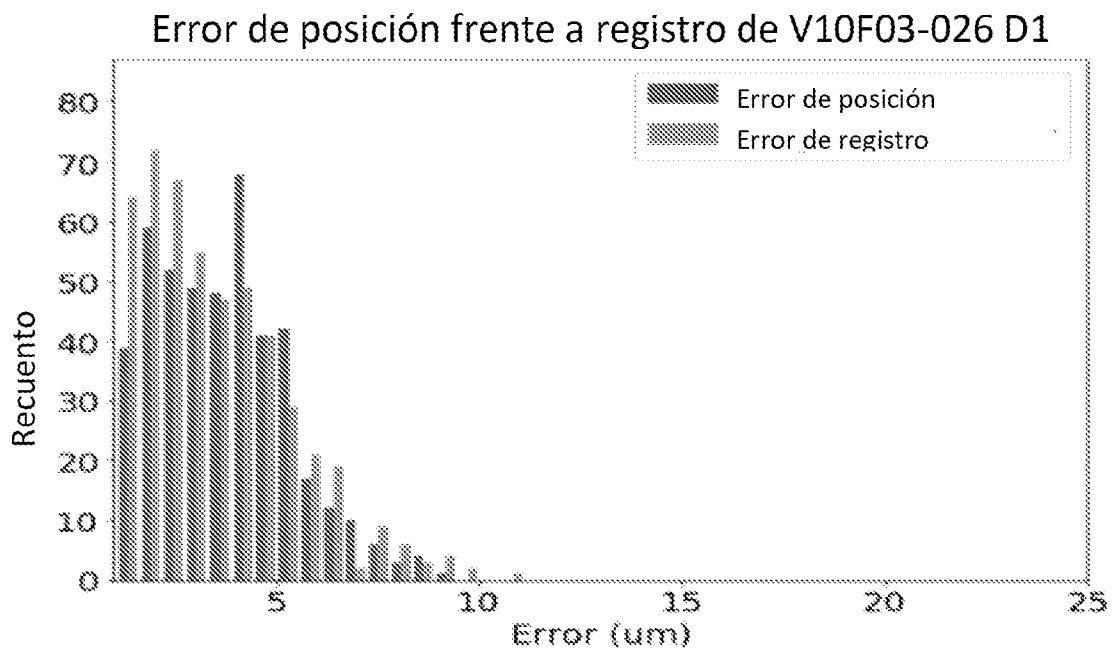


Figura 75D

7600

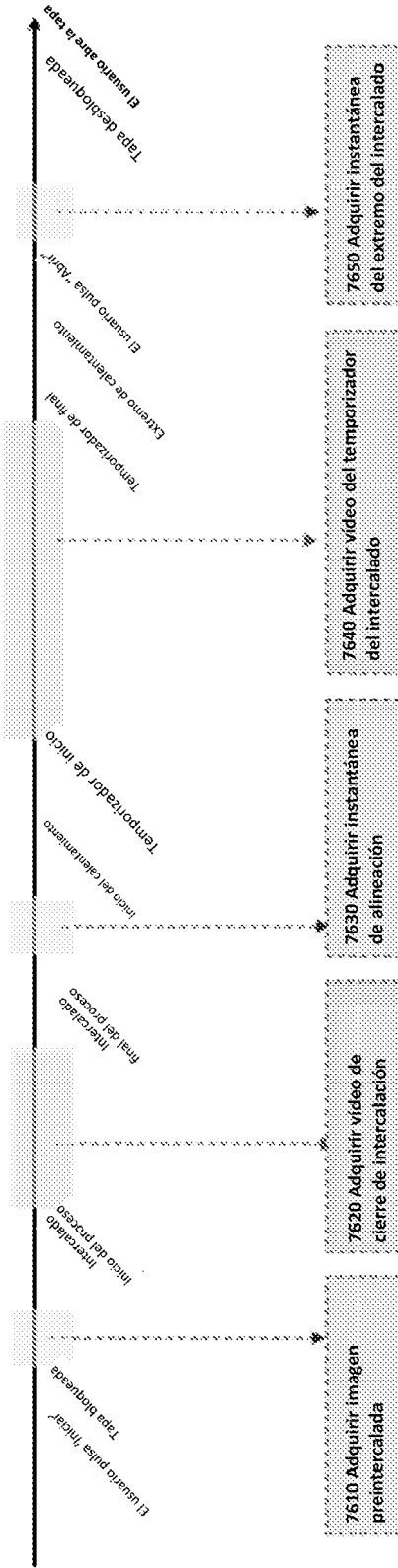


Figura 76