

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 400**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6853 (2008.01)

C12Q 1/6841 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2022 PCT/US2022/038915**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2023 WO23009842**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2022 E 22757777 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2024 EP 4326900**

54 Título: **Métodos y composiciones para sincronizar reacciones in situ**

30 Prioridad:

30.07.2021 US 202163227830 P

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

20.11.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HERNÁNDEZ NEUTA, JORGE IVÁN;
KÜHNEMUND, MALTE y
MARKS, PATRICK J.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 988 400 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para sincronizar reacciones *in situ*

5 Campo

La presente descripción se refiere generalmente a métodos y composiciones para la detección *in situ* de una pluralidad de moléculas de uno o más analitos en una muestra.

10 Antecedentes

e

La caracterización genómica, transcriptómica y proteómica de células y muestras de tejidos mediante el uso de la obtención de imágenes microscópicas puede resolver múltiples analitos de interés al mismo tiempo, proporcionando de esta manera información valiosa respecto a la abundancia y localización de los analitos *in situ*. Por tanto, estos ensayos *in situ* son herramientas importantes, por ejemplo, para comprender la base molecular de la identidad celular y desarrollar tratamientos para enfermedades. En ensayos multiplexados en los que se detectan múltiples señales simultáneamente, es importante recolectar toda la información que sea posible. Sin embargo, debido a la heterogeneidad de la abundancia del analito (por ejemplo, los niveles de expresión génica) y a las variaciones entre las reacciones en diferentes ubicaciones de una muestra, puede haber una distribución de la intensidad y tamaño amplia y heterogénea de los "puntos" de señal en la muestra. Los puntos de señal grandes pueden solaparse entre sí y/o enmascarar puntos de señal más pequeños adyacentes, lo que hace que no puedan resolverse los puntos más pequeños. Además, algunos analitos pueden asociarse con puntos de señal brillantes (por ejemplo, debido a una elevada abundancia de analitos y/o a la amplificación preferencial de la señal), mientras que otros analitos pueden asociarse con puntos de señal que son demasiado oscuros para detectarse simultáneamente (por ejemplo, en el mismo campo visual (FOV) durante la microscopía) con los puntos brillantes. Existe la necesidad de métodos nuevos y mejorados para los ensayos *in situ*. La presente descripción aborda estas y otras necesidades.

Clausson, y otros, Scientific reports 5.1 (2015): 12317, describen un método que implica la compactación de productos de la amplificación por círculo rodante para aumentar la integridad de la señal y la relación señal/ruido.

30

Resumen

En la presente descripción se proporciona un método para analizar una muestra biológica, que comprende: (a) poner en contacto la muestra biológica con una primera mezcla de reacción, en donde la muestra biológica comprende un ácido nucleico circular que comprende una región de hibridación, la primera mezcla de reacción comprende una polimerasa, en donde la muestra biológica comprende células o es una muestra de tejido, el ácido nucleico circular o la polimerasa se une previamente a un polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a la región de hibridación, y se inhibe la actividad polimerasa de la polimerasa; y (b) poner en contacto la muestra biológica con una segunda mezcla de reacción para permitir que la polimerasa extienda el polinucleótido hibridado a la región de hibridación mediante el uso del ácido nucleico circular como una plantilla, en donde puede generarse un producto de la amplificación por círculo rodante del ácido nucleico circular en la muestra biológica, por ejemplo, para el análisis *in situ* del ácido nucleico circular y/o uno o más analitos de interés asociados con el mismo.

40

En cualquiera de las modalidades anteriores, la primera mezcla de reacción puede estabilizar la polimerasa y/o inhibir una actividad de la polimerasa, tal como una actividad polimerasa y/o una actividad nucleasa. En cualquiera de las modalidades anteriores, la primera mezcla de reacción puede comprender uno o más desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP) y/o nucleósidos trifosfatos (NTP). En cualquiera de las modalidades anteriores, la primera mezcla de reacción puede comprender dATP, dTTP, dCTP, y/o dGTP. Alternativamente, en cualquiera de las modalidades anteriores, la primera mezcla de reacción puede estar sustancialmente libre de dNTP y/o NTP. En cualquiera de las modalidades anteriores, la primera mezcla de reacción puede comprender un dicatión que no es un cofactor de la polimerasa. En algunas modalidades, el dicatión es Ca^{2+} . En cualquiera de las modalidades anteriores, el dicatión puede estabilizar la polimerasa. En cualquiera de las modalidades anteriores, el dicatión puede estabilizar un complejo formado previamente que comprende la polimerasa y el polinucleótido. En cualquiera de las modalidades anteriores, la primera mezcla de reacción puede estar sustancialmente libre de un cofactor de la polimerasa. En cualquiera de las modalidades anteriores, la primera mezcla de reacción puede estar sustancialmente libre de Mg^{2+} , Co^{2+} y/o Mn^{2+} . En cualquiera de las modalidades anteriores, la primera mezcla de reacción puede comprender un agente quelante. Por ejemplo, el agente quelante puede quelar un dicatión tal como Mg^{2+} de una o más reacciones anteriores. Como tal, el agente quelante puede quelar cantidades residuales del dicatión en la muestra biológica, tal como un corte de tejido que se ha puesto en contacto con una mezcla de reacción que contiene el dicatión (por ejemplo, una mezcla de reacción de ligadura para circularizar una sonda candado para formar el ácido nucleico circular). En cualquiera de las modalidades anteriores, la primera mezcla de reacción puede comprender EDTA, EGTA, BAPTA, DTPA, o una de sus combinaciones. En cualquiera de las modalidades anteriores, la primera mezcla de reacción puede inhibir la actividad polimerasa y/o una actividad exonucleasa de la polimerasa. En cualquiera de las modalidades anteriores, puede inhibirse la actividad exonucleasa 3'→5' y/o la actividad exonucleasa 5'→3' de la polimerasa en la primera mezcla de reacción.

65

5 En cualquiera de las modalidades anteriores, el polinucleótido puede comprender un grupo protector 3' y/o un grupo protector 5'. En cualquiera de las modalidades anteriores, el polinucleótido puede comprender un hidroxilo 3' libre que está disponible para la extensión mediante una polimerasa. En cualquiera de las modalidades anteriores, el polinucleótido puede protegerse con tiofosfato en 3', de esta manera se protege al polinucleótido de la degradación exonucleasa 3'→5' por la polimerasa, al tiempo que permite el cebado por la polimerasa.

10 En cualquiera de las modalidades anteriores, el polinucleótido puede ser un cebador, y el cebador se une previamente a la polimerasa en la primera mezcla de reacción antes de entrar en contacto con la muestra biológica. En cualquiera de las modalidades anteriores, el método puede comprender eliminar uno o más complejos que comprenden la polimerasa y el cebador que no están unidos al ácido nucleico circular de la muestra biológica antes de entrar en contacto la muestra biológica con la segunda mezcla de reacción. Por tanto, en algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona un método para analizar una muestra biológica, que comprende: poner en contacto la muestra biológica con una primera mezcla de reacción, en donde la muestra biológica comprende un ácido nucleico circular que comprende una región de hibridación del cebador, la primera mezcla de reacción comprende una polimerasa, el ácido nucleico circular o la polimerasa se une previamente a un cebador que comprende una secuencia complementaria a la región de hibridación del cebador, y se inhibe la actividad polimerasa de la polimerasa; y poner en contacto la muestra biológica con una segunda mezcla de reacción para permitir que la polimerasa extienda el cebador hibridado a la región de hibridación del cebador mediante el uso del ácido nucleico circular como plantilla, en donde se genera un producto de la amplificación por círculo rodante del ácido nucleico circular en la muestra biológica.

20 En cualquiera de las modalidades anteriores, el polinucleótido puede estar unido previamente al ácido nucleico circular en la muestra biológica antes de entrar en contacto con la primera mezcla de reacción. En cualquiera de las modalidades anteriores, el polinucleótido puede ser un cebador, y el cebador se une previamente al ácido nucleico circular en la muestra biológica antes de entrar en contacto con la primera mezcla de reacción. En cualquiera de las modalidades anteriores, la región de hibridación en el ácido nucleico circular puede ser una región de hibridación del cebador que se hibrida con el cebador, y el ácido nucleico circular puede comprender además una región de hibridación a la diana que se hibrida con un ácido nucleico diana. En cualquiera de las modalidades anteriores, el ácido nucleico diana puede ser una molécula de ADN o ARN en la muestra biológica, un producto de la molécula de ADN o ARN, una sonda que se une directa o indirectamente a la molécula de ADN o ARN, o un producto de la sonda.

25 En cualquiera de las modalidades anteriores, el ácido nucleico diana puede comprender una secuencia de ADN genómico, una secuencia de ARN, y/o una secuencia de ADNc.

35 En cualquiera de las modalidades anteriores, el polinucleótido puede ser un ácido nucleico diana. En cualquiera de las modalidades anteriores, el ácido nucleico diana puede unirse previamente al ácido nucleico circular en la muestra biológica antes de entrar en contacto con la primera mezcla de reacción. En cualquiera de las modalidades anteriores, el ácido nucleico diana puede comprender una secuencia de ADN genómico, una secuencia de ARN, y/o una secuencia de ADNc. En cualquiera de las modalidades anteriores, el ácido nucleico diana puede comprender un extremo 3' libre para el cebado de la amplificación por círculo rodante. En cualquiera de las modalidades anteriores, el ácido nucleico diana puede procesarse (por ejemplo, mediante una enzima que tenga actividad exonucleasa 3'→5' tal como Phi29) para proporcionar un extremo 3' libre para el cebado de la amplificación por círculo rodante.

40 En cualquiera de las modalidades anteriores, el método puede comprender además eliminar una o más moléculas de la polimerasa que no están unidas al ácido nucleico circular de la muestra biológica, antes de entrar en contacto la muestra biológica con la segunda mezcla de reacción.

45 En cualquiera de las modalidades anteriores, la polimerasa puede no estar unida a un nanoporo, una membrana de nanoporos o un soporte aislante de esta. En cualquiera de las modalidades anteriores, la polimerasa puede difundirse en la primera mezcla de reacción y/o en la muestra biológica. En cualquiera de las modalidades anteriores, un complejo formado previamente que comprende la polimerasa y el polinucleótido puede difundirse en la primera mezcla de reacción y/o en la muestra biológica.

50 En cualquiera de las modalidades anteriores, la polimerasa puede seleccionarse del grupo que consiste en ADN polimerasa Phi29, ADN polimerasa similar a Phi29, ADN polimerasa M2, ADN polimerasa B103, ADN polimerasa GA-1, polimerasa phi-PRD1, ADN polimerasa Vent, ADN polimerasa Deep Vent, (exo)ADN polimerasa Vent, ADN polimerasa KlenTaq, ADN polimerasa I, fragmento de Klenow de ADN polimerasa I, ADN polimerasa III, ADN polimerasa T3, ADN polimerasa T4, ADN polimerasa T5, ADN polimerasa T7, polimerasa Bst, ADN polimerasa rBST, ADN polimerasa N29, ADN polimerasa TopoTaq, ARN polimerasa T7, ARN polimerasa SP6, ARN polimerasa T3, y una variante o derivado de estas.

55 En cualquiera de las modalidades anteriores, la polimerasa puede ser una ADN polimerasa Phi29 o una variante o derivado de esta.

60 En cualquiera de las modalidades anteriores, el polinucleótido puede unirse previamente a un dominio de unión a ADN monocatenario de la ADN polimerasa Phi29. En algunas modalidades, el polinucleótido es un cebador unido previamente a un dominio de unión a ADN monocatenario de la ADN polimerasa Phi29 en la primera mezcla de reacción. En cualquiera de las modalidades anteriores, el polinucleótido unido a la ADN polimerasa Phi29 puede hibridarse a la región de hibridación y puede impedirse que la ADN polimerasa Phi29 extienda el polinucleótido hasta que la muestra biológica entre en contacto con la segunda mezcla de reacción.

En cualquiera de las modalidades anteriores, el método puede comprender además, entre la entrada en contacto con la primera mezcla de reacción y con la segunda mezcla de reacción, una etapa de eliminar las moléculas de la polimerasa y/o del polinucleótido que no están unidas al ácido nucleico circular de la muestra biológica. En cualquiera de las modalidades anteriores, el método puede comprender además uno o más lavados rigurosos entre las etapas de entrada en contacto.

En cualquiera de las modalidades anteriores, la segunda mezcla de reacción puede comprender un desoxinucleósido trifosfato (dNTP) y/o un nucleósido trifosfato (NTP). En cualquiera de las modalidades anteriores, la segunda mezcla de reacción puede comprender un cofactor de la polimerasa. En cualquiera de las modalidades anteriores, la segunda mezcla de reacción puede comprender un dicación, tal como Mg^{2+} , Co^{2+} y/o Mn^{2+} . En cualquiera de las modalidades anteriores, la segunda mezcla de reacción puede estar sustancialmente libre de la polimerasa y/o de otras polimerasas. En cualquiera de las modalidades anteriores, el pH de la primera y segunda mezclas de reacción puede ser sustancialmente el mismo, por ejemplo, aproximadamente pH 8,5. En cualquiera de las modalidades anteriores, el pH de la primera y segunda mezclas de reacción puede ser independientemente aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9,0, aproximadamente 9,5, o aproximadamente 10,0. En cualquiera de las modalidades anteriores, el pH de la primera y segunda mezclas de reacción puede ser independientemente aproximadamente 8,1, aproximadamente 8,2, aproximadamente 8,3, aproximadamente 8,4, aproximadamente 8,5, aproximadamente 8,6, aproximadamente 8,7, aproximadamente 8,8, aproximadamente 8,9, o aproximadamente 9,0.

En cualquiera de las modalidades anteriores, el polinucleótido hibridado a la región de hibridación puede extenderse por la polimerasa mediante el uso del ácido nucleico circular como plantilla, generando de esta manera el producto de la amplificación por círculo rodante. En cualquiera de las modalidades anteriores, el producto de la amplificación por círculo rodante puede generarse mediante el uso de una amplificación por círculo rodante lineal (RCA), una RCA ramificada, una RCA dendrítica, o cualquiera de sus combinaciones. En cualquiera de las modalidades anteriores, el producto de la amplificación por círculo rodante puede generarse *in situ*. En cualquiera de las modalidades anteriores, el producto de la amplificación por círculo rodante puede inmovilizarse en la muestra biológica. En cualquiera de las modalidades anteriores, el producto de la amplificación por círculo rodante puede reticularse con una o más moléculas en la muestra biológica. En cualquiera de las modalidades anteriores, el método puede comprender obtener imágenes de la muestra biológica para detectar el producto de la amplificación por círculo rodante. En cualquiera de las modalidades anteriores, la obtención de imágenes puede comprender detectar una señal asociada con una sonda marcada con fluorescencia que se une directa o indirectamente al producto de la amplificación por círculo rodante.

En cualquiera de las modalidades anteriores, una señal asociada con el producto de la amplificación por círculo rodante puede amplificarse *in situ* en la muestra biológica. En cualquiera de las modalidades anteriores, la amplificación de la señal *in situ* puede comprender la amplificación por círculo rodante (RCA) de una sonda que se une directa o indirectamente al producto de la amplificación por círculo rodante, reacción en cadena de hibridación (HCR) directa o indirectamente en el producto de la amplificación por círculo rodante, reacción en cadena de hibridación de oligonucleótidos lineales (LO-HCR) directa o indirectamente en el producto de la amplificación por círculo rodante, reacción de intercambio de cebadores (PER) directa o indirectamente en el producto de la amplificación por círculo rodante, ensamble de estructuras ramificadas directa o indirectamente en el producto de la amplificación por círculo rodante, hibridación de una pluralidad de sondas detectables directa o indirectamente en el producto de la amplificación por círculo rodante, o cualquiera de sus combinaciones.

En cualquiera de las modalidades anteriores, una secuencia del producto de la amplificación por círculo rodante puede analizarse *in situ* en la muestra biológica. En cualquiera de las modalidades anteriores, la secuencia del producto de la amplificación por círculo rodante puede analizarse mediante hibridación secuencial, secuenciación mediante hibridación, secuenciación mediante ligadura, secuenciación mediante síntesis, secuenciación mediante unión, o una de sus combinaciones. En cualquiera de las modalidades anteriores, la secuencia del producto de la amplificación por círculo rodante puede comprender una secuencia de código de barras o un complemento de esta.

En cualquiera de las modalidades anteriores, la detección de un producto de la amplificación por círculo rodante puede comprender: poner en contacto la muestra biológica con una o más sondas marcadas de manera detectable que se hibridan directa o indirectamente con el producto de la amplificación por círculo rodante, y deshibridar la una o más sondas marcadas de manera detectable del producto de la amplificación por círculo rodante. En algunas modalidades, las etapas de entrar en contacto y deshibridar se repiten con la una o más sondas marcadas de manera detectable y/o una o más otras sondas marcadas de manera detectable que se hibridan directa o indirectamente con el producto de la amplificación por círculo rodante.

En cualquiera de las modalidades anteriores, detectar un producto de la amplificación por círculo rodante puede comprender: poner en contacto la muestra biológica con una o más sondas intermedias que se hibridan directa o indirectamente con el producto de la amplificación por círculo rodante, en donde la una o más sondas intermedias son detectables mediante el uso de una o más sondas marcadas de manera detectable, y deshibridar la una o más sondas intermedias y/o la una o más sondas marcadas de manera detectable del producto de la amplificación por círculo rodante. En algunas modalidades, las etapas de entrar en contacto y deshibridar se repiten con la una o más sondas

intermedias, la una o más sondas marcadas de manera detectable, una o más otras sondas intermedias, y/o una o más otras sondas marcadas de manera detectable.

5 En cualquiera de las modalidades anteriores, las sondas marcadas de manera detectable y/o las sondas intermedias pueden hibridar con secuencias de código de barras o complementos de estas en los productos de la amplificación por círculo rodante.

10 En cualquiera de las modalidades anteriores, el ácido nucleico circular puede formarse en la muestra biológica a partir de una sonda o de un conjunto de sondas para una molécula diana. En cualquiera de las modalidades anteriores, el ácido nucleico circular puede formarse en la muestra biológica a partir de una sonda candado, un conjunto de sondas SNAIL (amplificación específica de ácidos nucleicos mediante ligadura intramolecular), un conjunto de sondas PLAYR (ensayo de ligadura de proximidad para ARN), y un conjunto de sondas PLISH (hibridación *in situ* de ligadura de proximidad).

15 En cualquiera de las modalidades anteriores, la molécula diana puede ser un ácido nucleico diana. En cualquiera de las modalidades anteriores, la molécula diana puede comprender un ADN viral, ADN bacteriano, o molécula de ADN o ARN celular o un producto de estas en la muestra biológica. En cualquiera de las modalidades anteriores, la molécula diana puede comprender una sonda que se une a un ADN viral, ADN bacteriano, o molécula de ADN o ARN celular o un producto de estas en la muestra biológica. En cualquiera de las modalidades anteriores, la molécula diana puede comprender un producto de una sonda que se une a un ADN viral, ADN bacteriano, o molécula de ADN o ARN celular o un producto de estas en la muestra biológica. En cualquiera de las modalidades anteriores, la molécula diana puede comprender ADN genómico, ADN mitocondrial, ARNm o ADNc, y la sonda o conjunto de sondas para la molécula diana puede comprender una sonda candado que se hibrida con el ADN genómico, ADN mitocondrial, ARNm o ADNc. En cualquiera de las modalidades anteriores, el método puede comprender ligar la sonda candado hibridada al ADN genómico, ADN mitocondrial, ARNm o ADNc para formar el ácido nucleico circular.

25 En cualquiera de las modalidades anteriores, la molécula diana puede ser una molécula diana que no es un ácido nucleico. En cualquiera de las modalidades anteriores, la molécula diana puede ser una proteína diana. En cualquiera de las modalidades anteriores, el método puede comprender poner en contacto la muestra biológica con un agente de marcaje que comprende (i) un resto de unión que se une directa o indirectamente a la molécula diana que no es un ácido nucleico y (ii) un oligonucleótido indicador que corresponde al resto de unión y/o la molécula diana que no es un ácido nucleico. En cualquiera de las modalidades anteriores, la sonda o conjunto de sondas para la molécula diana que no es un ácido nucleico puede comprender una sonda candado que se hibrida con el oligonucleótido indicador. En cualquiera de las modalidades anteriores, el método puede comprender ligar la sonda candado hibridada al oligonucleótido indicador para formar el ácido nucleico circular.

30 En algunos aspectos, en la presente descripción se proporciona un método para analizar una muestra biológica, que comprende: (a) poner en contacto la muestra biológica con una mezcla de unión, en donde la muestra biológica comprende una pluralidad de ácidos nucleicos circulares que comprende cada uno una región de hibridación del cebador, la mezcla de unión comprende una pluralidad de complejos que comprende cada uno una polimerasa unida a un cebador, en donde la muestra biológica comprende células o es una muestra de tejido, en donde el cebador comprende una secuencia complementaria a la región de hibridación del cebador de uno o más ácidos nucleicos circulares, y se inhibe la actividad polimerasa de la polimerasa, permitiendo de esta manera que la pluralidad de complejos se hibride con la pluralidad de ácidos nucleicos circulares; (b) poner en contacto la muestra biológica con una mezcla de reacción de extensión del cebador para permitir que la polimerasa extienda el cebador hibridado a la región de hibridación del cebador, sincronizando de esta manera la amplificación por círculo rodante de la pluralidad de ácidos nucleicos circulares en la muestra biológica.

35 En cualquiera de las modalidades anteriores, la mezcla de unión puede comprender un agente quelante. En cualquiera de las modalidades anteriores, la mezcla de unión puede contener uno o más desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP). Alternativamente, en cualquiera de las modalidades anteriores, la mezcla de unión puede estar sustancialmente libre de dNTP.

40 En cualquiera de las modalidades anteriores, el cebador en uno o más de los complejos puede tener un grupo hidroxilo 3'. En cualquiera de las modalidades anteriores, el cebador en uno o más de los complejos puede tener un nucleótido protegido con tiofosfato en 3', de esta manera se protege al cebador de la degradación exonucleasa 3'→5' por la polimerasa en el complejo al tiempo que permite el cebado por la polimerasa. En cualquiera de las modalidades anteriores, las regiones de hibridación del cebador en dos o más de la pluralidad de ácidos nucleicos circulares pueden tener la misma secuencia. En cualquiera de las modalidades anteriores, las regiones de hibridación del cebador en dos o más de la pluralidad de ácidos nucleicos circulares pueden tener secuencias diferentes. En cualquiera de las modalidades anteriores, los cebadores en dos o más de la pluralidad de complejos pueden tener la misma secuencia. En cualquiera de las modalidades anteriores, los cebadores en dos o más de la pluralidad de complejos pueden tener secuencias diferentes. En cualquiera de las modalidades anteriores, la polimerasa puede ser una ADN polimerasa Phi29, una polimerasa Bst, una ARN polimerasa T7, o un fragmento de Klenow. En cualquiera de las modalidades anteriores, el método puede comprender además, entre las etapas de entrada en contacto, eliminar uno o más complejos que no están unidos al(a los) ácido(s) nucleico(s) circular(es) de la muestra biológica. En cualquiera de las

modalidades anteriores, la mezcla de reacción de extensión del cebador puede comprender desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP) y uno o más cationes. En cualquiera de las modalidades anteriores, la mezcla de reacción de extensión del cebador puede comprender Mg^{2+} , Co^{2+} , y/o Mn^{2+} . En cualquiera de las modalidades anteriores, la mezcla de reacción de extensión del cebador puede no comprender la polimerasa.

5 En algunos aspectos, en la presente descripción se proporciona un método para analizar una muestra biológica, que comprende: (a) poner en contacto la muestra biológica con una mezcla de unión, en donde la muestra biológica comprende una pluralidad de ácidos nucleicos circulares que comprende cada uno una región de hibridación hibridada con un polinucleótido, la mezcla de unión comprende una polimerasa, en donde la muestra biológica comprende
10 células o es una muestra de tejido, y se inhibe la actividad polimerasa de la polimerasa, permitiendo de esta manera que la polimerasa se una a la pluralidad de ácidos nucleicos circulares; y (b) poner en contacto la muestra biológica con una mezcla de reacción de extensión del cebador para permitir que la polimerasa extienda el polinucleótido hibridado a la región de hibridación, sincronizando de esta manera la amplificación por círculo rodante de la pluralidad de ácidos nucleicos circulares en la muestra biológica.

15 En cualquiera de las modalidades anteriores, el polinucleótido puede ser un cebador exógeno en contacto con la muestra biológica, la región de hibridación puede ser una región de hibridación del cebador, y los ácidos nucleicos circulares pueden comprender (i) moléculas endógenas en la muestra biológica, (ii) productos de moléculas endógenas en la muestra biológica, (iii) sondas dirigidas a moléculas endógenas en la muestra biológica, y/o (iv)
20 productos de las sondas exógenas dirigidas a moléculas endógenas en la muestra biológica.

En cualquiera de las modalidades anteriores, el polinucleótido comprende (i) una molécula endógena en la muestra biológica, (ii) un producto de una molécula endógena en la muestra biológica, (iii) una sonda dirigida a una molécula endógena en la muestra biológica, y/o (iv) un producto de una sonda exógena dirigida a una molécula endógena en la
25 muestra biológica.

En cualquiera de las modalidades anteriores, el método puede comprender además finalizar la amplificación por círculo rodante (RCA) de los ácidos nucleicos circulares para proporcionar una pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante.

30 En cualquiera de las modalidades anteriores, la pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante puede tener un diámetro medio de aproximadamente 0,05 μm , aproximadamente 0,1 μm , aproximadamente 0,2 μm , aproximadamente 0,3 μm , aproximadamente 0,4 μm , aproximadamente 0,5 μm , aproximadamente 0,6 μm , aproximadamente 0,7 μm , aproximadamente 0,8 μm , aproximadamente 0,9 μm , aproximadamente 1,0 μm ,
35 aproximadamente 1,1 μm , aproximadamente 1,2 μm , aproximadamente 1,3 μm , aproximadamente 1,4 μm , o aproximadamente 1,5 μm , o entre cualquiera de los valores mencionados anteriormente. En cualquiera de las modalidades anteriores, la pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante puede tener un diámetro medio menor que 0,25 μm .

40 En cualquiera de las modalidades anteriores, la pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante puede tener una longitud media de aproximadamente 1 kb, aproximadamente 2 kb, aproximadamente 5 kb, aproximadamente 10 kb, aproximadamente 20 kb, aproximadamente 30 kb, aproximadamente 40 kb, aproximadamente 50 kb, aproximadamente 60 kb, o aproximadamente 70 kb, o entre cualquiera de los valores mencionados anteriormente. En cualquiera de las modalidades anteriores, la pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante puede
45 tener una longitud media menor que 20 kb o menor que 10 kb.

En cualquiera de las modalidades anteriores, el número medio de copias de una secuencia unitaria complementaria al ácido nucleico circular en la pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante puede ser aproximadamente 10, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 500, aproximadamente 1000,
50 aproximadamente 5000, o aproximadamente 10 000 o más.

En cualquiera de las modalidades anteriores, el número medio de copias de una secuencia unitaria complementaria al ácido nucleico circular en la pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante puede ser menor que 100 o menor que 1000.

55 En cualquiera de las modalidades anteriores, el valor medio de la intensidad del pico de la pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante puede ser entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 veces mayor que un valor medio de la intensidad del pico de productos de la amplificación por círculo rodante formados sin sincronizar la amplificación por círculo rodante de la pluralidad de ácidos nucleicos circulares en la muestra biológica.

60 En cualquiera de las modalidades anteriores, la distribución de la señal observada relativa de los productos de la amplificación por círculo rodante formados con sincronización de la amplificación por círculo rodante de la pluralidad de ácidos nucleicos circulares en la muestra biológica, puede ser más estrecha que la distribución de la señal observada relativa de los productos de la amplificación por círculo rodante formados sin sincronizar la amplificación por círculo rodante de la pluralidad de ácidos nucleicos circulares en la muestra biológica.

65

En cualquiera de las modalidades anteriores, la extensión por la polimerasa puede realizarse durante no más de 3 horas. En cualquiera de las modalidades anteriores, la extensión por la polimerasa puede realizarse durante no más de 2 horas. En cualquiera de las modalidades anteriores, la extensión por la polimerasa puede realizarse durante no más de 1 hora. En cualquiera de las modalidades anteriores, la extensión por la polimerasa puede realizarse durante no más de 30 minutos.

En algunas modalidades, en la presente descripción se describe un kit para analizar una muestra biológica, que comprende: (i) una mezcla de unión que comprende una pluralidad de complejos que comprende cada uno una polimerasa unida a un cebador, y un agente quelante, en donde la mezcla de unión está sustancialmente libre de desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP); y (ii) una mezcla de reacción de extensión del cebador que comprende dNTP y un dicatión, en donde la mezcla de reacción de extensión del cebador está sustancialmente libre de la polimerasa. En cualquiera de las modalidades anteriores, los cebadores en la pluralidad de complejos pueden ser el mismo. Alternativamente, en cualquiera de las modalidades anteriores, los cebadores en dos o más de la pluralidad de complejos pueden ser diferentes. En cualquiera de las modalidades anteriores, la polimerasa puede ser ADN polimerasa Phi29 y el dicatión puede ser Mg^{2+} , Co^{2+} , y/o Mn^{2+} .

En cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra biológica puede comprender células o componentes celulares. En cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra biológica puede ser una muestra de tejido. En cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra biológica puede fijarse. Alternativamente, en cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra biológica puede no fijarse. En cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra biológica puede ser una muestra fijada en formalina e incluida en parafina (FFPE), una muestra de tejido congelado, o una muestra de tejido fresco. En cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra biológica puede permeabilizarse. En cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra biológica puede procesarse. En cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra biológica puede clarificarse. En cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra biológica puede incluirse en una matriz. En cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra biológica puede incluirse en un hidrogel. En cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra biológica puede incluirse en un hidrogel y después clarificarse. En cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra biológica y/o la matriz pueden reticularse. En cualquiera de las modalidades anteriores, la muestra biológica puede inmovilizarse sobre un sustrato, tal como un portaobjetos de vidrio o plástico.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos ilustran ciertas modalidades de los elementos y las ventajas de esta descripción. Estas modalidades no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones anexas de ninguna manera.

Las Figuras 1A-1C muestran esquemas de métodos ilustrativos para sincronizar la RCA *in situ*. Una sonda circular o circularizada hibridada con un ácido nucleico diana en una muestra puede comprender un sitio de hibridación del cebador. Puede formarse un complejo de una polimerasa (por ejemplo, Phi29) y un cebador en un tampón de apagado que inhibe la actividad polimerasa de la polimerasa. El complejo cebador-polimerasa formado previamente puede difundirse en la muestra e hibridarse con el sitio de hibridación del cebador. La hibridación de los complejos formados previamente a moléculas de ácido nucleico diana en diferentes ubicaciones en la muestra puede sincronizarse, en tanto que la RCA no comienza hasta que se eliminan los complejos no unidos y se aplica un tampón de encendido para iniciar la RCA en las diferentes ubicaciones (Figura 1A). Alternativamente, los cebadores pueden hibridarse con sondas circulares o circularizadas en diferentes ubicaciones en la muestra, que después se pone en contacto con una polimerasa (por ejemplo, Phi29) en un tampón de apagado que inhibe la actividad polimerasa. La polimerasa puede difundirse en la muestra y unirse a los cebadores hibridados en las sondas circulares o circularizadas. La RCA no comienza hasta que se eliminan las polimerasas no unidas y se aplica un tampón de encendido para iniciar la RCA en las diferentes ubicaciones (Figura 1B). En otro ejemplo, una sonda circular o circularizada se hibrida con un polinucleótido en una muestra, que después se pone en contacto con una polimerasa (por ejemplo, Phi29) en un tampón de apagado que inhibe la actividad polimerasa. La RCA no comienza hasta que se eliminan las polimerasas no unidas y se aplica un tampón de encendido para iniciar la RCA en las diferentes ubicaciones mediante el uso del polinucleótido como el cebador para RCA (Figura 1C). En este ejemplo, el polinucleótido puede ser cualquier ácido nucleico endógeno o exógeno (o producto de este) en la muestra, por ejemplo, ARNm o ADNc, y no es necesario un cebador para RCA separado.

Las Figuras 2A-2B muestran los resultados en intensidad del elemento (Figura 2A) y tamaño estimado del elemento (Figura 2B) en métodos ilustrativos para detectar Gad2 mediante el uso de un complejo Phi29-cebador en un tampón de apagado ("Complejo") para sincronizar la RCA, en comparación con los métodos que usan Phi29 sola en el tampón de apagado ("Phi29+"), cebador solo en el tampón de apagado ("Cebador+"), y un protocolo de control no sincronizado ("Control").

Las Figuras 3A-3B muestran los resultados en intensidad del elemento (Figura 3A) y distribución estimada del tamaño del elemento (Figura 3B) en métodos ilustrativos para detectar Slc17a7 mediante el uso de un complejo Phi29-cebador en un tampón de apagado ("Complejo") para sincronizar la RCA, en comparación con los métodos que usan Phi29 sola en el tampón de apagado ("Phi29+"), cebador solo en el tampón de apagado ("Cebador+"), y un protocolo de control no sincronizado.

Las Figuras 4A-4B muestran los resultados en métodos ilustrativos para detectar Slc17a7. La Figura 4A muestra tendencias de aumento de la intensidad en condiciones sincronizadas ("sinc") con relación al grupo de control ("ctrl") durante la RCA de 60 minutos y la RCA de 120 minutos. La Figura 4B muestra imágenes representativas de los elementos detectados después de 120 minutos de amplificación, mostrando una tendencia hacia una mayor uniformidad en la intensidad del elemento en los grupos sincronizados en comparación con el grupo de control. La Figura 4C muestra imágenes representativas después de la detección y filtrado del elemento en los grupos de control y sincronizados con 30 minutos de RCA, mostrando una tendencia a la mejora de la detección de los productos de RCA en las ubicaciones donde se espera la expresión de Slc17a7 en el tejido cerebral.

Descripción detallada

La información técnica que se expone más abajo puede, en algunos aspectos, ir más allá de la descripción de la invención, que se define por las reivindicaciones anexas. La información técnica adicional se proporciona para colocar la invención en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Dicha información técnica adicional que no cae dentro del alcance de las reivindicaciones anexas no es parte de la invención. En consecuencia, cualquiera de los aspectos, modalidades y ejemplos de la presente descripción que no caen dentro del alcance de las reivindicaciones anexas no forman parte de la invención y se proporcionan solamente con fines ilustrativos. Si una definición expuesta en la presente descripción es contraria o inconsistente de cualquier otra manera con una definición expuesta en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones a las que se hace referencia en la presente descripción, la definición expuesta en la presente descripción prevalece sobre la definición que está en la referencia.

Los encabezados de sección usados en la presente descripción son solamente para propósitos organizativos y no deben interpretarse como limitantes del objeto descrito.

I. Descripción general

En ensayos que implican la amplificación por círculo rodante (RCA) *in situ*, el tamaño y la distribución de la intensidad heterogéneos de los productos de la amplificación por círculo rodante pueden conducir a la pérdida de sensibilidad, debido a que las señales débiles asociadas con ciertos productos de la amplificación por círculo rodante pueden no pasar el umbral de detección para la detección de puntos para el análisis de imágenes, mientras que las señales fuertes asociadas con ciertos productos de la amplificación por círculo rodante en estrecha proximidad pueden conducir al apañamiento óptico, así como también a la incapacidad de detectar puntos de señal más débiles cercanos. Tanto los productos de la amplificación por círculo rodante débiles no detectados como los productos de la amplificación por círculo rodante grandes apañados pueden conducir a la pérdida de sensibilidad. En algunos aspectos, el tamaño y la distribución de la intensidad heterogéneos pueden deberse a reacciones de RCA que comienzan en diferentes momentos *in situ* de una manera no sincronizada. En algunos aspectos, la heterogeneidad puede ser el resultado del tiempo y la velocidad de difusión de uno o más reactivos (por ejemplo, enzima, cebador, etc.) a través de una muestra (por ejemplo, una sección de tejido) a diferentes ubicaciones en la muestra. En algunos casos, cuando una polimerasa tal como phi29 se añade en un tampón de reacción de RCA y se aplica a una muestra, la enzima se difunde de la solución a granel a través de la muestra (por ejemplo, una sección de tejido) a un cebador y una plantilla circular en la muestra para iniciar una reacción de RCA. Como tal, las plantillas circulares que reciben una molécula de polimerasa funcional en un momento posterior pueden comenzar con la RCA en un momento posterior que otras plantillas circulares que han recibido una molécula de polimerasa antes. Cuando la RCA se detiene en el mismo punto temporal, las plantillas circulares que han iniciado antes han dado como resultado puntos de señal más grandes y más brillantes asociados con los productos de la amplificación por círculo rodante, mientras que las plantillas circulares que han iniciado en puntos temporales posteriores han generado puntos de señal más pequeños y más débiles.

En algunos aspectos, en la presente descripción se proporcionan composiciones y métodos para generar productos de la amplificación por círculo rodante mediante la sincronización del punto de inicio de la RCA para lograr una mayor homogeneidad en el tamaño de los productos de RCA. En algunos aspectos, en la presente descripción se proporcionan composiciones y métodos para generar productos de RCA *in situ* que son más homogéneos en tamaño e intensidad para hacer que la detección de los puntos sea más robusta para el análisis de imágenes. En algunos casos, las ventajas de sincronizar la RCA pueden aplicarse a una muestra biológica con genes altamente expresados a detectar. En algunas modalidades, se usa una polimerasa tal como Phi29 para unir ácido nucleico monocatenario (por ejemplo, ADNmc) en un polinucleótido (por ejemplo, una sonda o un ácido nucleico diana tal como ARNm o ADNc) con su dominio de unión a ácido nucleico monocatenario, al tiempo que sus funciones de exonucleasa y polimerasa se deshabilitan en un tampón de apagado, por ejemplo, un tampón de unión que está libre sustancialmente de uno o más cofactores (por ejemplo, Mg²⁺) y/o dNTP. En algunas modalidades, los complejos de cebadores para RCA y polimerasas (por ejemplo, Phi29) se forman previamente en un tampón de apagado. En algunas modalidades, los complejos se añaden después a una muestra tal como una sección de tejido con plantillas circulares formadas previamente (por ejemplo, producidas a través de la ligadura de una sonda candado en un ácido nucleico diana).

En algunas modalidades, después de la hibridación del complejo con los sitios del cebador para RCA en el círculo (por ejemplo, ácido nucleico circular), la mezcla se elimina y se reemplaza con un tampón de encendido, que activa la

polimerasa e inicia la RCA en la mezcla de reacción de RCA simultáneamente para todos los círculos que han recibido un complejo polimerasa-cebador (Figura 1A). En algunos aspectos, los cebadores se hibridan previamente a plantillas circulares en una muestra. En algunas modalidades, se proporciona una polimerasa tal como Phi29 en un tampón de apagado que inhibe una o más actividades de la polimerasa, y después se pone en contacto con la muestra. La polimerasa se une a los cebadores hibridados previamente a plantillas circulares, pero la RCA no se inicia hasta que la muestra se pone en contacto con un tampón de encendido (por ejemplo, un tampón de reacción de RCA) que suprime la inhibición de las actividades polimerasa y/o exonucleasa de la polimerasa, sincronizando de esta manera la RCA de las plantillas circulares en múltiples ubicaciones en la muestra (Figura 1B). En algunas modalidades, las polimerasas pueden cargarse en una muestra con moléculas de ácido nucleico circular, donde no se proporciona un cebador para RCA separado. Por ejemplo, en una modalidad, una polimerasa en un tampón de apagado se aplica a una muestra y se une al extremo 3' de un polinucleótido (por ejemplo, ARN o ADN, tal como ARNm o ADNc) en la muestra. En algunas modalidades, las polimerasas cargadas en los polinucleótidos en la muestra pueden activarse con un tampón de encendido para usar los polinucleótidos como cebadores para cebar reacciones de RCA sincronizadas (Figura 1C).

En algunas modalidades, la sincronización conduce a productos de RCA de tamaño más homogéneo y/o puntos de señal más brillantes para los productos de RCA. En algunas modalidades, la sincronización conduce a menos puntos de señal oscuros y/o más puntos de señal brillantes para los productos de RCA. En algunas modalidades, cuando el tamaño del producto de RCA se vuelve más homogéneo, el tiempo de amplificación puede disminuirse, lo que hace a los productos de RCA más pequeños, pero brillantes de manera similar. En general, la sincronización puede facilitar la detección y/o resolución de más productos de RCA en un espacio apiñado.

II. Muestras, analitos, y secuencias diana

A. Muestras

Una muestra descrita en la presente descripción puede ser una muestra biológica o derivarse de cualquier muestra biológica. Los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden usarse para analizar una muestra biológica, que puede obtenerse de un sujeto mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas, lo que incluye, pero no se limita a, biopsia, cirugía y microscopía de captura por láser (LCM), e incluye generalmente células y/u otro material biológico del sujeto. Además de los sujetos descritos anteriormente, puede obtenerse una muestra biológica de un procarionta tal como una bacteria, una arquea, un virus, o un viroide. Una muestra biológica también puede obtenerse a partir de organismos no mamíferos (por ejemplo, una planta, un insecto, un arácnido, un nemátodo, un hongo, o un anfibio). También puede obtenerse una muestra biológica a partir de un eucariota, tal como una muestra de tejido, un organoide derivado del paciente (PDO) o un xenoinjerto derivado del paciente (PDX). Una muestra biológica de un organismo puede comprender uno o más otros organismos o componentes de estos. Por ejemplo, una sección de tejido de mamíferos puede comprender un príon, un viroide, un virus, una bacteria, un hongo, o componentes de otros organismos, además de células de mamíferos y componentes que no son tejido celular. Los sujetos a partir de los cuales pueden obtenerse muestras biológicas pueden ser individuos sanos o asintomáticos, individuos que tienen o se sospecha que tienen una enfermedad (por ejemplo, un paciente con una enfermedad tal como cáncer) o una predisposición a una enfermedad, y/o individuos que necesitan terapia o se sospecha que necesitan terapia.

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

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

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

Las muestras biológicas pueden incluir una o más células enfermas. Una célula enferma puede tener propiedades metabólicas, expresión génica, expresión proteica, y/o características morfológicas alteradas. Los ejemplos de enfermedades incluyen trastornos inflamatorios, trastornos metabólicos, trastornos del sistema nervioso, y cáncer. Las

células cancerosas pueden derivarse de tumores sólidos, neoplasias hematológicas, líneas celulares, u obtenerse como células tumorales circulantes. Las muestras biológicas pueden incluir también células fetales y células inmunitarias.

5 Las muestras biológicas pueden incluir analitos (por ejemplo, proteína, ARN, y/o ADN) incluidos en una matriz 3D. En algunas modalidades, los amplicones (por ejemplo, productos de la amplificación por círculo rodante) derivados de o asociados con analitos (por ejemplo, proteína, ARN, y/o ADN) pueden incluirse en una matriz 3D. En algunas modalidades, una matriz 3D puede comprender una red de moléculas naturales y/o moléculas sintéticas que están unidas química y/o enzimáticamente, por ejemplo, mediante reticulación. En algunas modalidades, una matriz 3D puede comprender un polímero sintético. En algunas modalidades, una matriz 3D comprende un hidrogel.

15 En algunas modalidades, un sustrato en la presente descripción puede ser cualquier soporte que es insoluble en un líquido acuoso y que permite la colocación de muestras biológicas, analitos, elementos, y/o reactivos (por ejemplo, sondas) en el soporte. En algunas modalidades, una muestra biológica puede unirse a un sustrato. La unión de la muestra biológica puede ser irreversible o reversible, en dependencia de la naturaleza de la muestra y de las etapas subsecuentes en el método analítico. En ciertas modalidades, la muestra puede unirse al sustrato de manera reversible mediante la aplicación de un recubrimiento de polímero adecuado al sustrato, y poniendo en contacto la muestra con el recubrimiento de polímero. A continuación, la muestra puede desprenderse del sustrato, por ejemplo, mediante el uso de un solvente orgánico que disuelve al menos parcialmente el recubrimiento de polímero. Los hidrogeles son ejemplos de polímeros que son adecuados para este propósito.

25 En algunas modalidades, el sustrato puede recubrirse o funcionalizarse con una o más sustancias para facilitar la unión de la muestra al sustrato. Las sustancias adecuadas que pueden usarse para recubrir o funcionalizar el sustrato incluyen, pero no se limitan a, lectinas, polilisina, anticuerpos y polisacáridos.

30 Puede realizarse una variedad de etapas para preparar o procesar una muestra biológica para y/o durante un ensayo. Excepto cuando se indique de cualquier otra manera, las etapas de preparación o procesamiento descritas más abajo pueden combinarse generalmente de cualquier manera y en cualquier orden para preparar o procesar apropiadamente una muestra en particular para su análisis.

(i) Corte en secciones de tejidos

35 Una muestra biológica puede recolectarse de un sujeto (por ejemplo, mediante biopsia quirúrgica, corte en secciones de sujeto completo) o cultivarse in vitro sobre un sustrato de crecimiento o placa de cultivo como una población de células, y prepararse para su análisis como un corte de tejido o sección de tejido. Las muestras cultivadas pueden ser suficientemente finas para el análisis sin etapas de procesamiento adicionales. Alternativamente, las muestras cultivadas, y las muestras obtenidas mediante biopsia o cortes en secciones, pueden prepararse como secciones de tejido finas mediante el uso de un aparato de corte mecánico tal como un micrótopo de cuchillas vibratorias. Como otra alternativa, en algunas modalidades, puede prepararse una sección de tejido fina mediante la aplicación de una impresión táctil de una muestra biológica a un material de sustrato adecuado.

45 El grosor de la sección de tejido puede ser una fracción de (por ejemplo, menos de 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, o 0,1) la dimensión de la sección transversal máxima de una célula. Sin embargo, también pueden usarse secciones de tejido que tengan un grosor que es mayor que la dimensión de la sección transversal máxima de la célula. Por ejemplo, pueden usarse secciones de criostato, que pueden tener, por ejemplo, 10-20 μm de grosor.

50 Más generalmente, el grosor de una sección de tejido depende típicamente del método usado para preparar la sección y de las características físicas del tejido, y por lo tanto pueden prepararse y usarse secciones que tengan una amplia variedad de grosores diferentes. Por ejemplo, el grosor de la sección de tejido puede ser al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40, o 50 μm . También pueden usarse secciones más gruesas si se desea o es conveniente, por ejemplo, al menos 70, 80, 90, o 100 μm o más. Típicamente, el grosor de una sección de tejido está entre 1-100 μm , 1-50 μm , 1-30 μm , 1-25 μm , 1-20 μm , 1-15 μm , 1-10 μm , 2-8 μm , 3-7 μm , o 4-6 μm , pero como se mencionó anteriormente, también pueden analizarse secciones con grosores mayores o menores que estos intervalos.

55 También pueden obtenerse varias secciones a partir de una única muestra biológica. Por ejemplo, pueden obtenerse varias secciones de tejido a partir de una muestra de biopsia quirúrgica mediante la realización de cortes en secciones seriados de la muestra de biopsia mediante el uso de una cuchilla para corte en secciones. La información espacial entre las secciones seriadas puede conservarse de esta manera, y las secciones pueden analizarse sucesivamente para obtener información tridimensional sobre la muestra biológica.

(ii) Congelación

65 En algunas modalidades, la muestra biológica (por ejemplo, una sección de tejido como se describió anteriormente) puede prepararse mediante ultracongelación a una temperatura adecuada para mantener o preservar la integridad (por ejemplo, las características físicas) de la estructura del tejido. La muestra de tejido congelada puede cortarse en

secciones, por ejemplo, cortarse finamente, sobre una superficie de sustrato mediante el uso de cualquier cantidad de métodos adecuados. Por ejemplo, una muestra de tejido puede prepararse mediante el uso de un micrótopo de congelación (por ejemplo, un criostato) configurado a una temperatura adecuada para mantener tanto la integridad estructural de la muestra de tejido como las propiedades químicas de los ácidos nucleicos en la muestra. Dicha temperatura puede ser, por ejemplo, menor que -15 °C, menor que -20 °C, o menor que -25 °C.

(iii) Fijación y posfijación

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

Como una alternativa a la fijación con formalina descrita anteriormente, una muestra biológica puede fijarse en cualquiera de una variedad de otros fijadores para preservar la estructura biológica de la muestra antes del análisis. Por ejemplo, una muestra puede fijarse mediante inmersión en etanol, metanol, acetona, paraformaldehído (PFA)-triton, y sus combinaciones.

En algunas modalidades, la fijación en acetona se usa con muestras congeladas frescas, que pueden incluir, pero no se limitan a, muestras de tejido de corteza, bulbo olfatorio de ratón, tumor cerebral humano, cerebro humano post mortem, y cáncer de mama. Cuando se realiza la fijación en acetona, pueden no realizarse las etapas de pre-permeabilización (descritas más abajo). Alternativamente, la fijación en acetona puede realizarse junto con las etapas de permeabilización.

En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción comprenden una o más etapas después de la fijación (también denominadas posfijación). En algunas modalidades, se realizan una o más etapas de posfijación después de poner en contacto una muestra con un polinucleótido descrito en la presente descripción, por ejemplo, una o más sondas tales como una sonda circular o candado. En algunas modalidades, se realizan una o más etapas de posfijación después de que se forma un complejo de hibridación que comprende una sonda y una diana en una muestra. En algunas modalidades, se realizan una o más etapas de posfijación antes de una reacción de ligadura descrita en la presente descripción, tal como la ligadura para circularizar una sonda candado.

En algunas modalidades, se realizan una o más etapas de posfijación después de poner en contacto una muestra con un agente de unión o marcaje (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este) para un analito que no es un ácido nucleico tal como un analito de proteína. El agente de marcaje puede comprender una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótido indicador) que comprende una secuencia que corresponde al agente de marcaje y por lo tanto corresponde al analito (por ejemplo, identifica de manera única). En algunas modalidades, el agente de marcaje puede comprender un oligonucleótido indicador que comprende una o más secuencias de código de barras.

Puede realizarse una etapa de posfijación mediante el uso de cualquier reactivo de fijación adecuado descrito en la presente descripción, por ejemplo, paraformaldehído al 3 % (p/v) en DEPC-PBS.

(iv) Inclusión

Como una alternativa a la inclusión en parafina descrita anteriormente, una muestra biológica puede incluirse en cualquiera de una variedad de otros materiales de inclusión para proporcionar un sustrato estructural a la muestra antes del corte en secciones y de otras etapas de manipulación. En algunos casos, el material de inclusión puede retirarse, por ejemplo, antes del análisis de las secciones de tejido obtenidas a partir de la muestra. Los materiales de inclusión adecuados incluyen, pero no se limitan a, ceras, resinas (por ejemplo, resinas de metacrilato), epoxis, y agar. En algunas modalidades, la muestra biológica puede incluirse en una matriz (por ejemplo, una matriz de hidrogel). La inclusión de la muestra de esta manera implica típicamente poner en contacto la muestra biológica con un hidrogel de manera que la muestra biológica queda rodeada por el hidrogel. Por ejemplo, la muestra puede incluirse al poner en contacto la muestra con un material polimérico adecuado, y activar el material polimérico para formar un hidrogel. En algunas modalidades, el hidrogel se forma de manera que el hidrogel se internaliza dentro de la muestra biológica.

En algunas modalidades, la muestra biológica se inmoviliza en el hidrogel mediante la reticulación del material polimérico que forma el hidrogel. La reticulación puede realizarse química y/o fotoquímicamente, o alternativamente, puede utilizarse cualquier otro método de formación de hidrogel.

La composición y aplicación de la matriz de hidrogel a una muestra biológica depende típicamente de la naturaleza y la preparación de la muestra biológica (por ejemplo, seccionada, no seccionada, tipo de fijación). Como un ejemplo,

cuando la muestra biológica es una sección de tejido, la matriz de hidrogel puede incluir una solución de monómero y una solución de iniciador de persulfato de amonio (APS)/acelerador de tetrametiletilendiamina (TEMED). Como otro ejemplo, cuando la muestra biológica consiste en células (por ejemplo, células cultivadas o células disociadas a partir de una muestra de tejido), las células pueden incubarse con la solución de monómero y las soluciones APS/TEMED.

5 Para las células, los geles de matriz de hidrogel se forman en compartimientos, lo que incluye, pero no se limita a, dispositivos usados para cultivar, mantener, o transportar las células. Por ejemplo, las matrices de hidrogel pueden formarse con solución de monómero más APS/TEMED añadida al compartimiento a una profundidad que varía de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 2 mm.

10 Métodos y aspectos adicionales de la inclusión en hidrogel de muestras biológicas se describen, por ejemplo, en Chen y otros, *Science* 347(6221):543–548, 2015.

(v) Tinción e inmunohistoquímica (IHC)

15 Para facilitar la visualización, las muestras biológicas pueden teñirse mediante el uso de una amplia variedad de colorantes y técnicas de tinción. En algunas modalidades, por ejemplo, una muestra puede teñirse mediante el uso de cualquier cantidad de colorantes y/o reactivos inmunohistoquímicos. Pueden realizarse una o más etapas de tinción para preparar o procesar una muestra biológica para un ensayo descrito en la presente descripción o pueden realizarse durante y/o después de un ensayo. En algunas modalidades, la muestra puede ponerse en contacto con una o más tinciones de ácidos nucleicos, tinciones de membrana (por ejemplo, membrana celular o nuclear), tinciones citológicas, o sus combinaciones. En algunos ejemplos, la tinción puede ser específica para proteínas, fosfolípidos, ADN (por ejemplo, ADNbc, ADNmc), ARN, un orgánulo o compartimiento de la célula. La muestra puede ponerse en contacto con uno o más anticuerpos marcados (por ejemplo, un anticuerpo primario específico para el analito de interés y un anticuerpo secundario marcado específico para el anticuerpo primario). En algunas modalidades, las células en la muestra pueden segmentarse mediante el uso de una o más imágenes tomadas de la muestra teñida.

20 En algunas modalidades, la tinción se realiza mediante el uso de un colorante lipofílico. En algunos ejemplos, la tinción se realiza con un colorante lipofílico de carbocianina o aminoestirilo, o análogos de estos (por ejemplo, DiI, DiO, DiR, DiD). Otras tinciones de la membrana celular pueden incluir colorantes FM y RH o reactivos inmunohistoquímicos específicos para proteínas de la membrana celular. En algunos ejemplos, la tinción puede incluir, pero no se limita a, naranja de acridina, marrón de Bismarck, carmín, azul de coomassie, violeta de cresilo, DAPI, eosina, bromuro de etidio, fucsina ácida, hematoxilina, tinciones de Hoechst, yodo, verde de metilo, azul de metileno, rojo neutro, azul de Nilo, rojo de Nilo, tetróxido de osmio, rojo de rutenio, yoduro de propidio, rodamina (por ejemplo, rodamina B), o safranina o derivados de estos. En algunas modalidades, la muestra puede teñirse con hematoxilina y eosina (H-E).

30 La muestra puede teñirse mediante el uso de técnicas de tinción con hematoxilina y eosina (H-E), mediante el uso de técnicas de tinción de Papanicolaou, técnicas de tinción tricrómica de Masson, técnicas de tinción con plata, técnicas de tinción con Sudán, y/o mediante el uso de técnicas de tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS). La tinción con PAS se realiza típicamente después de la fijación en formalina o acetona. En algunas modalidades, la muestra puede teñirse mediante el uso de la tinción de Romanowsky, lo que incluye la tinción de Wright, la tinción de Jenner, la tinción de May-Grunwald, la tinción de Leishman, y la tinción de Giemsa.

35 En algunas modalidades, las muestras biológicas pueden destefñirse. Puede utilizarse cualquier método adecuado para destefñir o decolorar una muestra biológica, y depende generalmente de la naturaleza de la(s) tinción(ones) aplicada(s) a la muestra. Por ejemplo, en algunas modalidades, se aplican una o más tinciones inmunofluorescentes a la muestra mediante el acoplamiento de anticuerpos. Dichas tinciones pueden eliminarse mediante el uso de técnicas tales como la escisión de enlaces disulfuro mediante el tratamiento con un agente reductor y el lavado con detergente, tratamiento con sal caotrópica, tratamiento con solución de recuperación de antígenos, y tratamiento con un tampón ácido de glicina. Los métodos para teñir y destefñir multiplexados se describen, por ejemplo, en Bolognesi y otros, *J. Histochem. Cytochem.* 2017; 65(8): 431-444, Lin y otros, *Nat Commun.* 2015; 6:8390, Pirici y otros, *J. Histochem. Cytochem.* 2009; 57:567–75, y Glass y otros, *J. Histochem. Cytochem.* 2009; 57:899–905.

(vi) Expansión isométrica

55 En algunas modalidades, una muestra biológica incluida en una matriz (por ejemplo, un hidrogel) puede expandirse isométricamente. Los métodos de expansión isométrica que pueden usarse incluyen la hidratación, una etapa preparativa en la microscopía de expansión, como se describió en Chen y otros, *Science* 347(6221):543–548, 2015. La expansión isométrica puede realizarse mediante el anclaje de uno o más componentes de una muestra biológica a un gel, seguido de la formación de gel, proteólisis, e hinchazón. En algunas modalidades, los analitos en la muestra, los productos de los analitos, y/o las sondas asociadas con los analitos en la muestra pueden anclarse a la matriz (por ejemplo, hidrogel). La expansión isométrica de la muestra biológica puede producirse antes de la inmovilización de la muestra biológica sobre un sustrato, o después de que la muestra biológica se inmovilice en un sustrato. En algunas modalidades, la muestra biológica expandida isométricamente puede retirarse del sustrato antes de entrar en contacto el sustrato con las sondas descritas en la presente descripción.

65

En general, las etapas usadas para realizar la expansión isométrica de la muestra biológica pueden depender de las características de la muestra (por ejemplo, grosor de la sección de tejido, la fijación, la reticulación), y/o del analito de interés (por ejemplo, condiciones diferentes para anclar el ARN, ADN y proteína a un gel).

5 En algunas modalidades, las proteínas en la muestra biológica se anclan a un gel hinchable tal como un gel polielectrolitos. Un anticuerpo puede dirigirse a la proteína antes, después, o junto con el anclaje al gel hinchable. El ADN y/o ARN en una muestra biológica también pueden anclarse al gel hinchable mediante un enlazador adecuado. Ejemplos de dichos enlazadores incluyen, pero no se limitan a, ácido 6-((acrililo)amino)hexanoico (Acryloil-X SE) (disponible de ThermoFisher, Waltham, MA), Label-IT Amine (disponible de MirusBio, Madison, WI) y Label X (descrito, por ejemplo, en Chen y otros, Nat. Methods 13:679-684, 2016).

La expansión isométrica de la muestra puede aumentar la resolución espacial del análisis subsecuente de la muestra. El aumento de la resolución en la caracterización espacial puede determinarse mediante la comparación de una muestra expandida isométricamente con una muestra que no se ha expandido isométricamente.

15 En algunas modalidades, una muestra biológica se expande isométricamente hasta un tamaño al menos 2x, 2,1x, 2,2x, 2,3x, 2,4x, 2,5x, 2,6x, 2,7x, 2,8x, 2,9x, 3x, 3,1x, 3,2x, 3,3x, 3,4x, 3,5x, 3,6x, 3,7x, 3,8x, 3,9x, 4x, 4,1x, 4,2x, 4,3x, 4,4x, 4,5x, 4,6x, 4,7x, 4,8x, o 4,9x de su tamaño no expandido. En algunas modalidades, la muestra se expande isométricamente hasta al menos 2x y menos de 20x de su tamaño no expandido.

20 (vii) Reticulación y desreticulación

25 En algunas modalidades, la muestra biológica se reticula de manera reversible antes o durante una ronda de ensayo *in situ*. En algunos aspectos, los analitos, polinucleótidos y/o el producto de la amplificación (por ejemplo, amplicón) de un analito o una sonda unida a este pueden anclarse a una matriz polimérica. Por ejemplo, la matriz polimérica puede ser un hidrogel. En algunas modalidades, una o más de la sonda(s) de polinucleótidos y/o el producto de la amplificación (por ejemplo, amplicón) de estas pueden modificarse para contener grupos funcionales que pueden usarse como un sitio de anclaje para unir las sondas de polinucleótidos y/o el producto de la amplificación a una matriz polimérica. En algunas modalidades, puede usarse una sonda modificada que comprende oligo dT para unirse a las moléculas de ARNm de interés, seguido de la reticulación reversible de las moléculas de ARNm.

35 En algunas modalidades, la muestra biológica se inmoviliza en un hidrogel mediante la reticulación del material polimérico que forma el hidrogel. La reticulación puede realizarse química y/o fotoquímicamente, o alternativamente, puede utilizarse cualquier otro método de formación de hidrogel. Un hidrogel puede incluir un gel polimérico macromolecular que incluye una red. Dentro de la red, algunas cadenas de polímeros pueden reticularse opcionalmente, aunque no siempre se produce la reticulación.

40 En algunas modalidades, un hidrogel puede incluir subunidades de hidrogel, tales como, pero no limitadas a, acrilamida, bis-acrilamida, poli(acrilamida) y derivados de estas, poli(etilenglicol) y derivados de este (por ejemplo, PEG-acrilato (PEG-DA), PEG-RGD), gelatina-metacrilato (GelMA), ácido hialurónico metacrilado (MeHA), poliuretanos polialifáticos, poliuretanos de poliéter, poliuretanos de poliéster, copolímeros de polietileno, poliamidas, alcoholes polivinílicos, polipropilenglicol, óxido de politetrametileno, polivinilpirrolidona, poli(acrilamida), poli(acrilato de hidroxietilo) y poli(metacrilato de hidroxietilo), colágeno, ácido hialurónico, quitosano, dextrano, agarosa, gelatina, alginato, polímeros proteicos, metilcelulosa, y similares, y sus combinaciones.

45 En algunas modalidades, un hidrogel incluye un material híbrido, por ejemplo, el material de hidrogel incluye elementos de polímeros tanto sintéticos como naturales. Los ejemplos de hidrogeles adecuados se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos núms. 6,391,937, 9,512,422, y 9,889,422, y en las publicaciones de solicitud de patentes de Estados Unidos núms. 2017/0253918, 2018/0052081 y 2010/0055733.

50 En algunas modalidades, el hidrogel puede formar el sustrato. En algunas modalidades, el sustrato incluye un hidrogel y uno o más segundos materiales. En algunas modalidades, el hidrogel se coloca sobre uno o más segundos materiales. Por ejemplo, el hidrogel puede formarse previamente y después colocarse sobre, debajo, o en cualquier otra configuración con uno o más segundos materiales. En algunas modalidades, la formación del hidrogel se produce después de entrar en contacto con uno o más segundos materiales durante la formación del sustrato. La formación del hidrogel también puede producirse dentro de una estructura (por ejemplo, pocillos, crestas, proyecciones, y/o marcas) ubicada sobre un sustrato.

55 En algunas modalidades, la formación del hidrogel sobre un sustrato se produce antes, simultáneamente con, o después de que se proporcionan las sondas a la muestra. Por ejemplo, la formación del hidrogel puede realizarse sobre el sustrato que ya contiene las sondas.

60 En algunas modalidades, la formación del hidrogel se produce dentro de una muestra biológica. En algunas modalidades, una muestra biológica (por ejemplo, sección de tejido) se incluye en un hidrogel. En algunas modalidades, las subunidades de hidrogel se difunden en la muestra biológica, y la polimerización del hidrogel se inicia mediante un estímulo externo o interno.

En modalidades en las que se forma un hidrogel dentro de una muestra biológica, puede usarse una química de funcionalización. En algunas modalidades, la química de funcionalización incluye la química hidrogel-tejido (HTC). Puede usarse cualquier cadena principal de hidrogel-tejido (por ejemplo, sintética o nativa) adecuada para la HTC para anclar macromoléculas biológicas y modular la funcionalización. Ejemplos no limitantes de métodos que usan variantes de la cadena principal de HTC incluyen CLARITY, PACT, ExM, SWITCH y ePACT. En algunas modalidades, la formación del hidrogel dentro de una muestra biológica es permanente. Por ejemplo, las macromoléculas biológicas pueden adherirse permanentemente al hidrogel permitiendo varias rondas de pesquisaje. En algunas modalidades, la formación del hidrogel dentro de una muestra biológica es reversible.

En algunas modalidades, se añaden reactivos adicionales a las subunidades de hidrogel antes, simultáneamente con, y/o después de la polimerización. Por ejemplo, los reactivos adicionales pueden incluir, pero no se limitan a, oligonucleótidos (por ejemplo, sondas), endonucleasas para fragmentar ADN, tampón de fragmentación para ADN, enzimas ADN polimerasa, dNTP usados para amplificar el ácido nucleico y unir el código de barras a los fragmentos amplificados. Pueden usarse otras enzimas, lo que incluye, sin limitación, ARN polimerasa, transposasa, ligasa, proteinasa K, y ADNasa. Los reactivos adicionales también pueden incluir enzimas transcriptasas inversas, lo que incluye enzimas con actividad transferasa terminal, cebadores y oligonucleótidos para intercambio. En algunas modalidades, se añaden marcadores ópticos a las subunidades de hidrogel antes, simultáneamente con, y/o después de la polimerización.

En algunas modalidades, los reactivos para HTC se añaden al hidrogel antes, simultáneamente con, y/o después de la polimerización. En algunas modalidades, se añade un agente de marcaje de células al hidrogel antes, simultáneamente con, y/o después de la polimerización. En algunas modalidades, se añade un agente penetrante de células al hidrogel antes, simultáneamente con, y/o después de la polimerización.

Los hidrogeles incluidos dentro de las muestras biológicas pueden clarificarse mediante el uso de cualquier método adecuado. Por ejemplo, pueden usarse métodos electroforéticos para clarificar tejidos para eliminar macromoléculas biológicas de la muestra incluida en hidrogel. En algunas modalidades, una muestra incluida en hidrogel se almacena, antes o después de clarificar el hidrogel, en un medio (por ejemplo, un medio de montaje, metilcelulosa, u otros medios semisólidos).

En algunas modalidades, un método descrito en la presente descripción comprende desreticular la muestra biológica reticulada reversiblemente. No es necesario completar la desreticulación. En algunas modalidades, solo se desreticula una porción de las moléculas reticuladas en la muestra biológica reticulada reversiblemente y se permite que migren. (viii) Permeabilización y tratamiento de los tejidos

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

En general, una muestra biológica puede permeabilizarse al exponer la muestra a uno o más agentes permeabilizantes. Los agentes adecuados para este propósito incluyen, pero no se limitan a, solventes orgánicos (por ejemplo, acetona, etanol, y metanol), agentes reticulantes (por ejemplo, paraformaldehído), detergentes (por ejemplo, saponina, Tritón X-100™ o Tween-20™), y enzimas (por ejemplo, tripsina, proteasas). En algunas modalidades, la muestra biológica puede incubarse con un agente permeabilizante de células para facilitar la permeabilización de la muestra. Se describen métodos adicionales para la permeabilización de muestras, por ejemplo, en Jamur y otros, *Method Mol. Biol.* 588:63-66, 2010. Puede usarse generalmente cualquier método adecuado para la permeabilización de muestras en relación con las muestras descritas en la presente descripción.

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

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

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

Pueden añadirse reactivos adicionales a una muestra biológica para realizar diversas funciones antes del análisis de la muestra. En algunas modalidades, pueden añadirse a la muestra agentes inactivadores de ADNasa y ARNasa o inhibidores tales como proteinasa K, y/o agentes quelantes tales como EDTA. Por ejemplo, un método descrito en la presente descripción puede comprender una etapa para aumentar la accesibilidad de un ácido nucleico para la unión, por ejemplo, una etapa de desnaturalización para la abertura del ADN en una célula para la hibridación mediante una sonda. Por ejemplo, puede usarse el tratamiento con proteinasa K para liberar el ADN con proteínas unidas a este. (ix) Enriquecimiento selectivo de especies de ARN.

En algunas modalidades, donde el ARN es el analito, pueden enriquecerse selectivamente una o más especies del analito de ARN de interés. Por ejemplo, pueden seleccionarse una o más especies del ARN de interés mediante la adición de uno o más oligonucleótidos a la muestra. En algunas modalidades, el oligonucleótido adicional es una secuencia usada para cebar una reacción mediante una enzima (por ejemplo, una polimerasa). Por ejemplo, pueden usarse una o más secuencias de cebadores con complementariedad de secuencias con uno o más ARN de interés para amplificar el uno o más ARN de interés, enriqueciendo selectivamente de esta manera estos ARN.

En algunas modalidades, un oligonucleótido con complementariedad de secuencias con la hebra complementaria de ARN (por ejemplo, ADNc) puede unirse al ADNc. Por ejemplo, los oligonucleótidos biotinilados con secuencia complementaria con uno o más ADNc de interés se unen al ADNc y pueden utilizarse métodos de biotinilación-afinidad por estreptavidina para capturar los oligonucleótidos biotinilados (por ejemplo, mediante el uso de perlas de estreptavidina).

Alternativamente, pueden seleccionarse negativamente una o más especies de ARN (por ejemplo, eliminarse) mediante el uso de cualquiera de una variedad de métodos. Por ejemplo, las sondas pueden administrarse a una muestra que se hibrida selectivamente al ARN ribosomal (ARNr), reduciendo de esta manera la mezcla y concentración de ARNr en la muestra. Adicionalmente y alternativamente, el tratamiento con nucleasas específicas de la doble cadena (DSN) puede eliminar el ARNr (ver, por ejemplo, Archer, y otros, Selective and flexible depletion of problematic sequences from RNA-seq libraries at the cDNA stage, *BMC Genomics*, 15 401, (2014)). Además, la cromatografía de hidroxapatita puede eliminar especies abundantes (por ejemplo, ARNr) (ver, por ejemplo, Vandernoot, V.A., cDNA normalization by hydroxyapatite chromatography to enrich transcriptome diversity in RNA-seq applications, *Biotechniques*, 53(6) 373-80, (2012)).

Una muestra biológica puede comprender uno o una pluralidad de analitos de interés. Se proporcionan métodos para realizar ensayos multiplexados para analizar dos o más analitos diferentes en una única muestra biológica.

B. Analitos

Los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden usarse para detectar y analizar una amplia variedad de analitos diferentes. En algunos aspectos, un analito puede incluir cualquier sustancia biológica, estructura, resto, o componente a analizar. En algunos aspectos, una diana descrita en la presente descripción puede incluir de manera similar cualquier analito de interés. En algunos ejemplos, una diana o analito puede detectarse directa o indirectamente.

Los analitos pueden derivarse de un tipo específico de célula y/o de una región subcelular específica. Por ejemplo, los analitos pueden derivarse del citosol, de núcleos celulares, de mitocondrias, de microsomas, y más generalmente, de cualquier otro compartimiento, orgánulo, o porción de una célula. Los agentes permeabilizantes que se dirigen específicamente a ciertos compartimientos y orgánulos celulares pueden usarse para liberar selectivamente analitos de las células para su análisis, y/o para permitir el acceso de uno o más reactivos (por ejemplo, sondas para la detección de analitos) a los analitos en la célula o compartimiento u orgánulo celular.

El analito puede incluir cualquier biomolécula o compuesto químico, lo que incluye una macromolécula tal como una proteína o péptido, un lípido o una molécula de ácido nucleico, o una molécula pequeña, lo que incluye moléculas orgánicas o inorgánicas. El analito puede ser una célula o un microorganismo, lo que incluye un virus, o un fragmento o producto de este. Un analito puede ser cualquier sustancia o entidad para la cual puede desarrollarse un ligando específico (por ejemplo, un ligando por afinidad). Dicho ligando específico puede ser una sonda de ácido nucleico (para un analito de ácido nucleico) y puede conducir directamente a la generación de una plantilla para RCA (por ejemplo, una sonda candado u otra sonda circularizable). Alternativamente, el ligando específico puede acoplarse a un ácido nucleico, que puede detectarse mediante el uso de una estrategia de RCA, por ejemplo, en un ensayo que usa o genera un ácido nucleico circular que puede ser la plantilla para RCA.

Los analitos de interés particular pueden incluir moléculas de ácido nucleico, tales como ADN (por ejemplo, ADN genómico, ADN mitocondrial, ADN plastidial, ADN viral, etc.) y ARN (por ejemplo, ARNm, microARN, ARNr, ARNpn, ARN viral, etc.), y moléculas de ácido nucleico sintéticas y/o modificadas, (por ejemplo, lo que incluye dominios de ácido nucleico que comprenden o que consisten de nucleótidos sintéticos o modificados tales como LNA, PNA, morfolino, etc.), moléculas proteínicas tales como péptidos, polipéptidos, proteínas o priones o cualquier molécula que incluye un componente proteico o polipeptídico, etc., o fragmentos de estos, o una molécula de lípido o carbohidrato, o cualquier molécula que comprende un componente de lípido o carbohidrato. El analito puede ser una sola molécula o un complejo que contiene dos o más subunidades moleculares, por ejemplo, lo que incluye, pero no se limita a, complejos proteína-ADN, que pueden o no estar unidos covalentemente entre sí, y que pueden ser el mismo o diferentes. Por tanto, además de las células o microorganismos, dicho analito complejo también puede ser un complejo proteico o interacción proteica. Dicho complejo o interacción puede ser por tanto un homo o heteromultímero. Los agregados de moléculas, por ejemplo, proteínas, también pueden ser analitos diana, por ejemplo, agregados de la misma proteína o de diferentes proteínas. El analito también puede ser un complejo entre proteínas o péptidos y moléculas de ácido nucleico tales como ADN o ARN, por ejemplo, interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos, por ejemplo, factores reguladores, tales como factores de transcripción, y ADN o ARN.

(i) Analitos endógenos

En algunas modalidades, un analito en la presente descripción es endógeno con respecto a una muestra biológica y puede incluir analitos de ácidos nucleicos y analitos que no son ácidos nucleicos. Los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden usarse para analizar analitos de ácidos nucleicos (por ejemplo, mediante el uso de una sonda o conjunto de sondas de ácidos nucleicos que se hibridan directa o indirectamente con un analito de ácidos nucleicos) y/o analitos que no son ácidos nucleicos (por ejemplo, mediante el uso de un agente de marcaje que comprende un oligonucleótido indicador y se une directa o indirectamente a un analito que no es un ácido nucleico) en cualquier combinación adecuada.

Los ejemplos de analitos que no son ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, lípidos, carbohidratos, péptidos, proteínas, glicoproteínas (unidas a N o unidas a O), lipoproteínas, fosfoproteínas, variantes fosforiladas o acetiladas de proteínas específicas, variantes de amidación de proteínas, variantes de hidroxilación de proteínas, variantes de metilación de proteínas, variantes de ubiquitinación de proteínas, variantes de sulfatación de proteínas, proteínas de la capa viral, proteínas extracelulares e intracelulares, anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno. En algunas modalidades, el analito está dentro de una célula o sobre una superficie celular, tal como un analito transmembrana o uno que está unido a la membrana celular. En algunas modalidades, el analito puede ser un orgánulo (por ejemplo, núcleos o mitocondrias). En algunas modalidades, el analito es un analito extracelular, tal como un analito secretado. Los analitos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, un receptor, un antígeno, una proteína de superficie, una proteína transmembrana, un conglomerado de proteínas de diferenciación, un canal proteico, una bomba de proteínas, una proteína portadora, un fosfolípido, una glicoproteína, un glucolípido, un complejo proteico de interacción célula-célula, un complejo presentador de antígenos, un complejo mayor de histocompatibilidad, un receptor de linfocitos T manipulado genéticamente, un receptor de linfocitos T, un receptor de linfocitos B, un receptor de antígeno quimérico, una proteína de la matriz extracelular, una modificación postraduccional (por ejemplo, fosforilación, glucosilación, ubiquitinación, nitrosilación, metilación, acetilación o lipidación) del estado de una proteína de la superficie celular, una unión en hendidura, y una unión adherente.

Los ejemplos de analitos de ácidos nucleicos incluyen analitos de ADN tales como ADN monocatenario (ADNmc), ADN bicatenario (ADNbc), ADN genómico, ADN metilado, secuencias de ADN metilado específicas, ADN fragmentado, ADN mitocondrial, productos de PCR sintetizados *in situ*, e híbridos de ARN/ADN. El analito de ADN puede ser un transcrito de otra molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN tal como ARNm) presente en una muestra de tejido.

Los ejemplos de analitos de ácidos nucleicos incluyen además analitos de ARN tales como diversos tipos de ARN codificante y no codificante. Ejemplos de los diferentes tipos de analitos de ARN incluyen ARN mensajero (ARNm), lo que incluye un ARN naciente, un pre-ARNm, un ARN de transcrito primario y un ARN procesado, tal como un ARNm con caperuza (por ejemplo, con una caperuza de 7-metil guanosina 5'), un ARNm poliadenilado (cola de poli-A en el extremo 3'), y un ARNm empalmado en el que se han eliminado uno o más intrones. También se incluyen en los analitos descritos en la presente descripción ARNm sin caperuza, un ARNm no poliadenilado, y un ARNm no empalmado. El analito de ARN puede ser un transcrito de otra molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN tal como ARN viral) presente en una muestra de tejido. Ejemplos de ARN no codificantes (ARNnc) que no se traducen en una proteína incluyen ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosomal (ARNr), así como también ARN pequeños no codificantes tales como microARN (miARN), ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN de interacción con Piwi (piARN), ARN pequeño nucleolar (ARNpno), ARN pequeño nuclear (ARNpn), ARN extracelular (ARNex), ARN pequeño del cuerpo de Cajal específicos (scaARN), y los ARNnc largos tales como Xist y HOTAIR. El ARN puede ser pequeño (por ejemplo, menor que 200 bases de ácido nucleico de longitud) o grande (por ejemplo, ARN mayor que 200 bases de ácido nucleico de longitud). Ejemplos de ARN pequeños incluyen ARN ribosomal (ARNr) 5.8S, ARNr 5S, ARNt, miARN, ARNip, ARNpno, ARNpn, piARN, ARN pequeño derivado de ARNt (ARNpt), y ARN pequeño derivado de ADNr (ARNpr). El ARN puede ser ARN bicatenario o ARN monocatenario. El ARN puede ser ARN circular. El ARN puede ser un ARNr bacteriano (por ejemplo, ARNr 16s o ARNr 23s).

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, un analito puede ser un ácido nucleico desnaturalizado, en donde el ácido nucleico desnaturalizado resultante es monocatenario. El ácido nucleico puede desnaturalizarse, por ejemplo, opcionalmente, mediante el uso de formamida, calor, o tanto formamida como calor. En algunas modalidades, el ácido nucleico no se desnaturaliza para su uso en un método descrito en la presente descripción.

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

Los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden usarse para analizar cualquier cantidad de analitos. Por ejemplo, la cantidad de analitos que se analizan puede ser al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 11, al menos aproximadamente 12, al menos aproximadamente 13, al menos aproximadamente 14, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 1000, al menos aproximadamente 10 000, al menos aproximadamente 100 000 o más analitos diferentes presentes en una región de la muestra o dentro de un elemento individual del sustrato.

En cualquier modalidad descrita en la presente descripción, el analito comprende una secuencia diana. En algunas modalidades, la secuencia diana puede ser endógena con respecto a la muestra, generada en la muestra, añadida a la muestra, o asociada con un analito en la muestra. En algunas modalidades, la secuencia diana es una secuencia diana monocatenaria (por ejemplo, una secuencia en un producto de la amplificación por círculo rodante). En algunas modalidades, los analitos comprenden una o más secuencias diana monocatenarias. En un aspecto, una primera secuencia diana monocatenaria no es idéntica a una segunda secuencia diana monocatenaria. En otro aspecto, una primera secuencia diana monocatenaria es idéntica a una o más segundas secuencias diana monocatenarias. En algunas modalidades, la una o más segundas secuencias diana monocatenarias están comprendidas en el mismo analito (por ejemplo, ácido nucleico) que la primera secuencia diana monocatenaria. Alternativamente, la una o más segundas secuencias diana monocatenarias están comprendidas en un analito diferente (por ejemplo, ácido nucleico) de la primera secuencia diana monocatenaria.

(ii) Agentes de marcaje

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan métodos y composiciones para analizar analitos endógenos (por ejemplo, ARN, ADNmc, y proteínas intracelulares o de la superficie celular y/o metabolitos) en una muestra mediante el uso de uno o más agentes de marcaje. En algunas modalidades, un agente de marcaje de un analito puede incluir un agente que interactúa con un analito (por ejemplo, un analito endógeno en una muestra). En algunas modalidades, los agentes de marcaje pueden comprender un oligonucleótido indicador que es indicativo del analito o porción de este que interactúa con el agente de marcaje. Por ejemplo, el oligonucleótido indicador puede comprender una secuencia de código de barras que permite la identificación del agente de marcaje. En algunos casos, la muestra que entra en contacto con el agente de marcaje puede ponerse en contacto además con una sonda (por ejemplo, una secuencia de sonda monocatenaria), que se hibrida con un oligonucleótido indicador del agente de marcaje, para identificar el analito asociado con el agente de marcaje. En algunas modalidades, el agente de marcaje del analito comprende un resto de unión al analito y un dominio de código de barras del agente de marcaje que comprende una o más secuencias de código de barras, por ejemplo, una secuencia de código de barras que corresponde al resto de unión al analito y/o al analito. Un código de barras del resto de unión al analito incluye un código de barras que se asocia con, o identifica de cualquier otra manera, el resto de unión al analito. En algunas modalidades, al identificar un resto de unión al analito mediante la identificación de su código de barras del resto de unión al analito asociado, también puede identificarse el analito al que se une el resto de unión al analito. Un código de barras del resto de unión al analito puede ser una secuencia de ácido nucleico de una longitud y/o secuencia dadas que está asociada con el resto de unión al analito. Un código de barras del resto de unión al analito puede incluir generalmente cualquiera de la variedad de aspectos de códigos de barras descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, el método comprende una o más etapas de fijación posterior (también denominadas posfijación) después de entrar en contacto la muestra con uno o más agentes de marcaje.

En los métodos y sistemas descritos en la presente descripción, pueden usarse uno o más agentes de marcaje capaces de unirse o acoplarse de cualquier otra manera a uno o más elementos para caracterizar analitos, células y/o elementos celulares. En algunos casos, los elementos celulares incluyen elementos de la superficie celular. Los analitos pueden incluir, pero no se limitan a, una proteína, un receptor, un antígeno, una proteína superficial, una proteína transmembrana, un conglomerado de proteínas de diferenciación, un canal proteico, una bomba de proteínas, una proteína portadora, un fosfolípido, una glicoproteína, un glucolípido, un complejo proteico de interacción célula-célula, un complejo presentador de antígenos, un complejo mayor de histocompatibilidad, un receptor de linfocitos T

manipulado genéticamente, un receptor de linfocitos T, un receptor de linfocitos B, un receptor de antígeno quimérico, una unión en hendidura, una unión adherente, o cualquiera de sus combinaciones. En algunos casos, los elementos celulares pueden incluir analitos intracelulares, tales como proteínas, modificaciones de proteínas (por ejemplo, estado de fosforilación u otras modificaciones postraduccionales), proteínas nucleares, proteínas de la membrana nuclear, o cualquiera de sus combinaciones.

En algunas modalidades, un resto de unión al analito puede incluir cualquier molécula o resto capaz de unirse a un analito (por ejemplo, un analito biológico, por ejemplo, un constituyente macromolecular). Un agente de marcaje puede incluir, pero no se limita a, una proteína, un péptido, un anticuerpo (o un fragmento de unión al epítipo de este), un resto lipofílico (tal como colesterol), una molécula de unión al receptor de la superficie celular, un ligando del receptor, una molécula pequeña, un anticuerpo biespecífico, un activador de linfocitos T biespecífico, un activador de receptores de linfocitos T, un activador de receptores de linfocitos B, un pro cuerpo, un aptámero, un monocuerpo, un afímero, una darpin, y un andamio de proteínas, o cualquiera de sus combinaciones. Los agentes de marcaje pueden incluir (por ejemplo, se unen a) un oligonucleótido indicador que es indicativo del elemento de la superficie celular al que se une el grupo de unión. Por ejemplo, el oligonucleótido indicador puede comprender una secuencia de código de barras que permite la identificación del agente de marcaje. Por ejemplo, un agente de marcaje que es específico para un tipo de elemento celular (por ejemplo, un primer elemento de la superficie celular) puede tener acoplado al mismo un primer oligonucleótido indicador, mientras que un agente de marcaje que es específico para un elemento celular diferente (por ejemplo, un segundo elemento de la superficie celular) puede tener un oligonucleótido indicador diferente acoplado al mismo. Para una descripción de agentes de marcaje ilustrativos, oligonucleótidos indicadores, y métodos de uso, ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 10,550,429; la publicación de patente de Estados Unidos 20190177800; y la publicación de patente de Estados Unidos 20190367969.

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

En otros casos, por ejemplo, para facilitar el multiplexado de muestras, un agente de marcaje que es específico para un elemento celular en particular puede tener una primera pluralidad del agente de marcaje (por ejemplo, un anticuerpo o resto lipofílico) acoplado a un primer oligonucleótido indicador y una segunda pluralidad del agente de marcaje acoplado a un segundo oligonucleótido indicador.

En algunos aspectos, estos oligonucleótidos indicadores pueden comprender secuencias de código de barras de ácidos nucleicos que permiten la identificación del agente de marcaje al que se acopla el oligonucleótido indicador. La selección de oligonucleótidos como el indicador puede proporcionar la ventaja de ser capaz de generar una diversidad significativa en términos de secuencia, al tiempo que también puede unirse fácilmente a la mayoría de las biomoléculas, por ejemplo, anticuerpos, etc., así como también detectarse fácilmente, por ejemplo, mediante el uso de tecnologías de secuenciación o de matriz.

La unión (acoplamiento) de los oligonucleótidos indicadores a los agentes de marcaje puede lograrse a través de cualquiera de una variedad de asociaciones o uniones directas o indirectas, covalentes o no covalentes. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden unirse covalentemente a una porción de un agente de marcaje (tal como una proteína, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo) mediante el uso de técnicas de conjugación química (por ejemplo, kits de marcaje de anticuerpos Lightning-Link® disponibles en Innova Biosciences), así como también otros mecanismos de unión no covalente, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos y oligonucleótidos biotinilados (o perlas que incluyen uno o más enlazadores biotinilados, acoplados a oligonucleótidos) con un enlazador de avidina o estreptavidina. Se dispone de técnicas de biotinylation de anticuerpos y oligonucleótidos. Ver, por ejemplo, Fang, y otros, "Fluoride-Cleavable Biotinylation Phosphoramidite for 5'-end-Labeling and Affinity Purification of Synthetic Oligonucleotides", *Nucleic Acids Res.* 15 de enero de 2003; 31(2):708-715. Igualmente, se han desarrollado técnicas de biotinylation de proteínas y péptidos, y están fácilmente disponibles. Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 6,265,552. Además, puede usarse una reacción de química clic para acoplar oligonucleótidos indicadores a agentes de marcaje. Pueden usarse kits disponibles comercialmente, tales como los de Thunderlink y Abcam, y técnicas comunes en la técnica, para acoplar oligonucleótidos indicadores a agentes de marcaje según sea apropiado. En otro ejemplo, un agente de marcaje se acopla indirectamente (por ejemplo, mediante hibridación) a un oligonucleótido indicador que comprende una secuencia de código de barras que identifica el agente de marcaje. Por

ejemplo, el agente de marcaje puede acoplarse directamente (por ejemplo, unirse covalentemente) a un oligonucleótido de hibridación que comprende una secuencia que se hibrida con una secuencia del oligonucleótido indicador. La hibridación del oligonucleótido de hibridación al oligonucleótido indicador acopla el agente de marcaje al oligonucleótido indicador. En algunas modalidades, los oligonucleótidos indicadores son liberables del agente de marcaje, tal como tras la aplicación de un estímulo. Por ejemplo, el oligonucleótido indicador puede unirse al agente marcador a través de un enlace lábil (por ejemplo, lábil químicamente, fotolábil, lábil térmicamente, etc.) como se describe generalmente para liberar moléculas de soportes en cualquier otra parte en la presente descripción. En algunos casos, los oligonucleótidos indicadores descritos en la presente descripción pueden incluir una o más secuencias funcionales que pueden usarse en el procesamiento subsecuente, tal como una secuencia adaptadora, una secuencia de identificador molecular único (UMI), una secuencia de unión a células de flujo específicas del secuenciador, un cebador o secuencia de unión al cebador, un cebador o secuencia de unión al cebador para secuenciación.

En algunos casos, el agente de marcaje puede comprender un oligonucleótido indicador y un marcador. Un marcador puede ser un fluoróforo, un radioisótopo, una molécula capaz de una reacción colorimétrica, una partícula magnética, o cualquier otra molécula o compuesto adecuado capaz de ser detectado. El marcador puede conjugarse con un agente de marcaje (u oligonucleótido indicador) ya sea directa o indirectamente (por ejemplo, el marcador puede conjugarse a una molécula que puede unirse al agente de marcaje u oligonucleótido indicador). En algunos casos, un marcador se conjuga a un primer oligonucleótido que es complementario (por ejemplo, se hibrida) a una secuencia del oligonucleótido indicador.

En algunas modalidades, múltiples especies diferentes de analitos (por ejemplo, polipéptidos) de la muestra biológica pueden asociarse subsecuentemente con la una o más propiedades físicas de la muestra biológica. Por ejemplo, las múltiples especies diferentes de analitos pueden asociarse con ubicaciones de los analitos en la muestra biológica. Dicha información (por ejemplo, información proteómica cuando el o los restos de unión al analito reconocen un(os) polipéptido(s)) puede usarse en asociación con otra información espacial (por ejemplo, información genética de la muestra biológica, tal como información de la secuencia de ADN, información del transcriptoma (por ejemplo, secuencias de transcritos), o ambas). Por ejemplo, una proteína de la superficie celular de una célula puede asociarse con una o más propiedades físicas de la célula (por ejemplo, una forma, tamaño, actividad, o un tipo de célula). La una o más propiedades físicas pueden caracterizarse mediante la obtención de imágenes de la célula. La célula puede unirse a un agente de marcaje de analito que comprende un resto de unión al analito que se une a la proteína de la superficie celular y un código de barras del resto de unión al analito que identifica ese resto de unión al analito. Los resultados del análisis de proteínas en una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido o una célula) pueden asociarse con el análisis de ADN y/o ARN en la muestra.

(iii) Productos de un analito endógeno y/o un agente de marcaje

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan métodos y composiciones para analizar uno o más productos de un analito endógeno y/o un agente de marcaje en una muestra biológica. En algunas modalidades, se analiza un analito endógeno (por ejemplo, un ADN o ARN viral o celular) o un producto (por ejemplo, un producto de hibridación, un producto de ligadura, un producto de extensión (por ejemplo, mediante una ADN o ARN polimerasa), un producto de replicación, un producto de transcripción/transcripción inversa, y/o un producto de la amplificación tal como un producto de la amplificación por círculo rodante (RCA)) de este. En algunas modalidades, se analiza un agente de marcaje que se une directa o indirectamente a un analito en la muestra biológica. En algunas modalidades, se analiza un producto (por ejemplo, un producto de hibridación, un producto de ligadura, un producto de extensión (por ejemplo, mediante una ADN o ARN polimerasa), un producto de replicación, un producto de transcripción/transcripción inversa, y/o un producto de la amplificación tal como un producto de la amplificación por círculo rodante (RCA)) de un agente de marcaje que se une directa o indirectamente a un analito en la muestra biológica.

(a) Hibridación

En algunas modalidades, un producto de un analito endógeno y/o un agente de marcaje es un producto de hibridación que comprende el emparejamiento de secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente complementarias o complementarias dentro de dos moléculas diferentes, una de las cuales es el analito endógeno o el agente de marcaje (por ejemplo, oligonucleótido indicador unido al mismo). La otra molécula puede ser otra molécula endógena u otro agente de marcaje tal como una sonda. El emparejamiento puede lograrse mediante cualquier proceso en el que una secuencia de ácido nucleico se une a una secuencia sustancial o completamente complementaria a través del emparejamiento de bases para formar un complejo de hibridación. Para los propósitos de hibridación, dos secuencias de ácidos nucleicos son "sustancialmente complementarias" si al menos el 60 % (por ejemplo, al menos el 70 %, al menos el 80 %, o al menos el 90 %) de sus bases individuales son complementarias entre sí.

Diversas sondas y conjuntos de sondas pueden hibridarse con un analito endógeno y/o un agente de marcaje y cada sonda puede comprender una o más secuencias de código de barras. Las sondas o conjuntos de sondas con código de barras ilustrativas pueden basarse en una sonda candado, una sonda candado espaciada, un conjunto de sondas SNAIL (ligadura intramolecular asistida por nucleótidos puente), un conjunto de sondas PLAYR (ensayo de ligadura

de proximidad para ARN), y un conjunto de sondas PLISH (hibridación *in situ* de ligadura de proximidad). El diseño específico de la sonda o conjunto de sondas puede variar.

(b) Ligadura

En algunas modalidades, un producto de un analito endógeno y/o un agente de marcaje es un producto de ligadura. En algunas modalidades, el producto de ligadura se forma entre dos o más analitos endógenos. En algunas modalidades, el producto de ligadura se forma entre un analito endógeno y un agente de marcaje. En algunas modalidades, el producto de ligadura se forma entre dos o más agentes de marcaje. En algunas modalidades, el producto de ligadura es una ligadura intramolecular de un analito endógeno. En algunas modalidades, el producto de ligadura es una ligadura intramolecular de un agente de marcaje, por ejemplo, la circularización de una sonda o conjunto de sondas circularizables tras la hibridación con una secuencia diana. La secuencia diana puede estar comprendida en un analito endógeno (por ejemplo, ácido nucleico tal como un ADN genómico o ARNm) o un producto de este (por ejemplo, ADNc de un transcrito de ARNm celular), o en un agente de marcaje (por ejemplo, el oligonucleótido indicador) o un producto de este.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona una sonda o conjunto de sondas capaz de realizar ligadura con plantilla de ADN, tal como de una molécula de ADNc. Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 8,551,710. Ver, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos 2020/0224244. En algunas modalidades, el conjunto de sondas es un conjunto de sondas SNAIL. Ver, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos 20190055594. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona un ensayo de ligadura de proximidad multiplexado. Ver, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos 20140194311. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona una sonda o conjunto de sondas capaz de realizar ligadura de proximidad, por ejemplo, un conjunto de sondas de ensayo de ligadura de proximidad para ARN (por ejemplo, PLAYR). Ver, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos 20160108458. En algunas modalidades, una sonda circular puede hibridarse indirectamente con el ácido nucleico diana. En algunas modalidades, el constructo circular se forma a partir de un conjunto de sondas capaz de ligadura de proximidad, por ejemplo, un conjunto de sondas de hibridación *in situ* de ligadura de proximidad (PLISH). Ver, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos 2020/0224243.

En algunas modalidades, la ligadura implica una ligadura química. En algunas modalidades, la ligadura implica una ligadura dependiente de plantilla. En algunas modalidades, la ligadura implica una ligadura independiente de plantilla. En algunas modalidades, la ligadura implica una ligadura enzimática.

En algunas modalidades, la ligadura enzimática implica el uso de una ligasa. En algunos aspectos, la ligasa usada en la presente descripción comprende una enzima que se usa comúnmente para unir polinucleótidos entre sí o para unir los extremos de un solo polinucleótido. Pueden usarse una ARN ligasa, una ADN ligasa, u otra variedad de ligasa para ligar dos secuencias de nucleótidos entre sí. Las ligasas comprenden ligasas de polinucleótidos bicatenarios dependientes de ATP, ADN o ARN ligasas bicatenarias dependientes de NAD⁻ⁱ y ligasas de polinucleótidos monocatenarios, por ejemplo, cualquiera de las ligasas descritas en los documentos EC 6.5.1.1 (ligasas dependientes de ATP), EC 6.5.1.2 (ligasas dependientes de NAD⁺), EC 6.5.1.3 (ARN ligasas). Los ejemplos específicos de ligasas comprenden ligasas bacterianas tales como ADN ligasa de *E. coli*, ADN ligasa de *Tth*, ADN ligasa de *Thermococcus* sp. (cepa 9^oN) (ADN ligasa 9^oNTM, New England Biolabs), ADN ligasa Taq, AmpligasaTM (Epicentre Biotechnologies) y ligasas de fagos tales como ADN ligasa T3, ADN ligasa T4 y ADN ligasa T7 y mutantes de estas. En algunas modalidades, la ligasa es una ARN ligasa T4. En algunas modalidades, la ligasa es una ligasa splintR. En algunas modalidades, la ligasa es una ADN ligasa monocatenaria. En algunas modalidades, la ligasa es una ADN ligasa T4. En algunas modalidades, la ligasa es una ligasa que tiene una actividad ADN ligasa con puente de ADN. En algunas modalidades, la ligasa es una ligasa que tiene una actividad ADN ligasa con puente de ARN.

En algunas modalidades, la ligadura en la presente descripción es una ligadura directa. En algunas modalidades, la ligadura en la presente descripción es una ligadura indirecta. "Ligadura directa" significa que los extremos de los polinucleótidos se hibridan inmediatamente adyacentes entre sí para formar un sustrato para una enzima ligasa, lo que da como resultado su ligadura entre sí (ligadura intramolecular). Alternativamente, "indirecta" significa que los extremos de los polinucleótidos se hibridan de manera no adyacente entre sí, por ejemplo, separados por uno o más nucleótidos intervinientes o "espacios". En algunas modalidades, dichos extremos no se ligan directamente entre sí, sino que se producen ya sea mediante la intermediación de uno o más (oligo)nucleótidos intervinientes (llamados (oligo)nucleótidos de "espacio" o de "relleno de espacios") o mediante la extensión del extremo 3' de una sonda para "rellenar" el "espacio" correspondiente a dichos nucleótidos intervinientes (ligadura intermolecular). En algunos casos, el espacio de uno o más nucleótidos entre los extremos hibridados de los polinucleótidos puede ser "rellenado" mediante uno o más (oligo)nucleótidos de "espacio" que son complementarios a un puente, sonda candado, o ácido nucleico diana. El espacio puede ser un espacio de 1 a 60 nucleótidos, o un espacio de 1 a 40 nucleótidos, o un espacio de 3 a 40 nucleótidos. En modalidades específicas, el espacio puede ser un espacio de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más nucleótidos, de cualquier número entero (o intervalo de números enteros) de nucleótidos entre los valores indicados. En algunas modalidades, el espacio entre dichas regiones terminales puede rellenarse mediante un oligonucleótido de espacio o al extender el extremo 3' de un polinucleótido. En algunos casos, la ligadura implica ligar los extremos de la sonda a al menos un (oligo)nucleótido de espacio, de manera que el (oligo)nucleótido

de espacio se incorpora en el polinucleótido resultante. En algunas modalidades, la ligadura en la presente descripción está precedida por el relleno de espacios. En otras modalidades, la ligadura en la presente descripción no requiere el relleno de espacios.

5 En algunas modalidades, la ligadura de los polinucleótidos produce polinucleótidos con una temperatura de fusión mayor que la de los polinucleótidos no ligados. Por tanto, en algunos aspectos, la ligadura estabiliza el complejo de hibridación que contiene los polinucleótidos ligados antes de las etapas subsecuentes, que comprenden la amplificación y la detección.

10 En algunos aspectos, se usa una ligasa de alta fidelidad, tal como una ADN ligasa termoestable (por ejemplo, una ADN ligasa *Taq*). Las ADN ligasas termoestables son activas a temperaturas elevadas, permitiendo una discriminación adicional mediante la incubación de la ligadura a una temperatura cercana a la temperatura de fusión (T_m) de las hebras de ADN. Esto reduce selectivamente la concentración de sustratos asociados con errores de emparejamiento (se espera que tengan una T_m ligeramente inferior alrededor del error de emparejamiento) sobre los sustratos con emparejamiento de bases total asociados. Por tanto, la ligadura de alta fidelidad puede lograrse a través de una combinación de la selectividad intrínseca del sitio activo de la ligasa y condiciones equilibradas para reducir la incidencia del ADNbc asociado con errores de emparejamiento.

20 En algunas modalidades, la ligadura en la presente descripción es una ligadura de proximidad para ligar dos (o más) secuencias de ácidos nucleicos que están próximas entre sí, por ejemplo, a través de medios enzimáticos (por ejemplo, una ligasa). En algunas modalidades, la ligadura de proximidad puede incluir una etapa de "relleno de espacios" que implica la incorporación de uno o más ácidos nucleicos mediante una polimerasa, basado en la secuencia de ácidos nucleicos de una molécula de ácido nucleico plantilla, que abarca una distancia entre las dos moléculas de ácido nucleico de interés (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 7,264,929). Puede usarse una amplia variedad de métodos diferentes para la ligadura de proximidad de moléculas de ácido nucleico, lo que incluye (pero no se limita a) ligaduras de "extremo adhesivo" y "extremo romo". Adicionalmente, la ligadura monocatenaria puede usarse para realizar la ligadura de proximidad en una molécula de ácido nucleico monocatenario. Las ligaduras de proximidad de extremo adhesivo implican la hibridación de secuencias complementarias monocatenarias entre las dos moléculas de ácido nucleico a unirse, antes del evento de ligadura en sí mismo. Las ligaduras de proximidad de extremo romo no incluyen generalmente la hibridación de regiones complementarias de cada molécula de ácido nucleico, porque ambas moléculas de ácido nucleico carecen de un saliente monocatenario en el sitio de ligadura.

(c) Extensión y amplificación del cebador

35 En algunas modalidades, un producto es un producto de extensión del cebador de un analito, un agente de marcaje, una sonda o conjunto de sondas circularizables unidas al analito (por ejemplo, una sonda candado unida a ADN genómico, ARNm, o ADNc), o una sonda o conjunto de sondas circularizables unidas al agente de marcaje (por ejemplo, una sonda candado unida a uno o más oligonucleótidos indicadores de los mismos o diferentes agentes de marcaje).

40 En algunas modalidades, un cebador es generalmente una secuencia de ácido nucleico monocatenario que tiene un extremo 3' que puede usarse como un sustrato para una polimerasa de ácido nucleico en una reacción de extensión de ácido nucleico. Los cebadores de ARN están formados de nucleótidos de ARN, y se usan en la síntesis de ARN, mientras que los cebadores de ADN están formados de nucleótidos de ADN y se usan en la síntesis de ADN. Los cebadores pueden incluir además tanto nucleótidos de ARN como nucleótidos de ADN (por ejemplo, en un patrón aleatorio o diseñado). Los cebadores pueden incluir además otros nucleótidos naturales o sintéticos descritos en la presente descripción que pueden tener una funcionalidad adicional. En algunos ejemplos, los cebadores de ADN pueden usarse para el cebado de la síntesis de ARN y viceversa (por ejemplo, los cebadores de ARN pueden usarse para el cebado de la síntesis de ADN). Los cebadores pueden variar en longitud. Por ejemplo, los cebadores pueden tener de aproximadamente 6 bases a aproximadamente 120 bases. Por ejemplo, los cebadores pueden incluir hasta aproximadamente 25 bases. Un cebador puede, en algunos casos, referirse a una secuencia de unión al cebador. En algunas modalidades, una reacción de extensión del cebador se refiere generalmente a cualquier método donde dos secuencias de ácido nucleico se unen (por ejemplo, se hibridan) mediante un solapamiento de sus respectivas secuencias de ácidos nucleicos complementarias terminales (por ejemplo, extremos 3' terminales). Dicha unión puede ir seguida de la extensión del ácido nucleico (por ejemplo, una extensión enzimática) de uno, o ambos extremos terminales mediante el uso de la otra secuencia de ácido nucleico como plantilla para la extensión. La extensión enzimática puede realizarse mediante una enzima, lo que incluye, pero no se limita a, una polimerasa y/o una transcriptasa inversa.

60 En algunas modalidades, un producto de un analito endógeno y/o un agente de marcaje es un producto de la amplificación de uno o más polinucleótidos, por ejemplo, una sonda circular o una sonda o conjunto de sondas circularizables. En algunas modalidades, la amplificación se logra al realizar la amplificación por círculo rodante (RCA). En otras modalidades, se añade un cebador que se hibrida con la sonda circular o sonda circularizada y se usa como tal para la amplificación. En algunas modalidades, la RCA comprende una RCA lineal, una RCA ramificada, una RCA dendrítica, o cualquiera de sus combinaciones.

En algunas modalidades, la amplificación se realiza a una temperatura entre o entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 60 °C. En algunas modalidades, la amplificación se realiza a una temperatura entre o entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 40 °C. En algunos aspectos, la etapa de amplificación, tal como la amplificación por círculo rodante (RCA) se realiza a una temperatura entre a o aproximadamente 25 °C y a o aproximadamente 50 °C, tal como a o aproximadamente 25 °C, 27 °C, 29 °C, 31 °C, 33 °C, 35 °C, 37 °C, 39 °C, 41 °C, 43 °C, 45 °C, 47 °C, o 49 °C.

En algunas modalidades, tras la adición de una ADN polimerasa en presencia de precursores de dNTP apropiados y otros cofactores, un cebador se extiende para producir múltiples copias de la plantilla circular. Esta etapa de amplificación puede utilizar amplificación isotérmica o amplificación no isotérmica. En algunas modalidades, después de la formación del complejo de hibridación y la asociación de la sonda de amplificación, el complejo de hibridación se amplifica por círculo rodante para generar una nanobola de ADNc (por ejemplo, amplicón) que contiene múltiples copias del ADNc. Las técnicas para la amplificación por círculo rodante (RCA) incluyen RCA lineal, RCA ramificada, RCA dendrítica, o cualquiera de sus combinaciones. (Ver, por ejemplo, Baner y otros, *Nucleic Acids Research*, 26:5073-5078, 1998; Lizardi y otros, *Nature Genetics* 19:226, 1998; Mohsen y otros, *Acc Chem Res.* 15 de noviembre de 2016; 49(11): 2540–2550; Schweitzer y otros, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97:101 13- 1 19, 2000; Faruqi y otros, *BMC Genomics* 2:4, 2000; Nallur y otros, *Nucl. Acids Res.* 29:el 18, 2001; Dean y otros, *Genome Res.* 1 1 :1095- 1099, 2001; Schweitzer y otros, *Nature Biotech.* 20:359-365, 2002; patentes de Estados Unidos núms. 6,054,274, 6,291,187, 6,323,009, 6,344,329 y 6,368,801). Las polimerasas ilustrativas para su uso en la RCA comprenden ADN polimerasa tal como polimerasa phi29 (ϕ 29), fragmento de Klenow, ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (BST), ADN polimerasa T4, ADN polimerasa T7, o ADN polimerasa I. En algunos aspectos, pueden emplearse ADN polimerasas que se han manipulado genéticamente o mutado para tener características convenientes. En algunas modalidades, la polimerasa es la ADN polimerasa phi29.

En algunos aspectos, durante la etapa de amplificación, pueden añadirse nucleótidos modificados a la reacción para incorporar los nucleótidos modificados en el producto de la amplificación (por ejemplo, nanobola). Los nucleótidos modificados ilustrativos comprenden nucleótidos modificados con amina. En algunos aspectos de los métodos, por ejemplo, para anclar o reticular el producto de la amplificación generado (por ejemplo, nanobola) a un andamio, a estructuras celulares y/o a otros productos de amplificación (por ejemplo, otras nanobolas). En algunos aspectos, los productos de la amplificación comprenden un nucleótido modificado, tal como un nucleótido modificado con amina. En algunas modalidades, el nucleótido modificado con amina comprende una modificación con un resto de N-hidroxisuccinimida de ácido acrílico. Los ejemplos de otros nucleótidos modificados con amina comprenden, pero no se limitan a, una modificación con resto 5-aminoalil-dUTP, una modificación con resto 5-propargilamino-dCTP, una modificación con resto N6-6-aminohexil-dATP, o una modificación con resto 7-deaza-7-propargilamino-dATP.

En algunos aspectos, los polinucleótidos y/o el producto de la amplificación (por ejemplo, amplicón) pueden anclarse a una matriz polimérica. Por ejemplo, la matriz polimérica puede ser un hidrogel. En algunas modalidades, una o más de las sondas de polinucleótidos pueden modificarse para contener grupos funcionales que pueden usarse como un sitio de anclaje para unir las sondas de polinucleótidos y/o el producto de amplificación a una matriz polimérica. La modificación y la matriz polimérica ilustrativas que pueden emplearse de acuerdo con las modalidades proporcionadas comprenden las descritas en, por ejemplo, los documentos WO 2014/163886, WO 2017/079406, US 2016/0024555, US 2018/0251833 y US 2017/0219465. En algunos ejemplos, el andamio también contiene modificaciones o grupos funcionales que pueden reaccionar con o incorporar las modificaciones o grupos funcionales del conjunto de sondas o el producto de la amplificación. En algunos ejemplos, el andamio puede comprender oligonucleótidos, polímeros o grupos químicos, para proporcionar una matriz y/o estructuras de soporte.

Los productos de la amplificación pueden inmovilizarse dentro de la matriz generalmente en la ubicación del ácido nucleico que se amplifica, creando de esta manera una colonia de amplicones localizada. Los productos de la amplificación pueden inmovilizarse dentro de la matriz mediante factores estéricos. Los productos de la amplificación también pueden inmovilizarse dentro de la matriz mediante unión covalente o no covalente. De esta manera, los productos de la amplificación pueden considerarse unidos a la matriz. Al inmovilizarse a la matriz, tal como mediante unión covalente o reticulación, se mantiene el tamaño y la relación espacial de los amplicones originales. Al inmovilizarse a la matriz, tal como mediante la unión covalente o reticulación, los productos de la amplificación son resistentes al movimiento o desenrollado bajo esfuerzo mecánico.

En algunos aspectos, los productos de la amplificación se polimerizan conjuntamente y/o se unen covalentemente a la matriz circundante, de esta manera se preserva su relación espacial y cualquier información inherente a la misma. Por ejemplo, si los productos de la amplificación son aquellos que se generan a partir de ADN o ARN dentro de una célula incluida en la matriz, los productos de la amplificación también pueden funcionalizarse para formar una unión covalente a la matriz, preservando su información espacial dentro de la célula, proporcionando de esta manera un patrón de distribución de localización subcelular. En algunas modalidades, los métodos proporcionados implican incluir el uno o más conjuntos de sondas de polinucleótidos y/o los productos de la amplificación en presencia de subunidades de hidrogel para formar uno o más productos de la amplificación incluidos en hidrogel. En algunas modalidades, la química hidrogel-tejido descrita comprende unir covalentemente los ácidos nucleicos al hidrogel sintetizado in situ para la clarificación de tejidos, la difusión enzimática, y la secuenciación de múltiples ciclos mientras que un método de química hidrogel-tejido existente no lo hace. En algunas modalidades, para permitir la inclusión del producto de la

amplificación en la configuración tejido-hidrogel, están comprendidos en la etapa de amplificación (por ejemplo, RCA) nucleótidos modificados con amina, funcionalizados con un resto de acrilamida mediante el uso de ésteres de N-hidroxisuccinimida del ácido acrílico, y copolimerizados con monómeros de acrilamida para formar un hidrogel.

5 En algunas modalidades, la plantilla para RCA puede comprender el analito diana, o una parte de este, donde el analito diana es un ácido nucleico, o puede proporcionarse o generarse como un indicador, o un marcador, para el analito. Como se indicó anteriormente, pueden utilizarse muchos ensayos para la detección de numerosos analitos diferentes, que usan un sistema de detección basado en RCA, por ejemplo, donde la señal se proporciona al generar un producto de RCA a partir de una plantilla para RCA circular que se proporciona o genera en el ensayo, y el producto de RCA se detecta para detectar el analito. Por tanto, el producto de RCA puede considerarse como un indicador que se detecta para detectar el analito diana. Sin embargo, la plantilla para RCA también puede considerarse un indicador para el analito diana; el producto de RCA se genera basado en la plantilla para RCA y comprende copias complementarias de la plantilla para RCA. La plantilla para RCA determina la señal que se detecta, y por tanto, es indicativa del analito diana. Como se describirá con más detalle más abajo, la plantilla para RCA puede ser una sonda, o una parte o componente de una sonda, o puede generarse a partir de una sonda, o puede ser un componente de un ensayo de detección (por ejemplo, un reactivo en un ensayo de detección), que se usa como indicador para el ensayo, o una parte de un indicador, o sistema de generación de señales. La plantilla para RCA usada para generar el producto de RCA puede ser por tanto una molécula de ácido nucleico indicadora circular (por ejemplo, circularizada), específicamente de cualquier ensayo de detección basado en RCA que usa o genera un ácido nucleico circular como indicador para el ensayo.

En algunas modalidades, un producto en la presente descripción incluye una molécula o un complejo generado en una serie de reacciones, por ejemplo, hibridación, ligadura, extensión, replicación, transcripción/transcripción inversa, y/o amplificación (por ejemplo, amplificación por círculo rodante), en cualquier combinación adecuada. Por ejemplo, un producto que comprende una secuencia diana para una sonda descrita en la presente descripción puede ser un complejo de hibridación formado por un ácido nucleico celular en una muestra y una sonda de ácido nucleico añadida exógenamente. La sonda de ácido nucleico añadida exógenamente puede comprender un saliente que no se hibrida con el ácido nucleico celular pero se hibrida con otra sonda. La sonda de ácido nucleico añadida exógenamente puede ligarse opcionalmente a una molécula de ácido nucleico celular u otra molécula de ácido nucleico exógena. En otros ejemplos, un producto que comprende una secuencia diana para una sonda descrita en la presente descripción puede ser un producto de RCA de una sonda o conjunto de sondas circularizables que se hibrida con una molécula de ácido nucleico celular (por ejemplo, ADN genómico o ARNm) o producto de este (por ejemplo, un transcrito tal como ADNc, o un producto de ligadura con plantilla de dos sondas). En otros ejemplos, un producto que comprende una secuencia diana para una sonda (por ejemplo, una sonda marcada de manera detectable) descrita en la presente descripción puede ser una sonda (por ejemplo, una sonda intermedia tal como una sonda en forma de L) que se hibrida con un producto de RCA. La sonda (por ejemplo, sonda intermedia) puede comprender un saliente que no se hibrida con el producto de RCA sino que se hibrida con otra sonda. La sonda puede ligarse opcionalmente a una molécula de ácido nucleico celular u otra sonda, por ejemplo, una sonda de anclaje que se hibrida con el producto de RCA.

40 C. Secuencias diana

Una secuencia diana para una sonda descrita en la presente descripción puede estar comprendida en cualquier analito descrito en la presente descripción, lo que incluye un analito endógeno (por ejemplo, un ácido nucleico viral o celular), un agente de marcaje, o un producto de un analito endógeno y/o un agente de marcaje.

En algunos aspectos, una o más de las secuencias diana incluyen uno o más códigos de barras, por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más códigos de barras. Los códigos de barras pueden resolver espacialmente los componentes moleculares que se encuentran en muestras biológicas, por ejemplo, dentro de una célula o una muestra de tejido. Un código de barras puede unirse a un analito o a otro resto o estructura de manera reversible o irreversible. Un código de barras puede añadirse, por ejemplo, a un fragmento de una muestra de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) antes o durante la secuenciación de la muestra. Los códigos de barras pueden permitir la identificación y/o cuantificación de lecturas de secuenciación individuales (por ejemplo, un código de barras puede ser o puede incluir un identificador molecular único o "UMI"). En algunos aspectos, un código de barras comprende aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o más de 30 nucleótidos.

En algunas modalidades, un código de barras incluye dos o más subcódigos de barras que funcionan juntos como un único código de barras. Por ejemplo, un código de barras de polinucleótidos puede incluir dos o más secuencias polinucleotídicas (por ejemplo, subcódigos de barras) que están separadas por una o más secuencias que no son de código de barras. En algunas modalidades, el uno o más códigos de barras también pueden proporcionar una plataforma para dirigirse a funcionalidades, tales como oligonucleótidos, conjugados oligonucleótido-anticuerpo, conjugados oligonucleótido-estreptavidina, oligonucleótidos modificados, purificación por afinidad, restos detectables, enzimas, enzimas para ensayos de detección u otras funcionalidades, y/o para la detección e identificación del polinucleótido.

65

En cualquiera de las modalidades anteriores, los códigos de barras (por ejemplo, secuencias de código de barras primarias y/o secundarias) pueden analizarse (por ejemplo, detectarse o secuenciarse) mediante el uso de cualquier método o técnica adecuados, lo que incluye los descritos en la presente descripción, tales como sondeo secuencial por ARN de dianas (SPOT por ARN), hibridación *in situ* fluorescente secuencial (seqFISH), hibridación *in situ* fluorescente de molécula única (smFISH), hibridación *in situ* con fluorescencia resistente a errores multiplexada (MERFISH), secuenciación *in situ*, secuenciación basada en hibridación *in situ* (HybISS), secuenciación dirigida *in situ*, secuenciación fluorescente *in situ* (FISSEQ), secuenciación por síntesis (SBS), secuenciación por ligadura (SBL), secuenciación por hibridación (SBH), o mapeo de lectura de amplicones de transcritos resueltos espacialmente (STARmap). En cualquiera de las modalidades anteriores, los métodos proporcionados en la presente descripción pueden incluir analizar los códigos de barras mediante hibridación secuencial y detección con una pluralidad de sondas marcadas (por ejemplo, oligos de detección).

En algunas modalidades, en un método de secuenciación de códigos de barras, las secuencias de código de barras se detectan para la identificación de otras moléculas, lo que incluye moléculas de ácido nucleico (ADN o ARN) más largas que las secuencias de código de barras en sí mismas, por el contrario a la secuenciación directa de las moléculas de ácido nucleico más largas. En algunas modalidades, una secuencia de código de barras de N-mer comprende una complejidad 4^N dada una lectura de secuenciación de N bases, y puede requerirse una lectura de secuenciación mucho más corta para la identificación molecular en comparación con los métodos de secuenciación sin código de barras tales como la secuenciación directa. Por ejemplo, pueden identificarse 1024 especies moleculares mediante el uso de una secuencia de código de barras de 5 nucleótidos ($4^5=1024$), mientras que los códigos de barras de 8 nucleótidos pueden usarse para identificar hasta 65 536 especies moleculares, un número mayor que el número total de genes distintos en el genoma humano. En algunas modalidades, se detectan las secuencias de código de barras contenidas en las sondas o productos de RCA, en lugar de las secuencias endógenas, que puede ser una lectura eficiente en términos de información por ciclo de secuenciación. Debido a que las secuencias de código de barras están predeterminadas, también pueden diseñarse para caracterizar mecanismos de detección y corrección de errores, ver, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos 20190055594 y la publicación de patente de Estados Unidos 20210164039.

III. Sondas de ácido nucleico

En la presente descripción se describen en algunos aspectos sondas y/o conjuntos de sondas de ácido nucleico que se introducen en una célula o se usan de cualquier otra manera para entrar en contacto con una muestra biológica tal como una muestra de tejido. Las sondas pueden comprender cualquiera de una variedad de entidades que pueden hibridarse con un ácido nucleico, típicamente mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick, tales como ADN, ARN, LNA, PNA, etc. La sonda de ácido nucleico contiene típicamente una secuencia de direccionamiento que es capaz de unirse directa o indirectamente a al menos una porción de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico es un ácido nucleico circular o se usa para generar un ácido nucleico circular que comprende una región de hibridación complementaria a un polinucleótido (por ejemplo, cebador para amplificación). La sonda de ácido nucleico puede ser capaz de unirse a un ácido nucleico diana específico (por ejemplo, un ARNm, u otros ácidos nucleicos como se analiza en la presente descripción). En algunas modalidades, las sondas de ácido nucleico pueden detectarse mediante el uso de un marcador detectable, y/o mediante el uso de sondas de ácido nucleico secundarias capaces de unirse a las sondas de ácido nucleico. En algunas modalidades, las sondas de ácido nucleico (por ejemplo, sondas primarias y/o sondas secundarias) son compatibles con una o más reacciones químicas y/o biológicas. Por ejemplo, una sonda de ácido nucleico descrita en la presente descripción puede servir como una plantilla o cebador para una polimerasa, una plantilla o sustrato para una ligasa, un sustrato para una reacción de química clic, y/o un sustrato para una nucleasa (por ejemplo, endonucleasa o exonucleasa para escisión o digestión).

En algunas modalidades, pueden ponerse en contacto más de un tipo de sondas de ácido nucleico primarias con una muestra, por ejemplo, simultánea o secuencialmente en cualquier orden adecuado, tal como en ciclos de hibridación con sondas/deshibridación secuenciales. En algunas modalidades, las sondas primarias pueden comprender sondas circulares y/o sondas circularizables (tales como sondas candado). En algunas modalidades, pueden ponerse en contacto más de un tipo de sondas de ácido nucleico secundarias con una muestra, por ejemplo, simultánea o secuencialmente en cualquier orden adecuado, tal como en ciclos de hibridación con sondas/deshibridación secuenciales. En algunas modalidades, las sondas secundarias pueden comprender sondas intermedias que se unen a un producto (por ejemplo, un producto de RCA) de una sonda primaria dirigida a un analito. En algunas modalidades, pueden ponerse en contacto más de un tipo de sondas de ácido nucleico de orden superior con una muestra, por ejemplo, simultánea o secuencialmente en cualquier orden adecuado, tal como en ciclos de hibridación con sondas/deshibridación secuenciales. En algunas modalidades, pueden ponerse en contacto más de un tipo de sondas de ácido nucleico marcadas de manera detectable con una muestra, por ejemplo, simultánea o secuencialmente en cualquier orden adecuado, tal como en ciclos de hibridación con sondas/deshibridación secuenciales. En algunas modalidades, las sondas marcadas de manera detectable pueden comprender sondas que se unen a una o más sondas primarias, una o más sondas secundarias, una o más sondas de orden superior, una o más sondas intermedias entre una sonda primaria/secundaria/de orden superior, y/o una o más sondas marcadas de manera detectable o que no pueden detectarse (por ejemplo, como en el caso de una reacción en cadena de hibridación (HCR), una reacción de ADN ramificado (ADNr), o similares). En algunas modalidades, al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 25, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 300, al menos 1000, al menos 3000, al menos 10 000, al menos

30 000, al menos 50 000, al menos 100 000, al menos 250 000, al menos 500 000, o al menos 1 000 000 sondas de ácidos nucleicos distinguibles (por ejemplo, sondas primarias, secundarias, de orden superior, y/o sondas marcadas de manera detectable) pueden ponerse en contacto con una muestra, por ejemplo, simultánea o secuencialmente en cualquier orden adecuado. Entre cualquiera de las etapas de entrada en contacto con la sonda descritas en la presente descripción, el método puede comprender una o más reacciones intervinientes y/o etapas de procesamiento, tales como modificaciones de un ácido nucleico diana, modificaciones de una sonda o producto de esta (por ejemplo, mediante hibridación, ligadura, extensión, amplificación, escisión, digestión, migración ramificada, reacción de intercambio de cebadores, reacción de química clic, reticulación, unión de un marcador detectable, restos fotorreactivos activantes, etc.), eliminación de una sonda o producto de esta (por ejemplo, escindir una porción de una sonda y/o deshibridar toda la sonda), modificaciones de la señal (por ejemplo, inactivación, enmascaramiento, fotoblanqueo, potenciación de la señal (por ejemplo, mediante FRET), amplificación de la señal, etc.), eliminación de la señal (por ejemplo, escindir o inactivar permanentemente un marcador detectable), reticulación, desreticulación, y/o detección de la señal.

La secuencia de unión a la diana (también denominada a veces la región/secuencia de direccionamiento o la región/secuencia de reconocimiento) de una sonda puede colocarse en cualquier lugar dentro de la sonda. Por ejemplo, la secuencia de unión a la diana de una sonda primaria que se une a un ácido nucleico diana puede estar en dirección 5' o 3' con respecto a cualquier secuencia de código de barras en la sonda primaria. Igualmente, la secuencia de unión a la diana de una sonda secundaria (que se une a una sonda primaria o complemento o producto de esta) puede estar en dirección 5' o 3' con respecto a cualquier secuencia de código de barras en la sonda secundaria. En algunas modalidades, la secuencia de unión a la diana puede comprender una secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de un ácido nucleico diana. En algunas modalidades, las porciones pueden ser al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % complementarias.

La secuencia de unión a la diana de una sonda de ácido nucleico primaria puede determinarse con referencia a un ácido nucleico diana (por ejemplo, un ARN celular o un oligonucleótido indicador de un agente de marcaje para un analito celular) que está presente o se sospecha que está presente en una muestra. En algunas modalidades, puede usarse más de una secuencia de unión a la diana para identificar un analito particular que comprende o se asocia con un ácido nucleico diana. La más de una secuencia de unión a la diana puede estar en la misma sonda o en sondas diferentes. Por ejemplo, pueden usarse múltiples sondas, secuencial y/o simultáneamente, que pueden unirse a (por ejemplo, hibridarse con) diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana. En otros ejemplos, una sonda puede comprender secuencias de unión a la diana que pueden unirse a secuencias de ácidos nucleicos diana diferentes, por ejemplo, diversas secuencias de intrones y/o exones del mismo gen (para detectar variantes de corte y empalme, por ejemplo), o secuencias de diferentes genes, por ejemplo, para detectar un producto que comprende las diferentes secuencias de ácidos nucleicos diana, tal como una reorganización del genoma (por ejemplo, inversión, transposición, translocación, inserción, delección, duplicación, y/o amplificación).

Después de entrar en contacto las sondas de ácido nucleico con una muestra, las sondas pueden detectarse directamente al determinar los marcadores detectables (si están presentes), y/o detectarse mediante el uso de una o más otras sondas que se unen directa o indirectamente a las sondas o productos de estas. La una o más otras sondas pueden comprender un marcador detectable. Por ejemplo, una sonda de ácido nucleico primaria puede unirse a un ácido nucleico diana en la muestra, y puede introducirse una sonda de ácido nucleico secundaria para unirse a un producto de amplificación de la sonda de ácido nucleico primaria, donde la sonda de ácido nucleico secundaria o un producto de esta puede detectarse mediante el uso de sondas marcadas de manera detectable. También pueden usarse sondas de orden superior que se unen directa o indirectamente a la sonda de ácido nucleico secundaria o producto de esta, y las sondas de orden superior o productos de esta pueden detectarse mediante el uso de sondas marcadas de manera detectable.

En algunas modalidades, la detección puede ser espacial, por ejemplo, en dos o tres dimensiones. En algunas modalidades, la detección puede ser cuantitativa, por ejemplo, puede determinarse la cantidad o concentración de una sonda de ácido nucleico primaria (y de un ácido nucleico diana). En algunas modalidades, las sondas primarias, sondas secundarias, sondas de orden superior, y/o sondas marcadas de manera detectable pueden comprender cualquiera de una variedad de entidades capaces de hibridar un ácido nucleico, por ejemplo, ADN, ARN, LNA y/o PNA, etc., en dependencia de la aplicación.

Una sonda de ácido nucleico secundaria (por ejemplo, sonda intermedia) puede contener una secuencia de reconocimiento capaz de unirse o hibridarse con una sonda de ácido nucleico primaria o un producto de esta, por ejemplo, en una secuencia de código de barras o porción(es) de esta de la sonda de ácido nucleico primaria, o en un complemento de la secuencia de código de barras o porción(es) de esta (por ejemplo, en el caso de la sonda secundaria que se hibrida con un producto de RCA de la sonda primaria). En algunas modalidades, una sonda de ácido nucleico secundaria puede unirse a una combinación de secuencias de código de barras (que pueden ser continuas o separadas entre sí) en una sonda de ácido nucleico primaria o un producto de esta. En algunas modalidades, la unión es específica, o la unión puede ser de manera que una secuencia de reconocimiento se une preferentemente o se hibrida con solo una de las secuencias de código de barras o complementos de estas que están

presentes. La sonda de ácido nucleico secundaria puede contener además uno o más marcadores detectables. Si se usa más de una sonda de ácido nucleico secundaria, los marcadores detectables pueden ser el mismo o diferentes.

Las secuencias de reconocimiento pueden ser de cualquier longitud, y múltiples secuencias de reconocimiento en la misma o en diferentes sondas de ácido nucleico secundarias pueden ser de la misma longitud o de diferentes longitudes. Si se usa más de una secuencia de reconocimiento, las secuencias de reconocimiento pueden tener independientemente la misma longitud o diferentes longitudes. Por ejemplo, la secuencia de reconocimiento puede ser de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, o al menos 50 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia de reconocimiento puede ser de no más de 48, no más de 40, no más de 32, no más de 24, no más de 16, no más de 12, no más de 10, no más de 8, o no más de 6 nucleótidos de longitud. Las combinaciones de cualquiera de estas también son posibles, por ejemplo, la secuencia de reconocimiento puede tener una longitud de entre 5 y 8, entre 6 y 12, o entre 7 y 15 nucleótidos, etc. En una modalidad, la secuencia de reconocimiento es de la misma longitud que una secuencia de código de barras o complemento de esta de una sonda de ácido nucleico primaria o un producto de esta. En algunas modalidades, la secuencia de reconocimiento puede ser al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o al menos 100 % complementaria a la secuencia de código de barras o complemento de esta.

En algunas modalidades, una sonda de ácido nucleico, tal como una sonda de ácido nucleico primaria o secundaria, también puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más, 20 o más, 32 o más, 40 o más, o 50 o más secuencias de código de barras. Las secuencias de código de barras pueden colocarse en cualquier lugar dentro de la sonda de ácido nucleico. Si está presente más de una secuencia de código de barras, las secuencias de código de barras pueden colocarse próximas entre sí, y/o intercalarse con otras secuencias. En algunas modalidades, dos o más de las secuencias de código de barras también pueden solaparse al menos parcialmente. En algunas modalidades, dos o más de las secuencias de código de barras en la misma sonda no se solapan. En algunas modalidades, todas las secuencias de código de barras en la misma sonda se separan entre sí por al menos un enlace fosfodiéster (por ejemplo, pueden ser inmediatamente adyacentes entre sí, pero no se solapan), tal como separadas por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos.

Las secuencias de código de barras, si están presentes, pueden ser de cualquier longitud. Si se usa más de una secuencia de código de barras, las secuencias de código de barras pueden tener independientemente la misma longitud o diferentes longitudes, tal como al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 50 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia de código de barras puede tener no más de 120, no más de 112, no más de 104, no más de 96, no más de 88, no más de 80, no más de 72, no más de 64, no más de 56, no más de 48, no más de 40, no más de 32, no más de 24, no más de 16, o no más de 8 nucleótidos de longitud. Las combinaciones de cualquiera de estas también son posibles, por ejemplo, la secuencia de código de barras puede tener entre 5 y 10 nucleótidos, entre 8 y 15 nucleótidos, etc.

La secuencia de código de barras puede ser arbitraria o aleatoria. En ciertos casos, las secuencias de código de barras se eligen para reducir o minimizar la homología con otros componentes en una muestra, por ejemplo, de manera que las secuencias de código de barras no se unan o hibriden en sí mismas con otros ácidos nucleicos que se sospecha que están dentro de la célula u otra muestra. En algunas modalidades, entre una secuencia de código de barras en particular y otra secuencia (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico celular en una muestra u otras secuencias de código de barras en sondas añadidas a la muestra), la homología puede ser menor del 10 %, menor del 8 %, menor del 7 %, menor del 6 %, menor del 5 %, menor del 4 %, menor del 3 %, menor del 2 %, o menor del 1 %. En algunas modalidades, la homología puede ser menor que 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, o 2 bases, y en algunas modalidades, las bases son bases consecutivas.

En algunas modalidades, el número de secuencias de código de barras distintas en una población de sondas de ácido nucleico es menor que el número de dianas distintas (por ejemplo, analitos de ácidos nucleicos y/o analitos de proteínas) de las sondas de ácidos nucleicos, y aun así las distintas dianas pueden identificarse de manera única entre sí, por ejemplo, al codificar una sonda con una combinación diferente de secuencias de código de barras. Sin embargo, no necesitan usarse todas las combinaciones posibles de un conjunto dado de secuencias de código de barras. Por ejemplo, cada sonda puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, etc. o más secuencias de código de barras. En algunas modalidades, una población de sondas de ácido nucleico puede contener cada una el mismo número de secuencias de código de barras, aunque en otros casos, puede haber números diferentes de secuencias de código de barras presentes en las diversas sondas.

Como ejemplo ilustrativo, una primera sonda puede contener una primera secuencia de unión a la diana, una primera secuencia de código de barras, y una segunda secuencia de código de barras, mientras que una segunda sonda diferente puede contener una segunda secuencia de unión a la diana (que es diferente de la primera secuencia de unión a la diana en la primera sonda), la misma primera secuencia de código de barras que en la primera sonda, pero una tercera secuencia de código de barras en lugar de la segunda secuencia de código de barras. Dichas sondas

pueden distinguirse de esta manera al determinar las diversas combinaciones de secuencias de código de barras presentes o asociadas con una sonda dada en una ubicación dada en una muestra.

5 En algunas modalidades, las sondas de ácido nucleico descritas en la presente descripción pueden generarse mediante el uso de solo 2 o solo 3 de las 4 bases, tal como dejar fuera todas las "G" y/o dejar fuera todas las "C" dentro de la sonda. Las secuencias que carecen de "G" o "C" pueden formar muy pocas estructuras secundarias, y pueden contribuir a una hibridación más uniforme y rápida en ciertas modalidades.

10 En algunas modalidades, una sonda de ácido nucleico descrita en la presente descripción puede contener un marcador detectable tal como un fluoróforo. En algunas modalidades, una o más sondas de una pluralidad de sondas de ácido nucleico usadas en un ensayo pueden carecer de un marcador detectable, mientras que una o más otras sondas en la pluralidad comprenden cada una un marcador detectable seleccionado de una mezcla limitada de distintos marcadores detectables (por ejemplo, fluoróforos rojos, verdes, amarillos, y azules), y la ausencia del marcador detectable puede usarse como un "color" separado. Como tal, no se requieren marcadores detectables en todos los casos. En algunas modalidades, una sonda de ácido nucleico primaria (por ejemplo, una sonda candado) descrita en la presente descripción carece de un marcador detectable. Aunque puede incorporarse un marcador detectable en un producto de la amplificación de la sonda de ácido nucleico primaria, tal como mediante la incorporación de un nucleótido modificado en un producto de RCA de una sonda candado, el producto de la amplificación en algunas modalidades no se marca de manera detectable. En algunas modalidades, una sonda que se une a la sonda de ácido nucleico primaria o un producto de esta (por ejemplo, una sonda de ácido nucleico secundaria que se une a una secuencia de código de barras o complemento de esta en la sonda de ácido nucleico primaria o producto de esta) comprende un marcador detectable y puede usarse para detectar la sonda de ácido nucleico primaria o producto de esta. En algunas modalidades, una sonda de ácido nucleico secundaria descrita en la presente descripción carece de un marcador detectable, y puede usarse una sonda marcada de manera detectable que se une a la sonda de ácido nucleico secundaria o un producto de esta (por ejemplo, en una secuencia de código de barras o complemento de esta en la sonda de ácido nucleico secundaria o producto de esta) para detectar la segunda sonda de ácido nucleico o producto de esta. En algunas modalidades, las señales asociadas con las sondas marcadas de manera detectable pueden usarse para detectar una o más secuencias de código de barras en la sonda secundaria y/o una o más secuencias de código de barras en la sonda primaria, por ejemplo, mediante el uso de hibridación secuencial de sondas marcadas de manera detectable, secuenciación por ligadura, y/o secuenciación por hibridación. En algunas modalidades, las secuencias de código de barras (por ejemplo, en la sonda secundaria y/o en la sonda primaria) se usan para codificar de manera combinatoria una pluralidad de analitos de interés. Como tal, las señales asociadas con las sondas marcadas de manera detectable en ubicaciones particulares en una muestra biológica pueden usarse para generar firmas de señales distintas que corresponden cada una a un analito en la muestra, identificando de esta manera los analitos en las ubicaciones particulares, por ejemplo, para el análisis espacial *in situ* de la muestra.

40 En algunas modalidades, una sonda de ácido nucleico en la presente descripción comprende uno o más otros componentes, tales como una o más secuencias de unión al cebador (por ejemplo, para permitir la amplificación enzimática de sondas), secuencias de reconocimiento de enzimas (por ejemplo, para la escisión por endonucleasas), o similares. Los componentes de la sonda de ácido nucleico pueden disponerse en cualquier orden adecuado.

45 En algunos aspectos, los analitos son la diana de sondas primarias, que se codifican con código de barras a través de la incorporación de una o más secuencias de código de barras (por ejemplo, secuencias que pueden detectarse o "leerse" de cualquier otra manera) que están separadas de una secuencia en una sonda primaria que se une directa o indirectamente al analito diana. En algunos aspectos, las sondas primarias son a su vez la diana de sondas secundarias, que también se codifican con código de barras a través de la incorporación de una o más secuencias de código de barras que se separan de una secuencia de reconocimiento en una sonda secundaria que se une directa o indirectamente a una sonda primaria o un producto de esta. En algunas modalidades, una sonda secundaria puede unirse a una secuencia de código de barras en la sonda primaria. En algunas modalidades, una sonda secundaria puede unirse a un complemento de la secuencia de código de barras en un producto de RCA de la sonda primaria. En algunos aspectos, pueden usarse sondas terciarias y opcionalmente incluso sondas de orden superior para dirigirse a las sondas secundarias, por ejemplo, en una secuencia de código de barras o complemento de esta en una sonda secundaria o producto de esta. En algunas modalidades, las sondas terciarias y/o incluso sondas de orden superior pueden comprender una o más secuencias de código de barras y/o uno o más marcadores detectables. En algunas modalidades, una sonda terciaria es una sonda marcada de manera detectable que se hibrida con una secuencia de código de barras (o complemento de esta) de una sonda secundaria (o producto de esta). En algunas modalidades, a través de la detección de señales asociadas con sondas marcadas de manera detectable en una muestra, puede determinarse la ubicación de uno o más analitos en la muestra y la identidad del(de los) analito(s). En algunas modalidades, pueden analizarse *in situ* la presencia/ausencia, abundancia absoluta o relativa, una cantidad, un nivel, una concentración, una actividad, y/o una relación con otro analito de un analito en particular en la muestra.

65 En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan sondas, conjuntos de sondas y métodos de ensayo para acoplar la detección de ácidos nucleicos diana, la amplificación de señales (por ejemplo, a través de la amplificación de ácidos nucleicos tal como la RCA, y/o la hibridación de una pluralidad de sondas marcadas de manera detectable, tal como en reacciones en cadena de hibridación y similares), y la decodificación de los códigos de barras.

En algunos aspectos, una sonda primaria, una sonda secundaria, y/o una sonda de orden superior pueden seleccionarse del grupo que consiste en una sonda circular, una sonda circularizable, y una sonda lineal. En algunas modalidades, una sonda circular puede ser una que se circulariza previamente antes de la hibridación con un ácido nucleico diana y/o una o más otras sondas. En algunas modalidades, una sonda circularizable puede ser una que puede circularizarse tras la hibridación con un ácido nucleico diana y/o una o más otras sondas tales como un puente. En algunas modalidades, una sonda lineal puede ser una que comprende una secuencia de reconocimiento de la diana y una secuencia que no se hibrida con un ácido nucleico diana, tal como un saliente 5', un saliente 3', y/o un enlazador o espaciador (que puede comprender una secuencia de ácido nucleico o un resto que no es de ácido nucleico). En algunas modalidades, la secuencia (por ejemplo, el saliente 5', el saliente 3', y/o el enlazador o espaciador) no se hibrida con el ácido nucleico diana, sino que puede hibridarse entre sí y/o con una o más otras sondas, tales como sondas marcadas de manera detectable.

Los diseños específicos de sondas pueden variar en dependencia de la aplicación. Por ejemplo, una sonda primaria, una sonda secundaria, y/o una sonda de orden superior descrita en la presente descripción puede comprender una sonda candado que requiere rellenar los espacios para circularizarse tras la hibridación con una plantilla (por ejemplo, un ácido nucleico diana y/o una sonda tal como un puente), una sonda candado espaciada (por ejemplo, una que requiera rellenar los espacios para circularizarse tras la hibridación con una plantilla), una sonda en forma de L (por ejemplo, una que comprende una secuencia de reconocimiento de la diana y un saliente 5' o 3' después de la hibridación con un ácido nucleico diana o una sonda), una sonda en forma de U (por ejemplo, una que comprende una secuencia de reconocimiento de la diana, un saliente 5', y un saliente 3' tras la hibridación con un ácido nucleico diana o una sonda), una sonda en forma de V (por ejemplo, una que comprende al menos dos secuencias de reconocimiento de la diana y un enlazador o espaciador entre las secuencias de reconocimiento de la diana tras la hibridación con un ácido nucleico diana o una sonda), una sonda o conjunto de sondas para ligadura de proximidad (tal como las descritas en los documentos US 7,914,987 y US 8,580,504, y sondas para el ensayo de ligadura de proximidad (PLA) para la detección y cuantificación simultáneas de moléculas de ácido nucleico e interacciones proteína-proteína), o cualquiera de sus combinaciones adecuadas. En algunas modalidades, una sonda primaria, una sonda secundaria, y/o una sonda de orden superior descritas en la presente descripción, pueden comprender una sonda que se une a sí misma o a otra sonda mediante el uso de ligadura con plantilla de ADN y/o plantilla de ARN. En algunas modalidades, una sonda primaria, una sonda secundaria, y/o una sonda de orden superior descritas en la presente descripción, pueden ser una molécula de ADN y pueden comprender uno o más tipos de nucleótidos, nucleótidos modificados, y/o análogos de nucleótidos, tales como uno o más ribonucleótidos. En algunas modalidades, la ligadura puede ser una ligadura de ADN en una plantilla de ADN. En algunas modalidades, la ligadura puede ser una ligadura de ADN en una plantilla de ARN, y las sondas pueden comprender sondas de ligadura con plantilla de ARN. En algunas modalidades, una sonda primaria, una sonda secundaria, y/o una sonda de orden superior descritas en la presente descripción, pueden comprender una sonda o conjunto de sondas de tipo candado. En algunas modalidades, una sonda de ácido nucleico descrita en la presente descripción es parte de un conjunto de sondas SNAIL (ligadura intramolecular asistida por nucleótidos puente), tal como una descrita en los documentos US 2019/0055594 o US 2021/0164039. En algunas modalidades, una sonda de ácido nucleico descrita en la presente descripción es parte de un conjunto de sondas PLAYR (ensayo de ligadura de proximidad para ARN) tal como una descrita en el documento US 2016/0108458. En algunas modalidades, una sonda de ácido nucleico descrita en la presente descripción es parte de un conjunto de sondas PLISH (hibridación *in situ* de ligadura de proximidad), tal como una descrita en el documento US 2020/0224243. Puede usarse cualquier combinación adecuada de los diseños de sondas descritos en la presente descripción.

Puede usarse cualquier sonda o conjunto de sondas circularizables adecuado, o de hecho más generalmente moléculas indicadoras circularizables, para generar la plantilla para RCA que se usa para generar el producto de RCA. Por ejemplo, puede usarse una sonda o conjunto de sondas circularizables para generar un ácido nucleico circular que comprende una región de hibridación a la diana. La región de hibridación a la diana en el producto de RCA puede comprender una secuencia de identificación, tal como una secuencia de un analito de ácido nucleico o sonda a la que se hibrida la sonda o conjunto de sondas circularizables, o una secuencia de código de barras. La sonda o indicador circularizable (la plantilla para RCA) puede estar en forma de una molécula lineal que tiene extremos ligables que pueden circularizarse al unir los extremos juntos directa o indirectamente, por ejemplo, entre sí, o a los extremos respectivos de un oligonucleótido interviniente ("espacio") o a un extremo 3' extendido de la plantilla para RCA circularizable. Una plantilla circularizable también puede proporcionarse en dos o más partes, específicamente dos o más moléculas (por ejemplo, oligonucleótidos) que pueden unirse entre sí para formar un círculo. Cuando dicha plantilla para RCA es circularizable, se circulariza mediante ligadura antes de la RCA. La ligadura puede modelarse mediante el uso de una plantilla de ligadura, y en el caso de las sondas candado y de inversión molecular y similares como el analito diana puede proporcionar la plantilla para ligadura, o puede proporcionarse por separado. La plantilla para RCA circularizable (o parte o porción de la plantilla) comprenderá en sus respectivos extremos 3' y 5' regiones de complementariedad con las regiones complementarias afines correspondientes (o sitios de unión) en la plantilla para ligadura, que pueden ser adyacentes donde los extremos se ligan directamente entre sí, o no adyacentes, con una secuencia de "espacio" interviniente, donde tiene lugar la ligadura indirecta.

En el caso de las sondas candado, en una modalidad, los extremos de la sonda candado pueden acercarse entre sí mediante la hibridación a secuencias adyacentes en una molécula de ácido nucleico diana (tal como un analito diana), que actúa como una plantilla de ligadura, permitiendo por tanto que los extremos se ligen entre sí para formar una

molécula de ácido nucleico circular, permitiendo que la sonda candado circularizada actúe como una plantilla para una reacción de RCA. En un ejemplo de este tipo, las secuencias terminales de la sonda candado que se hibridan con la molécula de ácido nucleico diana serán específicas del analito diana en cuestión, y se replicarán repetidamente en el producto de RCA. Por lo tanto, pueden actuar como una secuencia marcadora indicativa de ese analito diana. En consecuencia, puede observarse que la secuencia marcadora en el producto de RCA puede ser equivalente a una secuencia presente en el propio analito diana. Alternativamente, puede proporcionarse una secuencia marcadora (por ejemplo, secuencia etiqueta o de código de barras) en las partes no complementarias con la diana de la sonda candado. En aún una modalidad adicional, la secuencia marcadora puede estar presente en el oligonucleótido espacio que se hibrida entre los respectivos extremos hibridados de la sonda candado, donde se hibridan con secuencias no adyacentes en la molécula diana. Dichas sondas candado de relleno de espacios son similares a las sondas de inversión molecular.

En algunas modalidades, pueden generarse moléculas de plantilla para RCA circulares similares mediante el uso de sondas de inversión molecular. Al igual que las sondas candado, estas también son típicamente moléculas de ácido nucleico lineales capaces de hibridarse con una molécula de ácido nucleico diana (tal como un analito diana) y circularizarse. Los dos extremos de la sonda de inversión molecular pueden hibridarse con la molécula de ácido nucleico diana en sitios que están próximos pero no directamente adyacentes entre sí, lo que da como resultado un espacio entre los dos extremos. El tamaño de este espacio puede variar de solo un único nucleótido en algunas modalidades, a espacios más grandes de 100 a 500 nucleótidos, o más largos, en otras modalidades. En consecuencia, es necesario suministrar una polimerasa y una fuente de nucleótidos, o un oligonucleótido de relleno de espacios adicional, para rellenar el espacio entre los dos extremos de la sonda de inversión molecular, de manera que pueda circularizarse.

Al igual que con la sonda candado, las secuencias terminales de la sonda de inversión molecular que se hibridan con la molécula de ácido nucleico diana, y la secuencia entre ellas, serán específicas para el analito diana en cuestión, y se replicarán repetidamente en el producto de RCA. Por lo tanto, pueden actuar como una secuencia marcadora indicativa de ese analito diana. Alternativamente, puede proporcionarse una secuencia marcadora (por ejemplo, secuencia etiqueta o de código de barras) en las partes no complementarias con la diana de la sonda de inversión molecular.

En algunas modalidades, las sondas descritas en la presente descripción pueden ser sondas invasoras, por ejemplo, para generar un ácido nucleico circular tal como una sonda circularizada. Dichas sondas son de particular utilidad en la detección de polimorfismos de un solo nucleótido. El método de detección de la presente descripción puede usarse, por lo tanto, en la detección de un polimorfismo de un solo nucleótido, o de hecho cualquier variante de base, en la secuencia de ácido nucleico diana. Las sondas para su uso en dicho método pueden diseñarse de manera que el extremo ligable 3' de la sonda sea complementario y capaz de hibridarse con el nucleótido en la molécula diana que es de interés (la variante de nucleótido), y el nucleótido en el extremo 3' de la secuencia adicional 5' en el extremo 5' de la sonda o en el extremo 5' de otra parte diferente de la sonda es complementario al dicho mismo nucleótido, pero se impide que se hibride con el mismo mediante un extremo ligable 3' (por ejemplo, es un nucleótido desplazado). La escisión de la sonda para eliminar la secuencia adicional proporciona un extremo ligable 5', que puede ligarse al extremo ligable 3' de la sonda o parte de la sonda si el extremo ligable 3' se hibrida correctamente a (por ejemplo, es complementario a) la molécula de ácido nucleico diana. Las sondas diseñadas de acuerdo con este principio proporcionan un grado elevado de discriminación entre diferentes variantes en la posición de interés, ya que solo las sondas en las que el extremo ligable 3' es complementario al nucleótido en la posición de interés pueden participar en una reacción de ligadura. En una modalidad, la sonda se proporciona en una sola parte, y los extremos ligables 3' y 5' se proporcionan por la misma sonda. En algunas modalidades, una sonda invasora es una sonda candado (un candado invasor o "iLock"), por ejemplo, como se describió en Krzywkowski y otros, *Nucleic Acids Research* 45, e161, 2017 y el documento US 2020/0224244.

Otros tipos de sonda que dan como resultado moléculas circulares que pueden detectarse por RCA y que comprenden una secuencia del analito diana o un complemento de esta incluyen sondas de tipo selector descritas en el documento US20190144940, que comprenden secuencias capaces de dirigir la escisión de una molécula de ácido nucleico diana (por ejemplo, un analito diana) para liberar un fragmento que comprende una secuencia diana del analito diana y secuencias capaces de servir como plantilla para la circularización y la ligadura del fragmento. El documento WO 2016/016452, describe sondas que comprenden una secuencia 3' capaz de hibridarse con una molécula de ácido nucleico diana (por ejemplo, un analito diana) y que actúan como un cebador para la producción de un complemento de una secuencia diana dentro de la molécula de ácido nucleico diana (por ejemplo, mediante la extensión modelada con diana del cebador), y una secuencia interna capaz de servir como plantilla para la circularización y la ligadura de la sonda extendida que comprende el complemento inverso de la secuencia diana dentro del analito diana y una porción de la sonda. En el caso de ambas de dichas sondas, las secuencias diana o complementos de estas se incorporan en una molécula circularizada que actúa como la plantilla para que la reacción de RCA genere el producto de RCA, que consecuentemente comprende repeticiones concatenadas de dicha secuencia diana. En algunas modalidades, dicha secuencia diana puede actuar como, o puede comprender, una secuencia marcadora dentro del producto de RCA indicativa del analito diana en cuestión. Alternativamente, puede proporcionarse una secuencia marcadora (por ejemplo, secuencia etiqueta o de código de barras) en las partes no complementarias con la diana de las sondas.

En algunas modalidades, una sonda de ácido nucleico descrita en la presente descripción puede ensamblarse previamente a partir de múltiples componentes, por ejemplo, antes de entrar en contacto la sonda de ácido nucleico con un ácido nucleico diana o una muestra. En algunas modalidades, una sonda de ácido nucleico descrita en la presente descripción puede ensamblarse durante y/o después de entrar en contacto un ácido nucleico diana o una muestra con múltiples componentes. En algunas modalidades, una sonda de ácido nucleico descrita en la presente descripción se ensambla *in situ* en una muestra. En algunas modalidades, los múltiples componentes pueden ponerse en contacto con un ácido nucleico diana o una muestra en cualquier orden adecuado y cualquier combinación adecuada. Por ejemplo, un primer componente y un segundo componente pueden ponerse en contacto con un ácido nucleico diana, para permitir la unión entre los componentes y/o la unión entre el primer y/o segundo componentes con el ácido nucleico diana. Opcionalmente, puede realizarse una reacción que implica uno o ambos componentes y/o el ácido nucleico diana, entre los componentes, y/o entre uno o ambos componentes y el ácido nucleico diana, tal como hibridación, ligadura, extensión y/o amplificación por cebador, escisión química o enzimática, química clic, o cualquiera de sus combinaciones. En algunas modalidades, puede añadirse un tercer componente antes, durante, o después de la reacción. En algunas modalidades, puede añadirse un tercer componente antes, durante, o después de entrar en contacto la muestra con el primer y/o segundo componentes. En algunas modalidades, el primer, segundo y tercer componentes pueden ponerse en contacto con la muestra en cualquier combinación adecuada, secuencial o simultáneamente. En algunas modalidades, la sonda de ácido nucleico puede ensamblarse *in situ* de manera escalonada, cada etapa con la adición de uno o más componentes, o en un proceso dinámico donde todos los componentes se ensamblan juntos. Pueden realizarse una o más etapas de eliminación, por ejemplo, mediante el lavado de la muestra tal como en condiciones rigurosas, en cualquier punto durante el proceso de ensamble para eliminar o desestabilizar los componentes y/o productos intermedios no deseados en ese punto y aumentar la posibilidad de un ensamble de sonda preciso y la unión específica a la diana de la sonda ensamblada.

25 IV. Amplificación por círculo rodante *in situ* sincronizada

A. Amplificación por círculo rodante (RCA)

En algunas modalidades, una sonda descrita en la presente descripción se amplifica a través de la amplificación por círculo rodante. En algunas modalidades, las sondas primarias, tales como una sonda candado o un conjunto de sondas que comprende una sonda candado, contienen uno o más códigos de barras. Por ejemplo, la sonda o conjunto de sondas para la amplificación (por ejemplo, como se describió en la Sección III) son un ácido nucleico circular o se usan para generar un ácido nucleico circular que comprende una región de hibridación a la diana y una región de hibridación complementaria a un polinucleótido. En algunas modalidades, los códigos de barras se unen mediante sondas primarias de detección, que no necesitan ser fluorescentes, pero que incluyen una porción de unión a la diana (*por ejemplo*, para hibridarse con una o más sondas primarias) y múltiples otros códigos de barras (*por ejemplo*, códigos de barras secundarios, frente a los códigos de barras primarios en las sondas primarias). En algunas modalidades, los códigos de barras de las sondas primarias de detección son la diana de oligonucleótidos de detección marcados de manera detectable, tales como oligos marcados con fluorescencia. En algunas modalidades, se usan uno o más esquemas de descodificación para descodificar las señales, tales como la fluorescencia, para la determinación de la secuencia. Esquemas de descodificación ilustrativos se describen en *Enget* y otros, "Transcriptome-scale Super-Resolved Imaging in Tissues by RNA SeqFISH+", *Nature* 568(7751):235-239 (2019); Chen y otros, "Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells", *Science*; 348(6233):aa6090 (2015); los documentos US 10,457,980 B2; US 2016/0369329 A1; WO 2018/026873 A1; y US 2017/0220733 A1. En algunas modalidades, estos ensayos permiten la amplificación de la señal, la descodificación combinatoria, y los esquemas de corrección de errores al mismo tiempo.

En algunas modalidades, el método comprende usar un constructo circular o circularizable hibridado al ácido nucleico de interés para generar un ácido nucleico circular. En algunas modalidades, la RCA comprende una RCA lineal. En algunas modalidades, la RCA comprende una RCA ramificada. En algunas modalidades, la RCA comprende una RCA dendrítica. En algunas modalidades, la RCA comprende cualquier combinación de las anteriores. En algunas modalidades, el ácido nucleico circular es un constructo formado mediante el uso de ligadura. En algunas modalidades, el constructo circular se forma mediante el uso de la extensión del cebador por plantilla seguida de ligadura. En algunas modalidades, el constructo circular se forma al proporcionar un inserto entre los extremos a ligar. En algunas modalidades, el constructo circular se forma mediante el uso de una combinación de cualquiera de los anteriores. En algunas modalidades, la ligadura es una ligadura con plantilla ADN-ADN. En algunas modalidades, la ligadura es una ligadura con plantilla ARN-ARN. En el documento US 2020/0224244 se describen métodos y sondas ilustrativos para la ligadura con plantilla ARN. En algunas modalidades, la ligadura es una ligadura con plantilla ADN-ARN. En algunas modalidades, se proporciona un puente como plantilla para la ligadura.

En algunas modalidades, una sonda descrita en la presente descripción (por ejemplo, una sonda candado) puede comprender una aleta 5' que puede reconocerse por una enzima de escisión específica de la estructura, por ejemplo, una enzima capaz de reconocer la unión entre el saliente 5' monocatenario y una doble cadena de ADN, y escindir el saliente monocatenario. Se debe entender que la estructura ramificada de tres hebras que es el sustrato para la enzima de escisión específica de la estructura puede formarse por el extremo 5' de una parte de la sonda y el extremo 3' de otra parte de la sonda cuando ambas se han hibridado con la molécula de ácido nucleico diana, así como también por

los extremos 5' y 3' de una sonda de una parte. Las enzimas adecuadas para dicha escisión incluyen endonucleasas Flap (FENS), que son una clase de enzimas que tienen actividad endonucleolítica y que son capaces de catalizar la escisión hidrolítica del enlace fosfodiéster en la unión del ADN monocatenario y bicatenario. Por tanto, en algunas modalidades, la escisión de la secuencia adicional en dirección 5' con respecto al primer sitio de unión específico de la diana se realiza mediante una enzima de escisión específica de la estructura, por ejemplo, una endonucleasa Flap. Las endonucleasas Flap adecuadas se describen en Ma y otros, 2000. *JBC* 275, 24693-24700 y en el documento US 2020/0224244, y puede incluir *P. furiosus* (Pfu), *A. fulgidus* (Afu), *M. jannaschii* (Mja) o *M. thermoautotrophicum* (Mth). En otras modalidades, una enzima capaz de reconocer y degradar un oligonucleótido monocatenario que tiene un extremo 5' libre puede usarse para escindir una secuencia adicional (aleta 5') de una estructura como se describió anteriormente. Por tanto, puede usarse una enzima que tiene actividad nucleasa 5' para escindir una secuencia adicional 5'. Dicha actividad nucleasa 5' puede ser actividad exonucleasa 5' y/o endonucleasa 5'. Una enzima nucleasa 5' es capaz de reconocer un extremo 5' libre de un oligonucleótido monocatenario y degradar dicho oligonucleótido monocatenario. Una exonucleasa 5' degrada un oligonucleótido monocatenario que tiene un extremo 5' libre al degradar el oligonucleótido en mononucleótidos constituyentes a partir de su extremo 5'. Una actividad endonucleasa 5' puede escindir la secuencia aleta 5' internamente en uno o más nucleótidos. Además, una actividad nucleasa 5' puede tener lugar por la enzima que atraviesa el oligonucleótido monocatenario a una región de doble cadena una vez que ha reconocido el extremo 5' libre, y escindir la región monocatenaria en nucleótidos constituyentes más grandes (por ejemplo, dinucleótidos o trinucleótidos), o escindir la región monocatenaria 5' completa, por ejemplo, como se describió en Lyamichev y otros, 1999. *PNAS* 96, 6143-6148, para la ADN polimerasa Taq y la nucleasa 5' de esta. Las enzimas preferidas que tienen actividad nucleasa 5' incluyen la exonucleasa VIII, o una enzima ADN polimerasa nativa o recombinante de *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* o *Thermus flavus*, o el dominio nucleasa de las mismas.

Después de la formación del ácido nucleico circular, en algunos casos, se añade un cebador para la amplificación. En otros casos, el cebador para la amplificación se añade con las sondas primarias y/o secundarias. En algunas modalidades, el ácido nucleico circular comprende una región de hibridación a la diana (por ejemplo, para hibridarse con un analito de ácido nucleico tal como ARNm) y una región de hibridación que es complementaria al polinucleótido (por ejemplo, cebador para la amplificación) o una porción de este. En algunos casos, el cebador para la amplificación también puede ser complementario al ácido nucleico diana y a la sonda candado (por ejemplo, una sonda SNAIL). En algunas modalidades, se realiza una etapa de lavado para eliminar cualesquiera sondas, cebadores, etc. no unidos. En algunas modalidades, el lavado es un lavado riguroso. Las etapas de lavado pueden realizarse en cualquier punto durante el proceso para eliminar las sondas unidas de manera no específica, sondas que se han ligado, etc.

En algunos casos, tras la adición de una ADN polimerasa en presencia de precursores de dNTP apropiados y de otros cofactores, el cebador para la amplificación se extiende mediante la replicación de múltiples copias de la plantilla. La etapa de amplificación puede utilizar la amplificación isotérmica o la amplificación no isotérmica. En algunas modalidades, después de la formación del complejo de hibridación y cualquier circularización subsecuente (tal como la ligadura de, por ejemplo, una sonda candado) la sonda circular se amplifica por círculo rodante para generar un producto de RCA (por ejemplo, amplicón) que contiene múltiples copias del circular.

Ejemplos adecuados de ADN polimerasas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a: las enzimas ADN polimerasa I de *E. coli*, ADN polimerasa Bsu, ADN polimerasa Bst, ADN polimerasa Taq, ADN polimerasa VENT™, ADN polimerasa DEEPVENT™, ADN polimerasa LongAmp® Taq, ADN polimerasa LongAmp® Hot Start Taq, ADN polimerasa Crimson LongAmp® Taq, ADN polimerasa Crimson Taq, ADN polimerasa OneTaq®, ADN polimerasa OneTaq® Quick-Load®, ADN polimerasa Hemo KlenTaq®, ADN polimerasa REDTaq®, ADN polimerasa Phusion®, ADN polimerasa Phusion® de alta fidelidad, ADN polimerasa Pfx Platinum, ADN polimerasa Pfx AccuPrime, ADN polimerasa Phi29, fragmento de Klenow, ADN polimerasa Pwo, ADN polimerasa Pfu, ADN polimerasa T4 y ADN polimerasa T7.

En algunas modalidades, los productos de la amplificación por círculo rodante se generan mediante el uso de una polimerasa seleccionada del grupo que consiste en ADN polimerasa Phi29, ADN polimerasa similar a Phi29, ADN polimerasa M2, ADN polimerasa B103, ADN polimerasa GA-1, polimerasa phi-PRD1, ADN polimerasa Vent, ADN polimerasa Deep Vent, (exo)ADN polimerasa Vent, ADN polimerasa KlenTaq, ADN polimerasa I, fragmento de Klenow de ADN polimerasa I, ADN polimerasa III, ADN polimerasa T3, ADN polimerasa T4, ADN polimerasa T5, ADN polimerasa T7, polimerasa Bst, ADN polimerasa rBST, ADN polimerasa N29, ADN polimerasa TopoTaq, ARN polimerasa T7, ARN polimerasa SP6, ARN polimerasa T3, y una variante o derivado de estas.

Después de la amplificación, la secuencia del amplicón (por ejemplo, producto de RCA) o una porción de este, se determina o se analiza de cualquier otra manera, por ejemplo, mediante el uso de sondas marcadas de manera detectable y la obtención de imágenes. La secuenciación o análisis de los productos de la amplificación puede comprender secuenciación por hibridación, secuenciación por ligadura, y/o secuenciación fluorescente *in situ*, y/o en donde la hibridación *in situ* comprende hibridación *in situ* fluorescente secuencial. En algunos casos, se detecta una secuencia del producto de RCA mediante el uso, por ejemplo, de las sondas secundarias y de orden superior y de los oligonucleótidos de detección descritos en la presente descripción.

B. Composiciones y métodos para sincronizar la RCA

La sincronización de la RCA *in situ* puede proporcionar una serie de ventajas. Por ejemplo, las reacciones de RCA sincronizadas (por ejemplo, que comienzan la reacción al mismo tiempo) de sondas circularizadas dirigidas a analitos en diferentes ubicaciones en una sección de tejido pueden proporcionar productos de RCA de tamaño más homogéneo. En algunos aspectos, las reacciones de RCA sincronizadas pueden conducir a puntos de señal (para productos de RCA) de intensidad de señal y/o brillo homogéneos. En algunas modalidades, la sincronización conduce a menos puntos de señal oscuros y/o más puntos de señal brillantes para los productos de RCA. En algunas modalidades, cuando el tamaño del producto de RCA se vuelve más homogéneo, el tiempo de amplificación puede disminuirse, lo que hace que se detecten productos de RCA más pequeños de suficiente brillo. En algunas modalidades, a medida que el tamaño y el brillo del producto de RCA se vuelven más homogéneos en el mismo campo visual del microscopio, puede lograrse un tiempo de reacción de RCA de modo que hay pocos puntos de señal grandes (por ejemplo, incluso para genes altamente expresados) que podrían solaparse entre sí y/o enmascarar puntos de señal adyacentes más pequeños, mejorando por tanto los problemas de apilamiento óptico y permitiendo que los puntos vecinos se resuelvan mejor entre sí. En algunas modalidades, puede lograrse un tiempo de reacción de RCA de manera que hay pocos puntos de señal extremadamente brillantes que harían que los puntos relativamente oscuros se detectaran simultáneamente con los puntos brillantes. En algunos aspectos, las reacciones de RCA sincronizadas pueden dar como resultado al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, o al menos 80 % de productos de RCA con señales que cuando se detectan están dentro del 50 % del tamaño medio y/o la intensidad del pico media. En algunas modalidades, el tiempo de reacción de RCA puede lograrse de manera que puedan detectarse y analizarse tantos puntos de señal útiles como sea posible para detectar y cuantificar con precisión múltiples analitos presentes en una muestra biológica (por ejemplo, *in situ*). En algunos casos, al sincronizar el inicio de la RCA en la muestra biológica, puede ser más fácil distinguir las señales de la RCA de las señales de fondo (por ejemplo, ruido).

En algunos aspectos, en la presente descripción se proporciona un método para analizar una muestra biológica, que comprende: poner en contacto la muestra biológica con una mezcla de unión (por ejemplo, una mezcla de reacción de hibridación que permite que la pluralidad de complejos se hibriden con la pluralidad de ácidos nucleicos circulares). En algunas modalidades, la muestra biológica comprende una pluralidad de ácidos nucleicos circulares que comprenden cada uno una región de hibridación del cebador, la mezcla de unión comprende una pluralidad de complejos que comprenden cada uno una polimerasa unida a un cebador, en donde el cebador comprende una secuencia complementaria a la región de hibridación del cebador de uno o más ácidos nucleicos circulares, y se inhibe la actividad polimerasa de la polimerasa, permitiendo de esta manera que la pluralidad de complejos se hibriden con la pluralidad de ácidos nucleicos circulares. En algunas modalidades, el método comprende además poner en contacto la muestra biológica con una mezcla de reacción de extensión del cebador, por ejemplo, una mezcla de reacción de amplificación para la RCA. En algunas modalidades, la mezcla de reacción de extensión del cebador permite que la polimerasa extienda el cebador hibridado a la región de hibridación del cebador, sincronizando de esta manera la amplificación por círculo rodante de la pluralidad de ácidos nucleicos circulares en la muestra biológica.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona un método para analizar un ácido nucleico diana en una muestra biológica, el método comprende: (a) poner en contacto la muestra biológica con una sonda circular o una sonda o conjunto de sondas circularizables que se hibrida con el ácido nucleico diana; (b) poner en contacto la muestra biológica con una mezcla de unión, en donde la mezcla de unión comprende una polimerasa unida previamente a un polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a una región de hibridación en la sonda circular o sonda circularizada formada a partir de la sonda o conjunto de sondas circularizables, y se inhibe la actividad de la polimerasa; y (c) poner en contacto la muestra biológica con una mezcla de reacción de extensión del cebador para iniciar la actividad polimerasa, en donde se genera un producto de la amplificación por círculo rodante de la sonda circular o circularizada en la muestra biológica mediante el uso del polinucleótido como un cebador.

Por ejemplo, como se muestra en la Figura 1A, un complejo que comprende una polimerasa tal como Phi29 y un cebador puede formarse previamente antes de que el complejo se ponga en contacto con un tampón (un tampón de apagado para la RCA) que estabiliza el complejo pero inhibe una o más actividades de la polimerasa, tal como las actividades polimerasa y/o exonucleasa. En algunos aspectos, el complejo formado previamente que comprende una polimerasa y un cebador puede proporcionarse como una unidad a la plantilla para la extensión (por ejemplo, ácido nucleico circular en la muestra biológica). En algunas modalidades, los complejos se ponen en contacto con plantillas circulares o circularizadas y entonces se inicia la RCA al mismo tiempo mediante la adición de un tampón de reacción de RCA (un tampón de encendido para la RCA) que suprime la inhibición de las actividades polimerasa y/o exonucleasa de la enzima. En algunas modalidades, una pluralidad de ácidos nucleicos circulares se une a una pluralidad de ácidos nucleicos diana en diversas ubicaciones de la muestra biológica antes de la amplificación por círculo rodante.

En algunos aspectos, en la presente descripción se proporciona un método para analizar una muestra biológica, que comprende: poner en contacto la muestra biológica con una mezcla de unión, en donde la muestra biológica comprende una pluralidad de ácidos nucleicos circulares que comprenden cada uno una región de hibridación hibridada a un polinucleótido, la mezcla de unión comprende una polimerasa, y se inhibe la actividad polimerasa de la polimerasa, permitiendo de esta manera que la polimerasa se una a la pluralidad de ácidos nucleicos circulares; y poner en contacto la muestra biológica con una mezcla de reacción de extensión del cebador para permitir que la

polimerasa extiende el polinucleótido hibridado a la región de hibridación, sincronizando de esta manera la amplificación por círculo rodante de la pluralidad de ácidos nucleicos circulares en la muestra biológica.

5 En algunas modalidades, se forma un complejo que comprende la polimerasa, el ácido nucleico circular y un polinucleótido en la muestra biológica. Por ejemplo, el polinucleótido puede comprender una secuencia complementaria a una porción del ácido nucleico circular. En algunas modalidades, el polinucleótido puede comprender un cebador exógeno añadido a la muestra. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 1B, los cebadores pueden hibridarse a sondas circulares o circularizadas en diferentes ubicaciones en la muestra, que después se ponen en contacto con una polimerasa (por ejemplo, Phi29) en un tampón de apagado que inhibe la actividad polimerasa. La polimerasa puede difundirse en la muestra y unirse a los cebadores hibridados en las sondas circulares o circularizadas, pero la RCA se mantiene bajo control hasta que se eliminan las polimerasas no unidas y se aplica un tampón de encendido para iniciar la RCA en las diferentes ubicaciones. En estos ejemplos, los ácidos nucleicos circulares pueden comprender moléculas endógenas en la muestra biológica, tales como moléculas de ADN o ARN circular endógeno en una célula, por ejemplo, ADNmt. Alternativamente, los ácidos nucleicos circulares pueden comprender productos de moléculas endógenas en la muestra biológica, tales como moléculas circularizadas generadas a partir de ADN genómico, ARN celular tal como ARNm, o ADNc circularizado. En otros casos, los ácidos nucleicos circulares pueden comprender sondas dirigidas a moléculas endógenas en la muestra biológica, tales como sondas candado dirigidas a ADN genómico o ARN celular tal como ARNm. En otros casos, los ácidos nucleicos circulares pueden comprender productos de sondas exógenas dirigidas a moléculas endógenas en la muestra biológica. En cualquiera de las modalidades anteriores, los ácidos nucleicos circulares pueden hibridarse con uno o más productos de RCA para generar productos de RCA adicionales mediante el uso de los ácidos nucleicos circulares como plantillas.

25 En algunas modalidades, el polinucleótido puede comprender una molécula endógena (por ejemplo, un ácido nucleico diana) en la muestra biológica, tal como ADN genómico o ARN celular tal como ARNm. En algunas modalidades, el polinucleótido puede comprender ADNc. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 1C, puede aplicarse una polimerasa en un tampón de apagado a una muestra para unirse al extremo 3' de un polinucleótido (por ejemplo, ARN o ADN, tal como ARNm o ADNc) en la muestra, y las polimerasas cargadas sobre los polinucleótidos pueden activarse con un tampón de encendido para usar los polinucleótidos como cebadores para cebar reacciones de RCA sincronizadas mediante el uso de una sonda circular o circularizada como plantilla. En algunas modalidades, el polinucleótido es un ARN tal como ARNm, la sonda circular o circularizada hibridada al ARN comprende ADN, y el polinucleótido de ARN se usa para el cebado de la reacción de RCA mediante el uso de la plantilla de ADN circular o circularizado. En algunas modalidades, el polinucleótido puede comprender un producto de una molécula endógena en la muestra biológica, tal como un producto de ligadura, escisión, o amplificación de ADN genómico o ARN celular tal como ARNm. En algunas modalidades, el polinucleótido puede comprender una sonda dirigida a una molécula endógena en la muestra biológica, tal como una sonda en forma de L o una sonda en forma de U. En estos ejemplos, el ácido nucleico circular puede hibridarse con el polinucleótido que se usa como cebador para la RCA, por ejemplo, similar al enfoque combinado RCA-smFISH (RollFISH) descrito en Wu y otros, *Commun Biol* 1: 209 (2018). En algunas modalidades, el polinucleótido puede comprender un producto de una sonda exógena dirigida a una molécula endógena en la muestra biológica. Por ejemplo, el polinucleótido en sí mismo puede ser un producto de RCA, y una sonda circular o circularizada puede hibridarse con el producto de RCA para generar otro producto de RCA mediante el uso de la sonda circular o circularizada como plantilla.

45 La mezcla de unión o tampón de apagado puede estabilizar la polimerasa y/o inhibir una actividad de la polimerasa, tal como una actividad polimerasa y/o una actividad nucleasa. La mezcla de unión puede comprender uno o más desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP) y/o nucleósidos trifosfatos (NTP). Por ejemplo, la mezcla de unión puede comprender dATP, dTTP, dCTP, y/o dGTP. Alternativamente, la mezcla de unión puede estar sustancialmente libre de dNTP y/o NTP. En algunas modalidades, la mezcla de unión puede comprender un dicatión que no es un cofactor de la polimerasa, tal como Ca^{2+} , que puede estabilizar la polimerasa sin activar su actividad polimerasa y/o actividad exonucleasa.

55 En algunas modalidades, la mezcla de unión o tampón de apagado o muestra biológica puede estar sustancialmente libre de un cofactor de la polimerasa. Un cofactor es un compuesto químico no proteico o ion metálico requerido para la actividad de una enzima como un catalizador. Las ADN polimerasas y ácido ribonucleico (ARN) polimerasas en general requieren un catión cofactor metálico divalente o trivalente para catalizar la polimerización de nucleótidos individuales en un polinucleótido. En algunas modalidades en la presente descripción, puede usarse la presencia/ausencia de catión(ones) particular(es) para alterar la cinética de las polimerasas. En ausencia del cofactor metálico en el estado de oxidación apropiado, la polimerización no se producirá a una velocidad apreciable incluso si todos los demás componentes necesarios están presentes. Los cationes cofactores metálicos pueden incluir Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y/o Mg^{2+} . Cationes cofactores ilustrativos se describen en Vashishtha y otros, *J Biol Chem* 291(40):20869–20875, 2016; el documento US 2021/0047669; las patentes de Estados Unidos núms. 5,409,811; 8,133,672; 8,658,365; y 9,279,155. Los cofactores metálicos pueden proporcionarse en forma de sales, tales como MgCl_2 o CoCl_2 . Las sales forman hidratos tales como $\text{MgCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_x$ o $\text{CoCl}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n=1, 2, 6, \text{ y } 9$) en solución acuosa. Un cofactor metálico adecuado es el magnesio. El magnesio puede presentarse como una sal de magnesio tal como cloruro de magnesio (MgCl_2). El magnesio puede proporcionarse como magnesio metálico, $\text{Mg}(0)$, y puede oxidarse por electrólisis en un ánodo en una solución tamponada para generar $\text{Mg}(II)$. Otro cofactor metálico adecuado es el

cobalto. El cobalto puede proporcionarse como un complejo de cobalto, tal como un complejo de cobalto (III) o un complejo de cobalto (I). Los ejemplos de complejos de cobalto incluyen cloruro de trans-diclorobis(etilendiamina)cobalto(III), cloruro de pentaaminaclorocobalto(III), cloruro de hexamina cobalto(III), cloruro de trans-diclorotetraquis(imidazol)cobalto(III) o clorotris(trifenilfosfina)cobalto(I). El complejo de cobalto puede reducirse u oxidarse a cloruro de cobalto(II) (CoCl_2). Por ejemplo, un complejo de Co(III) puede reducirse a un complejo de Co(II) que puede experimentar intercambio de ligandos con una solución acuosa tamponada para formar Co(II) , que después puede coordinarse con una polimerasa para activarla para la síntesis de polinucleótidos. Una reacción de intercambio de ligandos implica la sustitución de uno o más ligandos en un ion del complejo por uno o más ligandos diferentes.

Se conoce que ciertos cofactores metálicos divalentes o trivalentes tales como magnesio y manganeso interactúan con una polimerasa para modular el progreso de la reacción. Dichos cofactores metálicos catalíticos pueden coordinarse con una polimerasa y el trifosfato de un dNTP para catalizar la adición de un nucleótido al nucleótido 3' terminal en el extremo del iniciador (por ejemplo, un cebador), creando un enlace fosfodiéster entre el nucleótido 3' dNTP y el iniciador y libera pirofosfato (PPi). Otros iones metálicos, tales como Ca^{2+} , pueden interactuar con una polimerasa, tal como Phi29 o una variante o derivado de esta, para un efecto negativo, por ejemplo, para estabilizar la enzima y detener la polimerización. Diferentes cofactores metálicos pueden tener efectos catalíticos variables sobre la reacción de polimerización en dependencia de la naturaleza de la reacción de polimerización, la polimerasa usada, los nucleótidos empleados, etc., y en algunas modalidades, los efectos catalíticos/no catalíticos de estos cofactores se usan para sincronizar la polimerización tal como reacciones de RCA. Por ejemplo, un primer cofactor metálico que interactúa con una polimerasa o complejo polimerasa-cebador en la presente descripción para soportar la reacción de polimerización a un nivel más alto que un segundo cofactor metálico en las mismas condiciones, se denomina un ion metálico catalítico. En algunos aspectos, dichos metales catalíticos soportan la polimerización continua, iterativa o procesiva de ácidos nucleicos bajo las condiciones particulares de reacción de la polimerasa, por ejemplo, a través de la adición sobre múltiples bases, mientras que en algunos casos, un tipo dado de cofactor metálico catalítico puede soportar solo la adición de una única base. En algunas modalidades, los cofactores metálicos catalíticos, por ejemplo, para Phi29 o una variante o derivado de esta, pueden incluir Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} o Mg^{2+} , o cualquiera de sus combinaciones. En algunas modalidades, la mezcla de unión en la presente descripción (por ejemplo, en un tampón de apagado) puede estar sustancialmente libre de Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Mg^{2+} , para detener la polimerización tal como reacciones de RCA al tiempo que permite que una polimerasa (o un complejo polimerasa-ácido nucleico tal como un complejo polimerasa-cebador) se difunda en una muestra y se una a ácidos nucleicos circulares, cebadores y/o complejos de estos.

En algunas modalidades, la mezcla de unión o tampón de apagado o muestra biológica puede comprender un agente quelante. Por ejemplo, el agente quelante puede quelar un dicatión tal como Mg^{2+} de una o más reacciones anteriores. Como tal, el agente quelante puede quelar cantidades residuales del dicatión en la muestra biológica, tal como un corte de tejido que se ha puesto en contacto con una mezcla de reacción que contiene el dicatión (por ejemplo, una mezcla de reacción de ligadura para circularizar una sonda candado para formar el ácido nucleico circular). En algunas modalidades, la mezcla de unión puede comprender EDTA, EGTA, BAPTA, DTPA, o una de sus combinaciones. En algunas modalidades, uno o más agentes quelantes en la mezcla de unión pueden quelar cofactores metálicos catalíticos para Phi29 o una variante o derivado de esta, tales como Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} o Mg^{2+} , secuestrando de esta manera estos cofactores de las polimerasas en las mezclas de reacción y/o en la muestra para detener la polimerización.

En algunas modalidades, la mezcla de unión o tampón de apagado o muestra biológica puede comprender uno o más cofactores que interactúan con una polimerasa, pero que no promueven la reacción de polimerización, y en algunos casos actúan para detener o impedir la polimerización y/o inhibir una o más otras actividades de la polimerasa, tal como la actividad exonucleasa 3'→5'. En algunas modalidades, la mezcla de unión puede comprender uno o más iones metálicos no catalíticos, tales como calcio, bario, estroncio, hierro, cobalto, níquel, estaño, zinc, y europio. Estos metales pueden añadirse a la mezcla de unión y/o a la muestra en forma de sal, tal como Sr(OAc)_2 , Sr(OAc)_2 , CoCl_2 , SnCl_2 , CaCl_2 , o ZnSO_4 . Un primer cofactor metálico que puede considerarse catalítico en un primer conjunto de condiciones de reacción o con relación a un segundo cofactor metálico, puede considerarse un metal no catalítico en otro conjunto diferente de condiciones de reacción, o con respecto a un tercer cofactor metálico. Por ejemplo, se conoce generalmente que el magnesio soporta la polimerización del ADN. Sin embargo, en ciertas condiciones, y/o con relación al manganeso, el magnesio puede funcionar como un cofactor no catalítico. En algunas modalidades en la presente descripción, un cofactor catalítico soporta la polimerización en un mayor grado que el metal no catalítico en las mismas condiciones de reacción. En algunas modalidades, el impacto catalítico relativo es una función de la velocidad de recambio del reactante del complejo de polimerización, con cofactores metálicos catalíticos que promueven un recambio que es al menos dos veces, con mayor preferencia, al menos 5 veces, aún con mayor preferencia, al menos 10 veces, y en algunos casos 20 veces, 50 veces o mayor que el del cofactor metálico no catalítico en las mismas condiciones de reacción. En algunas modalidades, la presencia de un metal no catalítico en el complejo de la polimerasa (por ejemplo, en una mezcla de unión o un tampón de apagado), a través de la unión en o alrededor del sitio activo, da como resultado la incapacidad de la reacción de síntesis para continuar fuera del estado en complejo. En particular, la presencia de iones de calcio puede modular tanto el progreso directo de la reacción de la polimerasa, así como también el progreso inverso de la reacción. Como resultado, en presencia de calcio u otros metales no catalíticos, el nucleótido en complejo se secuestra efectivamente en el complejo de la polimerasa. La

reacción es un evento de unión de nucleótidos no productivo, es decir, incapaz de continuar hacia adelante con la incorporación, o por el contrario, con la liberación del nucleótido no incorporado para producir una polimerasa libre.

En algunas modalidades, el metal catalítico se selecciona de Mg^{2+} , Mn^{2+} y mezclas de estos, y el metal no catalítico se selecciona de Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Eu^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Eu^{2+} y mezclas de estos. En algunas modalidades, la mezcla de unión o tampón de apagado comprende uno o más de Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Eu^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , y Eu^{2+} , y está sustancialmente libre de Mg^{2+} y/o Mn^{2+} .

En algunas modalidades, la mezcla de unión o tampón de apagado o la muestra biológica puede comprender uno o más dNTP. Sin embargo, en algunas modalidades, debido a la ausencia de uno o más cofactores catalíticos, la presencia de uno o más agentes quelantes para los cofactores catalíticos, y/o la presencia de uno o más cofactores no catalíticos, los dNTP se secuestran y la polimerasa no puede incorporar los dNTP. En algunas modalidades, la mezcla de unión permite la unión entre una polimerasa, un cebador, y/o un ácido nucleico circular, para formar complejos en múltiples ubicaciones en una muestra que están listos para iniciar la RCA una vez que la actividad polimerasa se activa.

En algunas modalidades, la mezcla de unión o tampón de apagado o la muestra biológica puede comprender uno o más polinucleótidos que pueden funcionar como cebadores para RCA. En algunas modalidades, dado que Phi29 posee una actividad exonucleasa 3'→5' (corrección de errores) que actúa preferentemente sobre ADN o ARN monocatenario, en algunas modalidades, el polinucleótido (por ejemplo, un cebador añadido exógenamente o un ácido nucleico diana en la muestra) que funciona como un cebador para RCA puede modificarse en 3'. En algunas modalidades, el polinucleótido puede estar protegido con tiosfato en 3', que protege al polinucleótido de la degradación exonucleasa 3'→5' por la polimerasa al tiempo que permite el cebado por la polimerasa. En algunas modalidades, el polinucleótido puede comprender una cola 3' de longitud suficiente para proteger la secuencia que funciona como cebador para RCA de la degradación por Phi29. En algunas modalidades, la cola del extremo 3' puede digerirse gradualmente hasta que la parte restante pueda convertirse en cebador para RCA y extenderse a lo largo de la plantilla circular mediante la actividad polimerasa de Phi29. Sin embargo, en algunas modalidades, debido a la ausencia de uno o más cofactores catalíticos, la presencia de uno o más agentes quelantes para los cofactores catalíticos, y/o la presencia de uno o más cofactores no catalíticos, la actividad exonucleasa de Phi29 puede inhibirse efectivamente en la mezcla de unión o tampón de apagado de manera que no sea necesaria ninguna modificación protectora 3' o cola 3'. Por tanto, en algunas modalidades, el polinucleótido (por ejemplo, un cebador añadido exógenamente o un ácido nucleico diana en la muestra) puede tener un grupo hidroxilo 3' libre disponible para la incorporación de nucleótidos mediante Phi29.

En algunas modalidades, la mezcla de unión o tampón de apagado o la muestra biológica puede comprender una o más polimerasas. En algunas modalidades, la polimerasa comprende una polimerasa de tipo Phi29 recombinante modificada. En algunas modalidades, la polimerasa comprende una polimerasa recombinante modificada Phi29, B103, GA-1, PZA, Phi15, BS32, M2Y, Nf, G1, Cp-1, PRD1, PZE, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, o L17. En algunas modalidades, la polimerasa comprende una ADN polimerasa recombinante modificada que tiene al menos una sustitución de aminoácidos o combinación de sustituciones en comparación con una polimerasa Phi29 de tipo silvestre. Polimerasas ilustrativas se describen en las patentes de Estados Unidos núms. 8,257,954; 8,133,672; 8,343,746; 8,658,365; 8,921,086; y 9,279,155. En algunas modalidades, la polimerasa no se inmoviliza directa o indirectamente a un sustrato, tal como una perla o sustrato plano (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), antes de entrar en contacto con una muestra, aunque la muestra puede estar inmovilizada sobre un sustrato. En algunas modalidades, la polimerasa no está unida a un nanoporo, una membrana de nanoporos o un soporte aislante de esta. En algunas modalidades, la polimerasa se difunde en la mezcla de unión y/o en la muestra biológica. En algunas modalidades, un complejo formado previamente que comprende la polimerasa y el cebador para RCA puede difundirse en la mezcla de unión y/o en la muestra biológica.

En algunas modalidades, el método puede comprender además, entre la entrada en contacto con la mezcla de unión y con la mezcla de reacción de extensión del cebador (por ejemplo, la mezcla de reacción de amplificación), una etapa de eliminar moléculas de la polimerasa y/o del polinucleótido que no están unidas al ácido nucleico circular de la muestra biológica. En algunas modalidades, el método puede comprender además uno o más lavados rigurosos entre las etapas de entrada en contacto.

En algunas modalidades, la mezcla de reacción de extensión del cebador puede comprender un desoxinucleósido trifosfato (dNTP) o un derivado, variante, o análogo de este. En algunas modalidades, la mezcla de reacción de extensión del cebador puede comprender un cofactor catalítico de la polimerasa. En cualquiera de las modalidades anteriores, la mezcla de reacción de extensión del cebador puede comprender un dicatión catalítico, tal como Mg^{2+} y/o Mn^{2+} . En algunas modalidades, la mezcla de reacción de extensión del cebador está sustancialmente libre de un catión no catalítico, tal como Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Eu^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Eu^{2+} y mezclas de estos. En algunas modalidades, un catión catalítico en la mezcla de reacción de extensión del cebador puede reemplazar un catión no catalítico en complejo con la polimerasa que está unido al ácido nucleico circular o al cebador para RCA, activando por tanto la actividad polimerasa de la polimerasa. En algunas modalidades, cuando la muestra se pone en contacto con una mezcla de reacción de extensión del cebador que comprende un dicatión catalítico (tal como Mg^{2+} y/o Mn^{2+}), se desplaza un catión no catalítico (tal como Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Eu^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , y/o Eu^{2+}) unido a Phi29,

activando de esta manera la actividad polimerasa 5'→3' y la actividad exonucleasa 3'→5' (corrección de errores) de Phi29.

5 En algunas modalidades, el pH de la mezcla de unión y de la mezcla de reacción de extensión del cebador puede ser sustancialmente el mismo, por ejemplo, aproximadamente pH 8,5. En algunas modalidades, el pH de la mezcla de unión y de la mezcla de reacción de extensión del cebador puede ser independientemente aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9,0, aproximadamente 9,5, o aproximadamente 10,0. En cualquiera de las modalidades anteriores, el pH de la mezcla de unión y de la mezcla de reacción de extensión del cebador puede ser independientemente aproximadamente 8,1, aproximadamente 8,2, aproximadamente 8,3, aproximadamente 8,4, aproximadamente 8,5, aproximadamente 8,6, aproximadamente 8,7, aproximadamente 8,8, aproximadamente 8,9, o aproximadamente 9,0.

15 En algunas modalidades, la mezcla de reacción de extensión del cebador puede estar sustancialmente libre de la polimerasa y/u otras polimerasas. En algunas modalidades, las moléculas de polimerasa que no se unen al ácido nucleico circular y/o al cebador para RCA se eliminan de la muestra biológica. Por tanto, en algunas modalidades, sustancialmente todas las moléculas de polimerasa en la muestra se unen a un ácido nucleico circular y a un cebador para RCA y están listas para iniciar la RCA al mismo tiempo una vez que se activa la actividad enzimática. Los polinucleótidos (por ejemplo, cebadores añadidos exógenamente o ácidos nucleicos diana en la muestra) hibridados con la región de hibridación de los ácidos nucleicos circulares pueden extenderse por la polimerasa, iniciando de esta manera la amplificación por círculo rodante simultáneamente en diferentes ácidos nucleicos circulares de una manera concertada. Las reacciones de RCA pueden finalizarse al mismo tiempo para proporcionar una pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante.

25 En algunas modalidades, la pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante puede tener un diámetro medio o promedio de aproximadamente 0,05 µm, aproximadamente 0,1 µm, aproximadamente 0,2 µm, aproximadamente 0,3 µm, aproximadamente 0,4 µm, aproximadamente 0,5 µm, aproximadamente 0,6 µm, aproximadamente 0,7 µm, aproximadamente 0,8 µm, aproximadamente 0,9 µm, aproximadamente 1,0 µm, aproximadamente 1,1 µm, aproximadamente 1,2 µm, aproximadamente 1,3 µm, aproximadamente 1,4 µm, o aproximadamente 1,5 µm, o entre cualquiera de los valores mencionados anteriormente. En algunas modalidades, la pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante puede tener un diámetro medio o promedio menor que 0,25 µm.

35 En algunas modalidades, la pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante puede tener una longitud media o promedio de aproximadamente 1 kb, aproximadamente 2 kb, aproximadamente 5 kb, aproximadamente 10 kb, aproximadamente 20 kb, aproximadamente 30 kb, aproximadamente 40 kb, aproximadamente 50 kb, aproximadamente 60 kb, o aproximadamente 70 kb, o entre cualquiera de los valores mencionados anteriormente. En algunas modalidades, la pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante puede tener una longitud media o promedio menor que 20 kb o menor que 10 kb.

40 En algunas modalidades, el número medio o promedio de copias de una secuencia unitaria complementaria al ácido nucleico circular en la pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante puede ser aproximadamente 10, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 500, aproximadamente 1000, aproximadamente 5000, o aproximadamente 10 000 o más.

45 En algunas modalidades, el número medio o promedio de copias de una secuencia unitaria complementaria al ácido nucleico circular en la pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante puede ser menor que 100 o menor que 1000.

50 En algunas modalidades, la desviación estándar del diámetro de la pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante es menor que la desviación estándar del diámetro de los productos de la amplificación por círculo rodante generados mediante el uso de un método no sincronizado.

55 En algunas modalidades, el valor medio o promedio de la intensidad del pico de la pluralidad de productos de la amplificación por círculo rodante puede ser entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 veces mayor que un valor medio o promedio de la intensidad del pico de los productos de la amplificación por círculo rodante formados sin sincronizar la amplificación por círculo rodante de la pluralidad de ácidos nucleicos circulares en la muestra biológica. En algunas modalidades, la distribución de la señal observada relativa de los productos de la amplificación por círculo rodante formados con sincronización de la amplificación por círculo rodante de la pluralidad de ácidos nucleicos circulares en la muestra biológica, puede ser más estrecha que la distribución de la señal observada relativa de los productos de la amplificación por círculo rodante formados sin sincronización de la amplificación por círculo rodante de la pluralidad de ácidos nucleicos circulares en la muestra biológica.

60 En algunas modalidades, la sincronización conduce a productos de RCA de tamaño más homogéneo y/o puntos de señal más brillantes para los productos de RCA. En algunas modalidades, la sincronización conduce a menos puntos de señal oscuros y/o más puntos de señal brillantes para los productos de RCA. En algunas modalidades, cuando el tamaño del producto de RCA se vuelve más homogéneo, el tiempo de amplificación puede disminuirse, lo que hace a los productos de RCA más pequeños, pero igualmente brillantes. En algunas modalidades, la extensión por la

polimerasa puede realizarse durante no más de 3 horas. En algunas modalidades, la extensión por la polimerasa puede realizarse durante no más de 2 horas. En algunas modalidades, la extensión por la polimerasa puede realizarse durante no más de 1 hora. En algunas modalidades, la extensión por la polimerasa puede realizarse durante no más de 30 minutos. En cualquiera de las modalidades aquí, la extensión por la polimerasa, por ejemplo, la RCA, puede realizarse entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 40 °C, por ejemplo, a aproximadamente 25 °C, aproximadamente 26 °C, aproximadamente 27 °C, aproximadamente 28 °C, aproximadamente 29 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 31 °C, aproximadamente 32 °C, aproximadamente 33 °C, aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, o aproximadamente 37 °C, durante menos de aproximadamente 5 minutos, menos de aproximadamente 10 minutos, menos de aproximadamente 15 minutos, menos de aproximadamente 20 minutos, menos de aproximadamente 25 minutos, menos de aproximadamente 30 minutos, menos de aproximadamente 35 minutos, menos de aproximadamente 40 minutos, menos de aproximadamente 45 minutos, menos de aproximadamente 50 minutos, menos de aproximadamente 55 minutos, menos de aproximadamente 60 minutos, menos de aproximadamente 65 minutos, menos de aproximadamente 70 minutos, menos de aproximadamente 75 minutos, menos de aproximadamente 80 minutos, menos de aproximadamente 85 minutos, menos de aproximadamente 90 minutos, menos de aproximadamente 95 minutos, menos de aproximadamente 100 minutos, menos de aproximadamente 105 minutos, menos de aproximadamente 110 minutos, menos de aproximadamente 115 minutos, menos de aproximadamente 120 minutos. En algunas modalidades, la extensión por la polimerasa puede realizarse durante menos de aproximadamente 1 hora, menos de aproximadamente 2 horas, menos de aproximadamente 3 horas, menos de aproximadamente 4 horas, menos de aproximadamente 5 horas, menos de aproximadamente 6 horas, menos de aproximadamente 7 horas, menos de aproximadamente 8 horas, menos de aproximadamente 9 horas, menos de aproximadamente 10 horas, menos de aproximadamente 11 horas, menos de aproximadamente 12 horas, menos de aproximadamente 13 horas, menos de aproximadamente 14 horas, menos de aproximadamente 15 horas, menos de aproximadamente 16 horas, menos de aproximadamente 17 horas, menos de aproximadamente 18 horas, menos de aproximadamente 19 horas, menos de aproximadamente 20 horas, menos de aproximadamente 21 horas, menos de aproximadamente 22 horas, menos de aproximadamente 23 horas, menos de aproximadamente 24 horas, menos de aproximadamente 30 horas, menos de aproximadamente 35 horas, o menos de aproximadamente 40 horas. En una modalidad específica, la extensión por la polimerasa puede realizarse durante entre aproximadamente 10 a 24 horas.

En algunas modalidades, mediante el uso de un método descrito en la presente descripción, los productos de RCA de tamaños más homogéneos (por ejemplo, una distribución más estrecha de tamaños) se generan en un tiempo de RCA de menos de aproximadamente 30 minutos. Por ejemplo, la Figura 4C muestra imágenes representativas después de la detección y filtrado de elementos en los grupos de control y sincronizados con 30 minutos de RCA. El grupo sincronizado mostró una tendencia a una mejor detección de los productos de RCA en las ubicaciones donde se espera la expresión génica diana en el tejido cerebral. Por tanto, en comparación con las reacciones de RCA *in situ* no sincronizadas, la sincronización puede facilitar una mejor detección y/o resolución de más productos de RCA.

V. Amplificación, detección y análisis de la señal.

En algunos aspectos, los métodos proporcionados implican analizar, por ejemplo, detectar o determinar, una o más secuencias presentes en los ácidos nucleicos circulares y/o polinucleótidos y/o en un producto o derivado de estos, tal como en una sonda candado amplificada. En algunos casos, el análisis se realiza en una o más imágenes capturadas, y puede comprender procesar la o las imágenes y/o cuantificar las señales observadas. Por ejemplo, el análisis puede comprender procesar información de uno o más tipos de células, uno o más tipos de biomarcadores, un número o nivel de un biomarcador, y/o un número o nivel de células detectadas en una región en particular de la muestra. En algunas modalidades, el análisis comprende detectar una secuencia, por ejemplo, un código de barras presente en la muestra. En algunas modalidades, el análisis incluye la cuantificación de los puntos (por ejemplo, si se detectan productos de amplificación). En algunos casos, el análisis incluye determinar si están presentes células y/o señales particulares que se correlacionan con uno o más biomarcadores de un panel en particular. En algunas modalidades, la información obtenida puede compararse con un control positivo y negativo, o con un umbral de un elemento para determinar si la muestra exhibe un cierto elemento o fenotipo. En algunos casos, la información puede comprender señales de una célula, una región y/o comprender lecturas de múltiples marcadores detectables. En algún caso, el análisis incluye además visualizar la información de la etapa de análisis o de detección. En algunas modalidades, puede usarse un software para automatizar el procesamiento, análisis, y/o visualización de los datos.

En algunas modalidades, un método descrito en la presente descripción puede comprender además uno o más componentes de amplificación de la señal. En algunas modalidades, la presente descripción se refiere a la detección de secuencias de ácidos nucleicos *in situ* mediante el uso de hibridación con sonda y la generación de señales amplificadas asociadas con las sondas, en donde la señal de fondo se reduce y la sensibilidad se aumenta. En algunas modalidades, el producto de RCA generado a partir de la RCA sincronizada puede detectarse con un método que comprende la amplificación de la señal.

Los métodos ilustrativos de amplificación de la señal incluyen la deposición dirigida de moléculas reactivas detectables alrededor del sitio de hibridación con sonda, el ensamble dirigido de estructuras ramificadas (por ejemplo, ADN_r o ensayo ramificado mediante el uso de ácido nucleico bloqueado (LNA)), crecimiento *in situ* programado de concatémeros mediante amplificación por círculo rodante (RCA) enzimática (por ejemplo, como se describió en el

documento US 2019/0055594), reacción en cadena de hibridación, ensamble de estructuras de ADN concatenadas topológicamente mediante el uso de rondas en serie de ligadura química (clampFISH), amplificación de señal mediante concatemerización mediada por horquillas (por ejemplo, como se describió en el documento US 2020/0362398), por ejemplo, reacciones de intercambio de cebadores tales como amplificación de la señal mediante reacción de intercambio (SABER) o SABER con intercambio de ADN (Exchange-SABER). En algunas modalidades, puede usarse un método de amplificación de la señal no enzimático.

Las moléculas reactivas detectables pueden comprender tiramida, tal como se usa en la amplificación de la señal de tiramida (TSA) o la deposición catalizada del indicador multiplexada (CARD)-FISH. En algunas modalidades, la molécula reactiva detectable puede liberarse y/o escindirse de un marcador detectable tal como un fluoróforo. En algunas modalidades, un método descrito en la presente descripción comprende un análisis multiplexado de una muestra biológica que comprende ciclos consecutivos de hibridación con sondas, obtención de imágenes de fluorescencia, y eliminación de señales, donde la eliminación de señales comprende eliminar el fluoróforo de una molécula reactiva marcada con fluoróforo (por ejemplo, tiramida). Reactivos y métodos reactivos detectables ilustrativos se describen en los documentos US 6,828,109, US 2019/0376956, WO 2019/236841, WO 2020/102094, WO 2020/163397, y WO 2021/067475.

En algunas modalidades, puede usarse la reacción en cadena de hibridación (HCR) para la amplificación de la señal. La HCR es una amplificación de ácido nucleico libre de enzimas basada en una cadena de hibridación de moléculas de ácido nucleico desencadenada que comienza a partir de monómeros de HCR, que se hibridan entre sí para formar un polímero de ácido nucleico mellado. Este polímero es el producto de la reacción de HCR que se detecta en última instancia para indicar la presencia del analito diana. La HCR se describe en detalle en Dirks y Pierce, 2004, PNAS, 101(43), 15275-15278 y en los documentos US 7,632,641 y US 7,721,721 (ver también los documentos US 2006/00234261; Chemeris y otros, 2008 Doklady Biochemistry and Biophysics, 419, 53-55; Niu y otros, 2010, 46, 3089-3091; Choi y otros, 2010, Nat. Biotechnol. 28(11), 1208-1212; y Song y otros, 2012, Analyst, 137, 1396-1401). Los monómeros de HCR comprenden típicamente una horquilla, u otra estructura de ácido nucleico metaestable. En la forma más simple de HCR, dos tipos diferentes de monómeros de horquilla estable, denominados aquí como primer y segundo monómeros de HCR, experimentan una reacción en cadena de eventos de hibridación para formar una molécula de ADN bicatenario fragmentado larga cuando se introduce una molécula de ácido nucleico "iniciador". Los monómeros de HCR tienen una estructura de horquilla que comprende una región de tallo bicatenario, una región de lazo que conecta las dos hebras de la región de tallo y una región monocatenaria en un extremo de la región de tallo bicatenario. La región monocatenaria que se expone (y que por tanto está disponible para la hibridación con otra molécula, por ejemplo, el iniciador u otro monómero de HCR) cuando los monómeros están en la estructura de horquilla, puede conocerse como la "región de punto de apoyo" (o "dominio de entrada"). Cada uno de los primeros monómeros de HCR comprende además una secuencia que es complementaria a una secuencia en la región de punto de apoyo expuesta de los segundos monómeros de HCR. Esta secuencia de complementariedad en los primeros monómeros de HCR puede conocerse como la "región de interacción" (o "dominio de salida"). De manera similar, cada uno de los segundos monómeros de HCR comprende una región de interacción (dominio de salida), por ejemplo, una secuencia que es complementaria a la región de punto de apoyo expuesta (dominio de entrada) de los primeros monómeros de HCR. En ausencia del iniciador de HCR, estas regiones de interacción están protegidas por la estructura secundaria (por ejemplo, no están expuestas), y por tanto los monómeros en horquilla son estables o atrapados cinéticamente (también denominados "metaestables"), y permanecen como monómeros (por ejemplo, impiden que el sistema se equilibre rápidamente), porque el primer y segundo conjuntos de monómeros de HCR no pueden hibridarse entre sí. Sin embargo, una vez que se introduce el iniciador, es capaz de hibridarse con la región de punto de apoyo expuesta de un primer monómero de HCR, e invadirlo, lo que provoca que este se abra. Esto expone la región de interacción del primer monómero de HCR (por ejemplo, la secuencia de complementariedad a la región de punto de apoyo de los segundos monómeros de HCR), lo que le permite hibridar e invadir un segundo monómero de HCR en la región de punto de apoyo. Esta hibridación e invasión, a su vez, abre el segundo monómero de HCR, y expone su región de interacción (que es complementaria a la región de punto de apoyo de los primeros monómeros de HCR), y permite hibridar e invadir otro primer monómero de HCR. La reacción continúa de esta manera hasta que todos los monómeros de HCR se agotan (por ejemplo, todos los monómeros de HCR se incorporan en una cadena polimérica). En última instancia, esta reacción en cadena conduce a la formación de una cadena fragmentada de unidades alternas de la primera y segunda especie de monómero. Por tanto, se requiere la presencia del iniciador de HCR para desencadenar la reacción de HCR mediante la hibridación e invasión de un primer monómero de HCR.

El primer y segundo monómeros de HCR se diseñan para hibridarse entre sí, por tanto, pueden definirse como afines entre sí. También son afines a una secuencia de iniciador de HCR dada. Los monómeros de HCR que interactúan entre sí (hibridan) pueden describirse como un conjunto de monómeros de HCR o un sistema de monómeros de HCR, u horquilla.

Una reacción de HCR podría llevarse a cabo con más de dos especies o tipos de monómeros de HCR. Por ejemplo, podría usarse un sistema que implica tres monómeros de HCR. En un sistema de este tipo, cada primer monómero de HCR puede comprender una región de interacción que se une a la región de punto de apoyo de un segundo monómero de HCR; cada segundo HCR puede comprender una región de interacción que se une a la región de punto de apoyo de un tercer monómero de HCR; y cada tercer monómero de HCR puede comprender una región de interacción que se une a la región de punto de apoyo de un primer monómero de HCR. La reacción de polimerización

de HCR continuaría entonces como se describió anteriormente, excepto que el producto resultante sería un polímero que tiene una unidad de repetición del primer, segundo y tercer monómeros consecutivamente. Podrían concebirse fácilmente sistemas correspondientes con un mayor número de conjuntos de monómeros de HCR. También se han ideado y descrito sistemas de HCR ramificados (ver, por ejemplo, el documento WO 2020/123742), y pueden usarse en los métodos en la presente descripción.

En algunas modalidades, similar a las reacciones de HCR que usan monómeros en horquilla, también puede usarse la reacción en cadena de hibridación de oligos lineales (LO-HCR) para la amplificación de la señal. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona un método para detectar un analito en una muestra que comprende: (i) realizar una reacción en cadena de hibridación de oligos lineales (LO-HCR), en donde un iniciador se pone en contacto con una pluralidad de monómeros de LO-HCR de al menos una primera y una segunda especie para generar un producto de LO-HCR polimérico hibridado con una molécula de ácido nucleico diana, en donde la primera especie comprende una primera región de hibridación complementaria al iniciador y una segunda región de hibridación complementaria a la segunda especie, en donde la primera especie y la segunda especie son moléculas de ácido nucleico monocatenarias lineales; en donde el iniciador se proporciona en una o más partes, e hibrida directa o indirectamente o está comprendida en la molécula de ácido nucleico diana; y (ii) detectar el producto polimérico, detectando de esta manera el analito. En algunas modalidades, la primera especie y/o la segunda especie pueden no comprender una estructura en horquilla. En algunas modalidades, la pluralidad de monómeros de LO-HCR puede no comprender una estructura secundaria metaestable. En algunas modalidades, el polímero de LO-HCR puede no comprender una estructura ramificada. En algunas modalidades, realizar la reacción en cadena de hibridación de oligos lineales comprende poner en contacto la molécula de ácido nucleico diana con el iniciador para proporcionar el iniciador hibridado con la molécula de ácido nucleico diana. En cualquiera de las modalidades en la presente descripción, la molécula de ácido nucleico diana y/o el analito pueden ser un producto de RCA. Métodos y composiciones ilustrativos para LO-HCR se describen en el documento US 2021/0198723.

En algunas modalidades, la detección de secuencias de ácidos nucleicos *in situ* incluye una combinación de RCA sincronizada con un ensamble para la amplificación de la señal ramificada. En algunas modalidades, el complejo de ensamble comprende un amplificador hibridado directa o indirectamente (mediante uno o más oligonucleótidos) con una secuencia del producto de RCA. En algunas modalidades, el ensamble incluye uno o más amplificadores, cada uno de los cuales incluye una secuencia de repetición del amplificador. En algunos aspectos, el uno o más amplificadores están marcados. En la presente descripción se describe un método para usar el ensamble mencionado anteriormente, lo que incluye, por ejemplo, usar el ensamble en aplicaciones de hibridación *in situ* con fluorescencia resistente a error multiplexada (MERFISH), con amplificación de ADN ramificada para la lectura de las señales. En algunas modalidades, la secuencia de repetición del amplificador es de aproximadamente 5-30 nucleótidos, y se repite N veces en el amplificador. En algunas modalidades, la secuencia de repetición del amplificador es de aproximadamente 20 nucleótidos, y se repite al menos dos veces en el amplificador. En algunos aspectos, la una o más secuencias de repetición del amplificador están marcadas. Para una amplificación de la señal ramificada ilustrativa, ver, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos núm. US20200399689A1 y Xia y otros, Multiplexed Detection of RNA using MERFISH and branched DNA amplification. Scientific Reports (2019).

En algunas modalidades, el producto de RCA puede detectarse con un método que comprende la amplificación de la señal mediante la realización de una reacción de intercambio de cebadores (PER). En diversas modalidades, un cebador con dominio en su extremo 3' se une a una horquilla catalítica, y se extiende con un nuevo dominio mediante una polimerasa que desplaza hebras. Por ejemplo, un cebador con el dominio 1 en sus extremos 3' se une a una horquilla catalítica, y se extiende con un nuevo dominio 1 mediante una polimerasa que desplaza hebras, con ciclos repetidos que generan un concatémero de secuencias con dominio 1 repetido. En diversas modalidades, la polimerasa que desplaza hebras es Bst. En diversas modalidades, la horquilla catalítica incluye un tope que libera la polimerasa que desplaza hebras. En diversas modalidades, la migración de ramificación desplaza el cebador extendido, que después puede disociarse. En diversas modalidades, el cebador se somete a ciclos repetidos para formar un cebador concatémero. En diversas modalidades, una pluralidad de cebadores de concatémeros se pone en contacto con una muestra que comprende productos de RCA generados mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción. En diversas modalidades, el producto de RCA puede ponerse en contacto con una pluralidad de cebadores de concatémeros y una pluralidad de sondas marcadas. Ver, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos núm. US20190106733, para moléculas y componentes de la reacción PER ilustrativos.

En algunas modalidades, el producto de RCA puede detectarse al proporcionar sondas de detección, tales como sondas para realizar una reacción en cadena que forma un producto de amplificación, por ejemplo, de HCR. En algunas modalidades, el análisis comprende determinar la secuencia de todo o una porción del producto de amplificación. En algunas modalidades, el análisis comprende detectar una secuencia presente en el producto de amplificación. En algunas modalidades, la secuencia de todo o una porción del producto de amplificación es indicativa de la identidad de una región de interés en un ácido nucleico diana. En otras modalidades, los métodos proporcionados implican analizar, por ejemplo, detectar o determinar, una o más secuencias presentes en las sondas de polinucleótidos (por ejemplo, una secuencia de código de barras presente en una región saliente de la primera y/o segunda sonda).

En algunas modalidades, los métodos comprenden secuenciar todo o una porción del producto de amplificación, tal como una o más secuencias de código de barras presentes en el producto de amplificación. En algunas modalidades, el análisis y/o la determinación de secuencia comprende secuenciar todo o una porción del producto de amplificación o la(s) sonda(s) y/o la hibridación *in situ* con el producto de amplificación o la(s) sonda(s). En algunas modalidades, la etapa de secuenciación implica la secuenciación mediante hibridación, secuenciación mediante ligadura, y/o secuenciación fluorescente *in situ*, secuenciación basada en hibridación *in situ* y/o en donde la hibridación *in situ* comprende hibridación *in situ* fluorescente secuencial. En algunas modalidades, el análisis y/o la determinación de la secuencia comprende detectar un polímero generado mediante una reacción de reacción en cadena de hibridación (HCR), ver, por ejemplo, el documento US 2017/0009278, para moléculas y componentes de la reacción de HCR ilustrativos. En algunas modalidades, la detección o determinación comprende hibridar al producto de amplificación un oligonucleótido de detección marcado con un fluoróforo, un isótopo, una etiqueta de masa, o una de sus combinaciones. En algunas modalidades, la detección o determinación comprende obtener imágenes del producto de la amplificación. En algunas modalidades, el ácido nucleico diana es un ARNm en una muestra de tejido, y la detección o determinación se realiza cuando el ácido nucleico diana y/o el producto de la amplificación están *in situ* en la muestra de tejido.

En algunos aspectos, los métodos proporcionados comprenden obtener imágenes del producto de la amplificación (por ejemplo, amplicón) y/o una o más porciones de los polinucleótidos, por ejemplo, mediante la unión de la sonda de detección y detectar el marcador detectable. En algunas modalidades, la sonda de detección comprende un marcador detectable que puede medirse y cuantificarse. Los términos "marcador" y "marcador detectable" comprenden un resto detectable directa o indirectamente que se asocia con (por ejemplo, se conjuga con) una molécula a detectar, por ejemplo, una sonda detectable, que comprende, pero no se limita a, fluoróforos, isótopos radiactivos, productos fluorescentes, productos quimioluminiscentes, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, cromóforos, colorantes, iones metálicos, soles metálicos, ligandos (por ejemplo, biotina o haptenos) y similares.

El término "fluoróforo" comprende una sustancia o una porción de esta que es capaz de exhibir fluorescencia en el intervalo detectable. Ejemplos particulares de marcadores que pueden usarse de acuerdo con las modalidades proporcionadas comprenden, pero no se limitan a, ficoeritrina, colorantes Alexa, fluoresceína, YPet, CyPet, azul Cascade, alofococianina, Cy3, Cy5, Cy7, rodamina, dansilo, umbeliferona, rojo Texas, luminol, ésteres de acradimum, biotina, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde potenciada (EGFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente amarilla potenciada (EYFP), proteína fluorescente azul (BFP), proteína fluorescente roja (RFP), luciferasa de luciérnaga, luciferasa de renilla, NADPH, beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, fosfatasa alcalina, cloranfenicol acetiltransferasa, y ureasa.

La detección de fluorescencia en muestras de tejido a menudo puede verse obstaculizada por la presencia de una fuerte fluorescencia de fondo. "Autofluorescencia" es el término general usado para distinguir la fluorescencia de fondo (que puede surgir a partir de una variedad de fuentes, lo que incluye fijación con aldehído, componentes de la matriz extracelular, glóbulos rojos, lipofuscina, y similares) de la inmunofluorescencia deseada de los anticuerpos o sondas marcadas con fluorescencia. La autofluorescencia de tejidos puede conducir a dificultades para distinguir las señales debidas a anticuerpos o sondas fluorescentes del fondo general. En algunas modalidades, un método descrito en la presente descripción utiliza uno o más agentes para reducir la autofluorescencia de tejidos, por ejemplo, el Autofluorescence Eliminator (Sigma/EMD Millipore), TrueBlack Lipofuscin Autofluorescence Quencher (Biotium), MaxBlock Autofluorescence Reducing Reagent Kit (MaxVision Biosciences), y/o un colorante negro muy intenso (por ejemplo, negro de Sudán, o un cromóforo oscuro comparable).

En algunas modalidades, puede usarse una sonda detectable que contiene un marcador detectable para detectar uno o más polinucleótidos y/o productos de la amplificación (por ejemplo, amplicón) descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, los métodos implican incubar la sonda detectable que contiene el marcador detectable con la muestra, lavar la sonda detectable no unida, y detectar el marcador, por ejemplo, mediante la obtención de imágenes.

Ejemplos de marcadores detectables comprenden, pero no se limitan a, diversos restos radiactivos, enzimas, grupos prostéticos, marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores bioluminiscentes, partículas metálicas, pares de unión proteína-proteína y pares de unión proteína-anticuerpo. Ejemplos de proteínas fluorescentes comprenden, pero no se limitan a, proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente cian (CFP), umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina.

Ejemplos de marcadores bioluminiscentes comprenden, pero no se limitan a, luciferasa (por ejemplo, bacteriana, de luciérnaga y de escarabajo), luciferina, aecuorina y similares. Ejemplos de sistemas enzimáticos que tienen señales visualmente detectables comprenden, pero no se limitan a, galactosidasas, glucorimididasas, fosfatidasas, peroxididasas y colinesterasas. Los marcadores identificables también comprenden compuestos radiactivos tales como ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³H. Los marcadores identificables están disponibles comercialmente a partir de una variedad de fuentes.

Ejemplos de marcadores fluorescentes y nucleótidos y/o polinucleótidos conjugados a dichos marcadores fluorescentes comprenden los descritos en, por ejemplo, Hoagland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, novena edición (Molecular Probes, Inc., Eugene, 2002); Keller y Manak, DNA Probes, 2da edición (Stockton Press, Nueva York, 1993); Eckstein, editor, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1991); y Wetmur, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 26:227-259 (1991). En algunas modalidades, las técnicas, métodos y metodologías ilustrativas aplicables a las modalidades proporcionadas comprenden las descritas en, por ejemplo, los documentos US 4,757,141, US 5,151,507 y US 5,091,519. En algunas modalidades, se usan uno o más colorantes fluorescentes como marcadores para secuencias diana marcadas, por ejemplo, como se describió en los documentos US 5,188,934 (colorantes de 4,7-diclorofluoresceína); US 5,366,860 (colorantes de rodamina que pueden resolverse espectralmente); US 5,847,162 (colorantes de 4,7-diclororodamina); US 4,318,846 (colorantes de fluoresceína sustituidos con éter); US 5,800,996 (colorantes de transferencia de energía); US 5,066,580 (colorantes de xantina); y US 5,688,648 (colorantes de transferencia de energía). El marcaje también puede llevarse a cabo con puntos cuánticos, como se describió en los documentos US 6,322,901, US 6,576,291, US 6,423,551, US 6,251,303, US 6,319,426, US 6,426,513, US 6,444,143, US 5,990,479, US 6,207,392, US 2002/0045045 y US 2003/0017264. Como se usa en la presente, el término "marcador fluorescente" comprende un resto de señalización que transmite información a través de las propiedades de absorción y/o emisión de fluorescencia de una o más moléculas. Las propiedades de fluorescencia ilustrativas comprenden la intensidad de la fluorescencia, la vida útil de la fluorescencia, las características del espectro de emisión y la transferencia de energía.

Los ejemplos de análogos de nucleótidos fluorescentes disponibles comercialmente incorporados fácilmente en secuencias de nucleótidos y/o polinucleótidos comprenden, pero no se limitan a, Cy3-dCTP, Cy3-dUTP, Cy5-dCTP, Cy5-dUTP (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.), fluoresceína-12-dUTP, tetrametilrodamina-6-dUTP, TEXAS RED™-5-dUTP, CASCADE BLUE™-7-dUTP, BODIPY™ TMFL-14-dUTP, BODIPY™ TMR-14-dUTP, BODIPY™ TMTR-14-dUTP, RHODAMINE GREEN™-5-dUTP, OREGON GREEN™ 488-5-dUTP, TEXAS RED™-12-dUTP, BODIPY™ 630/650-14-dUTP, BODIPY™ 650/665-14-dUTP, ALEXA FLUOR™ 488-5-dUTP, ALEXA FLUOR™ 532-5-dUTP, ALEXA FLUOR™ 568-5-dUTP, ALEXA FLUOR™ 594-5-dUTP, ALEXA FLUOR™ 546-14-dUTP, fluoresceína-12-UTP, tetrametilrodamina-6-UTP, TEXAS RED™-5-UTP, mCherry, CASCADE BLUE™-7-UTP, BODIPY™ FL-14-UTP, BODIPY™ TR-14-UTP, BODIPY™ TR-14-UTP, RHODAMINE GREEN™-5-UTP, ALEXA FLUOR™ 488-5-UTP, y ALEXA FLUOR™ 546-14-UTP (Molecular Probes, Inc. Eugene, Oreg.). La síntesis personalizada de nucleótidos que tienen otros fluoróforos puede encontrarse en Henegariu y otros (2000) Nature Biotechnol. 18:345).

Otros fluoróforos disponibles para la unión postsintética comprenden, pero no se limitan a, ALEXA FLUOR™ 350, ALEXA FLUOR™ 532, ALEXA FLUOR™ 546, ALEXA FLUOR™ 568, ALEXA FLUOR™ 594, ALEXA FLUOR™ 647, BODIPY 493/503, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY 530/550, BODIPY TMR, BODIPY 558/568, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, azul Cascade, amarillo Cascade, dansilo, rodamina B de lisamina, azul Marina, verde Oregon 488, verde Oregon 514, azul Pacífico, rodamina 6G, verde rodamina, rojo rodamina, tetrametilrodamina, rojo Texas (disponible de Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.), Cy2, Cy3.5, Cy5.5, y Cy7 (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.). También pueden usarse fluoróforos en tándem FRET, que comprenden, pero no se limitan a, los colorantes PerCP-Cy5.5, PE-Cy5, PE-Cy5.5, PE-Cy7, PE-rojo Texas, APC-Cy7, PE-Alexa (610, 647, 680) y los colorantes APC-Alexa.

En algunos casos, pueden usarse partículas metálicas de plata u oro para potenciar la señal de secuencias de nucleótidos y/o polinucleótidos marcadas con fluorescencia (Lakowicz y otros (2003) Bio Techniques 34:62).

La biotina, o un derivado de esta, también puede usarse como marcador en un nucleótido y/o una secuencia de polinucleótidos, y unirse subsecuentemente a un derivado de avidina/estreptavidina marcado de manera detectable (por ejemplo, estreptavidina conjugada con ficoeritrina), o un anticuerpo anti-biotina marcado de manera detectable. La digoxigenina puede incorporarse como marcador y unirse subsecuentemente a un anticuerpo antidigoxigenina marcado de manera detectable (por ejemplo, antidigoxigenina fluoresceinado). Puede incorporarse un residuo aminoalil-dUTP en una secuencia de polinucleótidos y acoplarse subsecuentemente a un colorante fluorescente derivatizado con N-hidroxisuccinimida (NHS). En general, cualquier miembro de un par de conjugados puede incorporarse en un polinucleótido de detección siempre y cuando una pareja del conjugado marcado de manera detectable pueda unirse para permitir la detección. En algunas modalidades, un anticuerpo se refiere a una molécula de anticuerpo de cualquier clase, o cualquier subfragmento de este, tal como un Fab.

Otros marcadores adecuados para una secuencia de polinucleótidos pueden comprender fluoresceína (FAM), digoxigenina, dinitrofenol (DNP), dansilo, biotina, bromodesoxiuridina (BrdU), hexahistidina (6xHis), y fosforaminoácidos (por ejemplo, P-tyr, P-ser, P-thr). En algunas modalidades, los siguientes pares hapteno/anticuerpo se usan para la detección, en la que cada uno de los anticuerpos se derivatiza con un marcador detectable: biotina/a-biotina, digoxigenina/a-digoxigenina, dinitrofenol (DNP)/a-DNP, 5-carboxifluoresceína (FAM)/a-FAM.

En algunas modalidades, un nucleótido y/o una secuencia de polinucleótidos pueden marcarse indirectamente, especialmente con un hapteno que después se une a un agente de captura, por ejemplo, como se describió en los documentos US 5,344,757, US 5,702,888, US 5,354,657, US 5,198,537 y US 4,849,336, y la publicación PCT WO 1991/017160. Se dispone de muchos pares diferentes de hapteno-agente de captura para su uso. Los haptenos ilustrativos comprenden, pero no se limitan a, biotina, des-biotina y otros derivados, dinitrofenol, dansilo, fluoresceína,

Cy5 y digoxigenina. Para la biotina, un agente de captura puede ser avidina, estreptavidina, o anticuerpos. Los anticuerpos pueden usarse como agentes de captura para otros haptenos (muchos pares colorante-anticuerpo están disponibles comercialmente, por ejemplo, Molecular Probes, Eugene, Oreg.).

5 En algunos aspectos, el análisis y/o la determinación de secuencias pueden llevarse a cabo a temperatura ambiente para una mejor conservación de la morfología tisular con bajo ruido de fondo y reducción de errores. En algunas modalidades, el análisis y/o la determinación de secuencias comprenden eliminar la acumulación de errores a medida que avanza la secuenciación.

10 En algunas modalidades, el análisis y/o la determinación de secuencias implica el lavado para eliminar los polinucleótidos no unidos, revelando posteriormente un producto fluorescente para la obtención de imágenes.

15 En algunos aspectos, la detección implica el uso de métodos de detección tales como citometría de flujo; secuenciación; unión de sonda y detección electroquímica; alteración del pH; catálisis inducida por enzimas unidas a etiquetas de ADN; entrelazamiento cuántico; espectroscopía de Raman; tecnología de onda de terahertz; y/o microscopía electrónica de barrido. En algunos aspectos, la citometría de flujo es citometría de masa o citometría de flujo activada por fluorescencia. En algunos aspectos, la detección comprende realizar microscopía, espectrometría de masas de barrido u otras técnicas de obtención de imágenes descritas en la presente descripción. En dichos aspectos, la detección comprende determinar una señal, por ejemplo, una señal fluorescente.

20 En algunos aspectos, la detección (que comprende la obtención de imágenes) se lleva a cabo mediante el uso de cualquiera de una serie de tipos diferentes de microscopía, por ejemplo, microscopía confocal, microscopía de dos fotones, microscopía de campo claro, microscopía de expansión de tejido intacto, y/o microscopía de lámina de luz optimizada con CLARITY™ (COLM).

25 En algunas modalidades, se usa la microscopía de fluorescencia para la detección y la obtención de imágenes de la sonda de detección. En algunos aspectos, un microscopio de fluorescencia es un microscopio óptico que usa fluorescencia y fosforescencia en lugar de, o además de, la reflexión y la absorción para estudiar las propiedades de sustancias orgánicas o inorgánicas. En la microscopía de fluorescencia, una muestra se ilumina con luz de una longitud de onda que excita la fluorescencia en la muestra. A continuación, se obtienen imágenes de la luz fluorescente, que está normalmente a una longitud de onda más larga que la iluminación, a través de un objetivo de microscopio. En esta técnica pueden usarse dos filtros; un filtro de iluminación (o excitación) que asegura que la iluminación esté cerca de la monocromática y a la longitud de onda correcta, y un segundo filtro de emisión (o barrera) que asegura que ninguna fuente de luz de excitación alcance el detector. Alternativamente, ambas funciones pueden llevarse a cabo mediante un único filtro dicróico. El "microscopio de fluorescencia" comprende cualquier microscopio que usa fluorescencia para generar una imagen, ya sea una configuración más simple como un microscopio de epifluorescencia, o un diseño más complicado tal como un microscopio confocal, que usa seccionamiento óptico para obtener una mejor resolución de la imagen fluorescente.

40 En algunas modalidades, la microscopía confocal se usa para la detección y obtención de imágenes de la sonda de detección. La microscopía confocal usa iluminación puntual y una apertura espacial en un plano óptico conjugado en frente del detector para eliminar la señal desenfocada. Como solo puede detectarse la luz producida por fluorescencia muy cercana al plano focal, la resolución óptica de la imagen, particularmente en la dirección de la profundidad de la muestra, es mucho mejor que la de los microscopios de campo amplio. Sin embargo, dado que gran parte de la luz de la fluorescencia de la muestra se bloquea en la apertura espacial, este aumento de la resolución se produce a costa de la disminución de la intensidad de la señal, por lo que a menudo se requieren exposiciones largas. Como solo se ilumina un punto en la muestra a la vez, la obtención de imágenes 2D o 3D requiere un barrido sobre una trama regular (por ejemplo, un patrón rectangular de líneas de barrido paralelas) en el espécimen. El grosor alcanzable del plano focal se define principalmente por la longitud de onda de la luz usada dividida por la abertura numérica de la lente del objetivo, pero también por las propiedades ópticas del espécimen. El seccionamiento óptico fino hace posible que estos tipos de microscopios sean particularmente buenos en la obtención de imágenes 3D y la caracterización superficial de muestras. La microscopía de lámina de luz optimizada con CLARITY™ (COLM) proporciona una microscopía alternativa para la obtención rápida de imágenes 3D de muestras clarificadas grandes. COLM pesquisa tejidos inmunotñidos grandes, permite el aumento de la velocidad de adquisición y da como resultado una mayor calidad de los datos generados.

60 Otros tipos de microscopía que pueden emplearse comprenden microscopía de campo claro, microscopía de iluminación oblicua, microscopía de campo oscuro, contraste de fases, microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC), microscopía de reflexión de interferencia (también conocida como contraste de interferencia reflejado, o RIC), microscopía de iluminación de plano único (SPIM), microscopía de superresolución, microscopía láser, microscopía electrónica (EM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de reflexión (REM), microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM) y microscopía electrónica de bajo voltaje (LVEM), microscopía de sonda de barrido (SPM), microscopía de fuerza atómica (ATM), microscopía de emisión de electrones balísticos (BEEM), microscopía de fuerza química (CFM), 65 microscopía de fuerza atómica conductora (C-AFM), microscopio de efecto túnel electroquímico de barrido (ECSTM), microscopía de fuerza electrostática (EFM), microscopio de fuerza de fluidos (FluidFM), microscopía de modulación

de fuerza (FMM), microscopía de sonda de barrido orientada a funciones (FOSPM), microscopía de fuerza de sonda kelvin (KPFM), microscopía de fuerza magnética (MFM), microscopía de fuerza de resonancia magnética (MRFM), microscopía óptica de barrido de campo cercano (NSOM) (o SNOM, microscopía óptica de campo cercano de barrido, microscopía de fuerza de respuesta piezoeléctrica (PFM), microscopía de efecto túnel de barrido de fotones (PSTM), microscopía/microespectroscopía fototérmica (PTMS), microscopía de capacitancia de barrido (SCM), microscopía electroquímica de barrido (SECM), microscopía de puerta de barrido (SGM), microscopía de sonda Hall de barrido (SHPM), microscopía de conductancia iónica de barrido (SICM), microscopía de efecto túnel de barrido polarizado en espín (SPSM), microscopía de resistencia a la dispersión de barrido (SSRM), microscopía térmica de barrido (SThM), microscopía de efecto túnel de barrido (STM), potenciometría de efecto túnel de barrido (STP), microscopía de voltaje de barrido (SVM), y microscopía de efecto túnel de barrido con rayos X de sincrotrón (SXSTM), y microscopía de expansión de tejido intacto (exM).

En algunas modalidades, la secuenciación puede realizarse *in situ*. La secuenciación *in situ* implica típicamente la incorporación de un nucleótido marcado (por ejemplo, mononucleótidos o dinucleótidos marcados con fluorescencia) de manera secuencial dependiente de plantilla o la hibridación de un cebador marcado (por ejemplo, un hexámero aleatorio marcado) a una plantilla de ácido nucleico de manera que pueden determinarse las identidades (por ejemplo, secuencia de nucleótidos) de los nucleótidos incorporados o productos de extensión del cebador marcados, y en consecuencia, la secuencia de nucleótidos de la plantilla de ácido nucleico correspondiente. Aspectos de la secuenciación *in situ* se describen, por ejemplo, en Mitra y otros, (2003) *Anal. Biochem.* 320, 55-65, y Lee y otros, (2014) *Science*, 343(6177), 1360-1363. Además, ejemplos de métodos y sistemas para realizar la secuenciación *in situ* se describen en los documentos US 2016/0024555, US 2019/0194709, y en los documentos US 10,138,509, US 10,494,662 y US. 10,179,932. Técnicas ilustrativas para la secuenciación *in situ* comprenden, pero no se limitan a, STARmap (descrita, por ejemplo, en Wang y otros, (2018) *Science*, 361(6499) 5691), MERFISH (descrita, por ejemplo, en Moffitt, (2016) *Methods in Enzymology*, 572, 1-49), secuenciación *in situ* basada en hibridación (HybISS) (descrita, por ejemplo, en Gyllborg y otros, *Nucleic Acids Res* (2020) 48(19):e112, y FISSEQ (descrita, por ejemplo, en el documento US 2019/0032121).

En algunas modalidades, la secuenciación puede realizarse mediante secuenciación por síntesis (SBS). En algunas modalidades, un cebador para secuenciación es complementario a secuencias en o cerca de los uno o más códigos de barras. En dichas modalidades, la secuenciación por síntesis puede comprender la transcripción inversa y/o amplificación para generar una secuencia plantilla a partir de la cual puede unirse una secuencia del cebador. Métodos de SBS ilustrativos comprenden los descritos en, por ejemplo, pero no limitados a, los documentos US 2007/0166705, US 2006/0188901, US 7,057,026, US 2006/0240439, US 2006/0281109, US 2011/005986, US 2005/0100900, US 9,217,178, US 2009/0118128, US 2012/0270305, US 2013/0260372, y US 2013/0079232.

En algunas modalidades, el análisis de secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, ácidos nucleicos tales como sondas o productos de RCA que comprenden secuencias de código de barras generados mediante el uso del ácido nucleico circular como plantilla) puede realizarse mediante hibridación secuencial (por ejemplo, secuenciación mediante hibridación y/o hibridación *in situ* fluorescente secuencial). La hibridación fluorescente secuencial puede implicar la hibridación secuencial de sondas detectables que comprenden un oligonucleótido y un marcador detectable. En algunas modalidades, un método descrito en la presente descripción comprende la hibridación secuencial de las sondas detectables descritas en la presente descripción, lo que incluye sondas marcadas de manera detectable (por ejemplo, oligonucleótidos conjugados con fluoróforo) y/o sondas que no se marcan de manera detectable *per se* pero que son capaces de unirse (por ejemplo, mediante hibridación de ácido nucleico) y detectarse mediante sondas marcadas de manera detectable. Métodos ilustrativos que comprenden la hibridación fluorescente secuencial de sondas detectables se describen en los documentos US 2019/0161796, US 2020/0224244, US 2022/0010358, US 2021/0340618, y WO 2021/138676. En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción pueden incluir analizar las secuencias identificadoras (por ejemplo, secuencias de analitos o secuencias de códigos de barras) mediante la hibridación secuencial y la detección con una pluralidad de sondas marcadas (por ejemplo, oligonucleótidos de detección).

En algunas modalidades, la detección de secuencias comprende poner en contacto la muestra biológica con una o más sondas intermedias que se hibridan directa o indirectamente con el producto de la amplificación por círculo rodante, en donde la una o más sondas intermedias son detectables mediante el uso de una o más sondas marcadas de manera detectable, y deshibridar la una o más sondas intermedias y/o la una o más sondas marcadas de manera detectable del producto de la amplificación por círculo rodante. En algunas modalidades, la una o más sondas intermedias comprenden una o más regiones salientes (por ejemplo, un extremo 5' y/o 3' de la sonda que no se hibrida con el producto de la amplificación por círculo rodante). Una sonda que comprende una única región saliente puede denominarse como una "sonda en forma de L", y una sonda que comprende dos salientes puede denominarse como una "sonda en forma de U". En algunos casos, la región saliente comprende una región de unión para unir una o más sondas marcadas de manera detectable. En algunas modalidades, la detección comprende poner en contacto la muestra biológica con una mezcla de sondas intermedias que corresponden a diferentes secuencias de código de barras o porciones de estas, y una mezcla de sondas marcadas de manera detectable que corresponden a diferentes marcadores detectables. En algunas modalidades, la muestra biológica se pone en contacto secuencialmente con diferentes mezclas de sondas intermedias. En algunos casos, se usa una mezcla común o universal de sondas

marcadas de manera detectable en una pluralidad de etapas de hibridación secuencial (por ejemplo, con diferentes mezclas de sondas intermedias).

5 En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan métodos para el análisis *in situ* de analitos en una muestra mediante el uso de hibridación secuencial con sondas. En algunos aspectos, en la presente descripción se proporciona un método para analizar una muestra biológica, que comprende: a) generar un producto de la amplificación por círculo rodante (RCP) de una sonda circular descrita en la presente descripción, el RCP comprende una secuencia identificadora tal como una secuencia de código de barras o una secuencia de analito, en donde la secuencia identificadora se asocia con un analito de interés y se le asigna una secuencia de código señal; b) poner en contacto la muestra biológica con una primera sonda (por ejemplo, una sonda intermedia tal como una sonda L) y una primera sonda marcada de manera detectable para generar un primer complejo que comprende la primera sonda hibridada al RCP y la primera sonda marcada de manera detectable hibridada a la primera sonda, en donde la primera sonda comprende (i) una secuencia de reconocimiento (por ejemplo, una secuencia de unión a la diana) complementaria a la secuencia identificadora (por ejemplo, secuencia de código de barras o secuencia de analito) y (ii) una primera secuencia de inicio (por ejemplo, una secuencia saliente), y en donde la primera sonda marcada de manera detectable comprende una secuencia complementaria a la primera secuencia de inicio; c) detectar una primera señal asociada con la primera sonda marcada de manera detectable, en donde la primera señal corresponde a un primer código señal en la secuencia del código señal; d) poner en contacto la muestra biológica con una segunda sonda (por ejemplo, una sonda intermedia tal como una sonda L) y una segunda sonda marcada de manera detectable para generar un segundo complejo que comprende la segunda sonda hibridada al RCP y la segunda sonda marcada de manera detectable hibridada a la segunda sonda, en donde la segunda sonda comprende (i) una secuencia de reconocimiento (por ejemplo, una secuencia de unión a la diana) complementaria a la secuencia identificadora (por ejemplo, secuencia de código de barras o secuencia de analito) y (ii) una segunda secuencia de inicio (por ejemplo, una secuencia saliente), y en donde la segunda sonda marcada de manera detectable comprende una secuencia complementaria a la segunda secuencia de inicio; y e) detectar una segunda señal asociada con la segunda sonda marcada de manera detectable, en donde la segunda señal corresponde a un segundo código señal en la secuencia del código señal, en donde la secuencia del código señal que comprende el primer código señal y el segundo código señal se determina en una ubicación en la muestra biológica, descodificando de esta manera la secuencia identificadora (por ejemplo, secuencia de código de barras o secuencia de analito) e identificar el analito de interés en la ubicación en la muestra biológica. En algunas modalidades, el marcador detectable de la primera sonda marcada de manera detectable y el marcador detectable de la segunda sonda marcada de manera detectable son el mismo.

En algunas modalidades, los marcadores detectables de la primera sonda marcada de manera detectable y la segunda sonda marcada de manera detectable son diferentes. En algunas modalidades, el primer código señal y el segundo código señal son el mismo. En algunas modalidades, el primer código señal y el segundo código señal son diferentes.

En algunas modalidades, la primera sonda (por ejemplo, una primera sonda intermedia tal como una primera sonda L), la segunda sonda (por ejemplo, una segunda sonda intermedia tal como una segunda sonda L), y una o más sondas subsecuentes (por ejemplo, sonda intermedia subsecuente tal como sondas L subsecuentes) se ponen en contacto con la muestra biológica secuencialmente en una secuencia predeterminada que corresponde a la secuencia de código señal asignada a la secuencia identificadora (por ejemplo, secuencia de código de barras o secuencia de analito), en donde la una o más sondas subsecuentes comprenden cada una (i) una secuencia de reconocimiento complementaria a la secuencia identificadora (por ejemplo, secuencia de código de barras o secuencia de analito) y (ii) una secuencia saliente complementaria a una sonda marcada de manera detectable de una mezcla (por ejemplo, una mezcla universal a través de diferentes ciclos de hibridación con sondas) de sondas marcadas de manera detectable. En algunas modalidades, la muestra biológica se pone en contacto con la primera sonda antes de la segunda sonda y una o más sondas subsecuentes. En algunas modalidades, la muestra biológica se pone en contacto con la segunda después de la primera sonda y antes de una o más sondas subsecuentes. En algunas modalidades, la muestra biológica se pone en contacto con la una o más sondas subsecuentes después de la primera sonda. En algunas modalidades, la muestra biológica se pone en contacto con la una o más sondas subsecuentes después de la primera sonda y la segunda sonda.

En algunas modalidades, la primera sonda marcada de manera detectable y la segunda sonda marcada de manera detectable están en la mezcla de sondas marcadas de manera detectable. Una mezcla de sondas marcadas de manera detectable puede comprender al menos dos sondas marcadas de manera detectable, y puede usarse para análisis multiplexados de dos o más analitos diana (por ejemplo, ácidos nucleicos diana) en una muestra biológica. En algunas modalidades, la entrada en contacto en b) comprende poner en contacto la muestra biológica con la mezcla universal de sondas marcadas de manera detectable, y la entrada en contacto en d) comprende poner en contacto la muestra biológica con la mezcla universal de sondas marcadas de manera detectable. En algunas modalidades, la mezcla universal de sondas marcadas de manera detectable usadas en la entrada en contacto en b) es la misma que la mezcla universal de sondas marcadas de manera detectable usadas en la entrada en contacto en d). En algunas modalidades, la mezcla universal comprende sondas marcadas de manera detectable, teniendo cada una un marcador detectable que corresponde a una secuencia de ácido nucleico diferente para la hibridación con una secuencia de inicio (por ejemplo, una secuencia saliente) en una sonda (por ejemplo, una sonda intermedia tal como una sonda L).

65

En algunas modalidades, el número de sondas marcadas de manera detectable diferentes en la mezcla universal es cuatro.

En algunas modalidades, la una o más sondas subsecuentes se ponen en contacto con la muestra biológica para determinar los códigos señal en la secuencia de código señal hasta que se hayan determinado suficientes códigos señal para decodificar la secuencia identificadora (por ejemplo, secuencia de código de barras o secuencia de analito), identificando de esta manera el analito diana (por ejemplo, ácido nucleico diana). En algunas modalidades, el método comprende además una etapa de retirar la primera sonda y/o la primera sonda marcada de manera detectable de la muestra biológica antes de poner en contacto la muestra con una sonda subsecuente y una sonda marcada de manera detectable que se hibrida con la sonda subsecuente. En algunas modalidades, el método comprende además una etapa de retirar la segunda sonda y/o la segunda sonda marcada de manera detectable de la muestra biológica, antes de poner en contacto la muestra con una sonda subsecuente y una sonda marcada de manera detectable que se hibrida con la sonda subsecuente.

En algunas modalidades, el método comprende además identificar múltiples analitos diana diferentes presentes en ubicaciones (por ejemplo, diferentes ubicaciones) en la muestra biológica. En algunas modalidades, a cada analito diana diferente se le asigna una secuencia de código señal diferente y son la diana de una sonda o conjunto de sondas circular o circularizable que comprende un complemento de una secuencia de código de barras diferente de la pluralidad de secuencias de código de barras. En algunas modalidades, el número de sondas diferentes (por ejemplo, sondas L que tienen diferentes secuencias de reconocimiento que se unen a las secuencias de código de barras) en cada mezcla de sondas, es mayor que el número de sondas marcadas de manera detectable diferentes en la mezcla universal de sondas marcadas de manera detectable. En algunas modalidades, el número de sondas marcadas de manera detectable diferentes en la mezcla universal es cuatro. En algunas modalidades, el número de sondas diferentes en cada mezcla de sondas (por ejemplo, sondas L) es aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 500, aproximadamente 1000, o más. En algunas modalidades, el número de secuencias de reconocimiento diferentes (por ejemplo, secuencias de reconocimiento que se unen a las secuencias de código de barras) de sondas en cada mezcla de sondas es al menos aproximadamente 10, tal como al menos cualquiera de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, o más.

En algunas modalidades, la secuenciación puede realizarse mediante el uso de secuenciación por ligadura de molécula única. Dichas técnicas utilizan una ADN ligasa para incorporar oligonucleótidos e identificar la incorporación de dichos oligonucleótidos. Los oligonucleótidos tienen típicamente diferentes marcadores que se correlacionan con la identidad de un nucleótido en particular en una secuencia con la que se hibridan los oligonucleótidos. Los aspectos y elementos implicados en la secuenciación por ligadura se describen, por ejemplo, en Shendure y otros, *Science* (2005), 309: 1728-1732, y en los documentos US 5,599,675; US 5,750,341; US 6,969,488; US 6,172,218; y US 6,306,597.

En algunas modalidades, los códigos de barras de las sondas (por ejemplo, la sonda candado o la primera y/o segunda sonda) son la diana de oligonucleótidos de detección marcados de manera detectable, tales como oligonucleótidos marcados con fluorescencia. En algunas modalidades, se usan uno o más esquemas de descodificación para descodificar las señales, tales como la fluorescencia, para la determinación de la secuencia. En cualquiera de las modalidades en la presente descripción, los códigos de barras (por ejemplo, secuencias de código de barras primarias y/o secundarias) pueden analizarse (por ejemplo, detectarse o secuenciarse) mediante el uso de cualquier método o técnica adecuado, que comprende los descritos en la presente descripción, tales como sondeos secuenciales de ARN de dianas (SPOT de ARN), hibridación *in situ* fluorescente secuencial (seqFISH), hibridación *in situ* fluorescente de molécula única (smFISH), hibridación *in situ* con fluorescencia resistente a error multiplexada (MERFISH), secuenciación *in situ* basada en hibridación (HybISS), secuenciación *in situ*, secuenciación dirigida *in situ*, secuenciación *in situ* fluorescente (FISSEQ), o mapeo de lectura de amplicones de transcritos resueltos espacialmente (STARmap). En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción comprenden analizar los códigos de barras mediante hibridación secuencial y detección con una pluralidad de sondas marcadas (por ejemplo, oligonucleótidos de detección). Esquemas de descodificación ilustrativos se describen en Eng y otros, "Transcriptome-scale Super-Resolved Imaging in Tissues by RNA SeqFISH+", *Nature* 568(7751):235-239 (2019); Chen y otros, "Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells", *Science*; 348(6233):aaa6090 (2015); Gyllborg y otros, *Nucleic Acids Res* (2020) 48(19):e112; los documentos US 10,457,980 B2; US 2016/0369329 A1; WO 2018/026873 A1; y US 2017/0220733 A1. En algunas modalidades, estos ensayos permiten la amplificación de la señal, la descodificación combinatoria, y los esquemas de corrección de errores al mismo tiempo.

En algunas modalidades, puede usarse la hibridación de ácidos nucleicos para la secuenciación. Estos métodos utilizan sondas descodificadoras de ácido nucleico marcadas que son complementarias a al menos una porción de una secuencia de código de barras. La descodificación multiplexada puede realizarse con mezclas de muchas sondas diferentes con marcadores distinguibles. Ejemplos no limitantes de secuenciación por hibridación de ácidos nucleicos se describen, por ejemplo, en el documento US 8,460,865, y en Gunderson y otros, *Genome Research* 14:870-877 (2004).

En algunas modalidades, puede usarse el monitoreo en tiempo real de la actividad de la ADN polimerasa durante la secuenciación. Por ejemplo, las incorporaciones de nucleótidos pueden detectarse a través de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), como se describió, por ejemplo, en Levene y otros, *Science* (2003), 299, 682-686, Lundquist y otros, *Opt. Lett.* (2008), 33, 1026-1028, y Korlach y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2008), 105, 1176-1181.

VI. Kits

En la presente descripción también se proporcionan kits, por ejemplo, que comprenden una o más sondas (por ejemplo, ácidos nucleicos circulares) y polinucleótidos, por ejemplo, cualquiera de los descritos en la Sección III, y reactivos para realizar los métodos proporcionados en la presente descripción, por ejemplo, reactivos requeridos para una o más etapas que comprenden hibridación, ligadura, amplificación, detección, secuenciación, y/o preparación de muestras, como se describió en la presente descripción. El kit puede comprender además un ácido nucleico diana, por ejemplo, cualquiera de los descritos en la Sección III. Cualquiera o todas las sondas y/o polinucleótidos pueden ser moléculas de ADN. El ácido nucleico diana puede ser una molécula de ARN mensajero. El kit puede comprender además una ligasa, por ejemplo, para formar una sonda circular a partir de la sonda candado. La ligasa puede tener actividad de ADN ligasa con puente de ADN. La ligasa puede tener actividad de ligasa con puente de ARN. El kit puede comprender además una polimerasa, por ejemplo, para realizar la amplificación de la sonda candado, por ejemplo, mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la Sección V. El kit puede comprender además un cebador para la amplificación.

En la presente descripción se describe un kit para analizar una muestra biológica, que comprende: (i) una mezcla de unión que comprende una pluralidad de complejos que comprende cada uno una polimerasa unida a un cebador, y un agente quelante, en donde la mezcla de unión está sustancialmente libre de desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP); y (ii) una mezcla de reacción de extensión del cebador que comprende dNTP y un dicatión, en donde la mezcla de reacción de extensión del cebador está sustancialmente libre de la polimerasa. Los cebadores en la pluralidad de complejos pueden ser el mismo. Alternativamente, los cebadores en dos o más de la pluralidad de complejos pueden ser diferentes. La polimerasa puede ser ADN polimerasa Phi29 y el dicatión puede ser Mg^{2+} , Co^{2+} , y/o Mn^{2+} .

Los diversos componentes del kit pueden estar presentes en contenedores separados o ciertos componentes compatibles pueden combinarse previamente en un único contenedor. Los kits pueden contener además instrucciones para usar los componentes del kit para llevar a la práctica los métodos proporcionados.

Los kits pueden contener reactivos y/o consumibles necesarios para realizar una o más etapas de los métodos proporcionados. Los kits pueden contener reactivos para fijar, incluir, y/o permeabilizar la muestra biológica. Los kits pueden contener reactivos, tales como enzimas y tampones para la ligadura y/o la amplificación, tales como ligasas y/o polimerasas. El kit puede comprender además cualquiera de los reactivos descritos en la presente descripción, por ejemplo, tampón de lavado y tampón de ligadura. Los kits pueden contener reactivos para la detección y/o la secuenciación, tales como sondas de detección de códigos de barras o marcadores detectables. Los kits contienen opcionalmente otros componentes, por ejemplo, cebadores de ácido nucleico, enzimas y reactivos, tampones, nucleótidos, nucleótidos modificados, reactivos para ensayos adicionales.

VII. Aplicaciones

En algunos aspectos, las modalidades proporcionadas pueden aplicarse en un método *in situ* para analizar secuencias de ácidos nucleicos, tales como un análisis transcriptómico *in situ* o secuenciación *in situ*, por ejemplo, a partir de muestras o tejidos intactos en los que se ha conservado la información espacial. En algunos aspectos, las modalidades pueden aplicarse en un método para la obtención de imágenes o de detección para el análisis de ácidos nucleicos multiplexado. En algunos aspectos, las modalidades proporcionadas pueden usarse para identificar o detectar regiones de interés en ácidos nucleicos diana.

En algunas modalidades, la región de interés comprende un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). En algunas modalidades, la región de interés comprende una variante de un solo nucleótido (SNV). En algunas modalidades, la región de interés comprende una sustitución de un solo nucleótido. En algunas modalidades, la región de interés comprende una mutación puntual. En algunas modalidades, la región de interés comprende una inserción de un solo nucleótido.

En algunos aspectos, las modalidades pueden aplicarse en aplicaciones de investigación y/o diagnóstico, por ejemplo, para la caracterización o evaluación de una célula o tejido en particular de un sujeto. Las aplicaciones del método proporcionado pueden comprender la investigación biomédica y el diagnóstico clínico. Por ejemplo, en la investigación biomédica, las aplicaciones comprenden, pero no se limitan a, análisis de la expresión génica resuelta espacialmente para investigación biológica o tamizaje de fármacos. En el diagnóstico clínico, las aplicaciones comprenden, pero no se limitan a, detectar marcadores génicos tales como enfermedad, respuestas inmunitarias, ADN/ARN bacteriano o viral para muestras de pacientes.

En algunos aspectos, las modalidades pueden aplicarse para visualizar la distribución de marcadores genéticamente codificados en tejido completo a resolución subcelular, por ejemplo, anomalías cromosómicas (inversiones, duplicaciones, translocaciones, etc.), pérdida de heterocigosidad genética, presencia de alelos génicos indicativos de una predisposición hacia enfermedad o buena salud, posibilidad de capacidad de respuesta a la terapia, o en medicina personalizada o ascentralidad.

VIII. Terminología

Se usa terminología específica a lo largo de esta descripción para explicar diversos aspectos de los aparatos, sistemas, métodos y composiciones que se describen.

Habiendo descrito algunas modalidades ilustrativas de la presente descripción, debería ser evidente para los expertos en la técnica que lo anterior es solamente ilustrativo y no limitante, y que se ha presentado solo a manera de ejemplo. Numerosas modificaciones y otras modalidades ilustrativas están dentro del alcance de la presente descripción. En particular, aunque muchos de los ejemplos presentados en la presente descripción implican combinaciones específicas de actos del método o elementos del sistema, debe entenderse que esos actos y esos elementos pueden combinarse de otras maneras para lograr los mismos objetivos.

Como se usa en la presente, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera. Por ejemplo, "un" o "una" significa "al menos uno/una" o "uno/una o más".

El término "aproximadamente", como se usa en la presente, se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en la presente descripción incluye (y describe) modalidades que se dirigen a ese valor o parámetro per se. A lo largo de esta descripción, diversos aspectos del objeto reivindicado se presentan en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es solamente para conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible en el alcance del objeto reivindicado. En consecuencia, la descripción de un intervalo debe considerarse que ha descrito específicamente todos los posibles subintervalos, así como también valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese intervalo, y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado, está abarcado dentro del objeto reivindicado. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también están abarcados dentro del objeto reivindicado, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también están incluidos en el objeto reivindicado. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

El uso de términos ordinales tales como "primero", "segundo", "tercero", etc., en las reivindicaciones para modificar un elemento reivindicado no connota por sí mismo ninguna prioridad, precedencia, u orden de un elemento reivindicado sobre otro o el orden temporal en el que se realizan los actos de un método, sino que se usan solamente como marcadores para distinguir un elemento reivindicado que tiene un cierto nombre de otro elemento que tenga el mismo nombre (excepto por el uso del término ordinal) para distinguir los elementos reivindicados. De manera similar, el uso de a), b), etc., o i), ii), etc. no connota por sí mismo ninguna prioridad, precedencia, u orden de las etapas en las reivindicaciones. De manera similar, el uso de estos términos en la descripción no connota por sí mismo ninguna prioridad, precedencia, u orden requeridos.

(i) Código de barras

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

Los códigos de barras pueden tener una variedad de formatos diferentes. Por ejemplo, los códigos de barras pueden incluir códigos de barras de polinucleótidos, secuencias de aminoácidos y/o ácidos nucleicos aleatorias, y secuencias de aminoácidos y/o ácidos nucleicos sintéticos. Un código de barras puede unirse a un analito o a otro resto o estructura de manera reversible o irreversible. Un código de barras puede añadirse, por ejemplo, a un fragmento de una muestra de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) antes o durante la secuenciación de la muestra. Los códigos de barras pueden permitir la identificación y/o cuantificación de lecturas de secuenciación individuales (por ejemplo, un código de barras puede ser o puede incluir un identificador molecular único o "UMI").

Los códigos de barras pueden resolver espacialmente componentes moleculares encontrados en muestras biológicas, por ejemplo, en resolución de célula única (por ejemplo, un código de barras puede ser o puede incluir un "código de barras espacial"). En algunas modalidades, un código de barras incluye tanto un UMI como un código de barras

espacial. En algunas modalidades, un código de barras incluye dos o más subcódigos de barras que funcionan juntos como un único código de barras. Por ejemplo, un código de barras de polinucleótidos puede incluir dos o más secuencias polinucleotídicas (por ejemplo, subcódigos de barras) que están separadas por una o más secuencias que no son de código de barras.

5

(ii) Ácido nucleico y nucleótido

Los términos “ácido nucleico” y “nucleótido” pretenden ser consistentes con su uso en la técnica e incluir especies de origen natural o análogos funcionales de estas. Los análogos funcionales particularmente útiles de ácidos nucleicos son capaces de hibridarse con un ácido nucleico de una manera específica de secuencia (por ejemplo, capaces de hibridarse con dos ácidos nucleicos de manera que puede producirse una ligadura entre los dos ácidos nucleicos hibridados) o son capaces de usarse como plantilla para la replicación de una secuencia de nucleótidos en particular. Los ácidos nucleicos de origen natural tienen generalmente una cadena principal que contiene enlaces fosfodiéster. Una estructura análoga puede tener un enlace de cadena principal alternativo, lo que incluye cualquiera de una variedad. Los ácidos nucleicos de origen natural tienen generalmente un azúcar desoxirribosa (por ejemplo, que se encuentra en el ácido desoxirribonucleico (ADN)) o un azúcar ribosa (por ejemplo, que se encuentra en el ácido ribonucleico (ARN)).

10

15

Un ácido nucleico puede contener nucleótidos que tienen cualquiera de una variedad de análogos de estos restos de azúcar. Un ácido nucleico puede incluir nucleótidos nativos o no nativos. Con respecto a esto, un ácido desoxirribonucleico nativo puede tener una o más bases seleccionadas del grupo que consiste en adenina (A), timina (T), citosina (C), o guanina (G), y un ácido ribonucleico puede tener una o más bases seleccionadas del grupo que consiste en uracilo (U), adenina (A), citosina (C), o guanina (G). Pueden utilizarse bases no nativas que pueden incluirse en un ácido nucleico o nucleótido.

20

25

(iii) Sonda y diana

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

30

(iv) Oligonucleótido y polinucleótido

Los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido” se usan indistintamente para referirse a un multímero monocatenario de nucleótidos de aproximadamente 2 a aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser sintéticos, generados enzimáticamente (por ejemplo, mediante polimerización), o mediante el uso de un método de “separar-mezclar”. Los oligonucleótidos pueden incluir monómeros de ribonucleótidos (por ejemplo, pueden ser oligorribonucleótidos) y/o monómeros de desoxirribonucleótidos (por ejemplo, oligodesoxirribonucleótidos). En algunos ejemplos, los oligonucleótidos pueden incluir una combinación tanto de monómeros de desoxirribonucleótidos como de monómeros de ribonucleótidos en el oligonucleótido (por ejemplo, combinación aleatoria u ordenada de monómeros de desoxirribonucleótidos y monómeros de ribonucleótidos). Por ejemplo, un oligonucleótido puede tener de 4 a 10, 10 a 20, 21 a 30, 31 a 40, 41 a 50, 51 a 60, 61 a 70, 71 a 80, 80 a 100, 100 a 150, 150 a 200, 200 a 250, 250 a 300, 300 a 350, 350 a 400, o 400-500 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden incluir uno o más restos funcionales que están unidos (por ejemplo, covalente o no covalentemente) a la estructura del multímero. Por ejemplo, un oligonucleótido puede incluir uno o más marcadores detectables (por ejemplo, un radioisótopo o fluoróforo).

35

40

45

(v) Hibridación, hibridar, asociación y asociar

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

50

55

(vi) Cebador

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

60

65

ARN y viceversa (por ejemplo, los cebadores de ARN pueden usarse para el cebado de la síntesis de ADN). Los cebadores pueden variar en longitud. Por ejemplo, los cebadores pueden tener de aproximadamente 6 bases a aproximadamente 120 bases. Por ejemplo, los cebadores pueden incluir hasta aproximadamente 25 bases. Un cebador puede, en algunos casos, referirse a una secuencia de unión al cebador.

5

(vii) Extensión del cebador

Dos secuencias de ácidos nucleicos pueden unirse (por ejemplo, hibridarse) mediante un solapamiento de sus respectivas secuencias de ácidos nucleicos complementarias terminales (por ejemplo, extremos 3' terminales). Dicha unión puede ir seguida de la extensión del ácido nucleico (por ejemplo, una extensión enzimática) de uno, o ambos extremos terminales mediante el uso de la otra secuencia de ácido nucleico como plantilla para la extensión. La extensión enzimática puede realizarse mediante una enzima, lo que incluye, pero no se limita a, una polimerasa y/o una transcriptasa inversa.

10

15 (viii) Extensión del ácido nucleico

Una "extensión del ácido nucleico" implica generalmente la incorporación de uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, A, G, C, T, U, análogos de nucleótidos, o derivados de estos) en una molécula (tal como, pero no limitada a, una secuencia de ácido nucleico) de una manera dependiente de plantilla, de manera que los ácidos nucleicos consecutivos se incorporan mediante una enzima (tal como una polimerasa o transcriptasa inversa), generando de esta manera una molécula de ácido nucleico recién sintetizada. Por ejemplo, un cebador que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico complementaria puede usarse para sintetizar una nueva molécula de ácido nucleico mediante el uso de la secuencia de ácido nucleico complementaria como una plantilla para la síntesis del ácido nucleico. De manera similar, una cola poliadenilada 3' de un transcrito de ARNm que se hibrida con una secuencia poli (dT) (por ejemplo, dominio de captura) puede usarse como una plantilla para la síntesis de una sola hebra de una molécula de ADNc correspondiente.

20

25

(ix) Amplificación por PCR

Una "amplificación por PCR" se refiere al uso de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para generar copias de material genético, lo que incluye secuencias de ADN y ARN. Los reactivos y condiciones adecuadas para implementar la PCR se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 4,683,202, 4,683,195, 4,800,159, 4,965,188, y 5,512,462. En una amplificación por PCR típica, la mezcla de reacción incluye el material genético a amplificar, una enzima, uno o más cebadores que se emplean en una reacción de extensión del cebador, y reactivos para la reacción. Los cebadores de oligonucleótidos son de una longitud suficiente para proporcionar la hibridación al material genético complementario en condiciones de asociación. La longitud de los cebadores depende generalmente de la longitud de los dominios de amplificación, pero será típicamente de al menos 4 bases, al menos 5 bases, al menos 6 bases, al menos 8 bases, al menos 9 bases, al menos 10 pares de bases (pb), al menos 11 pb, al menos 12 pb, al menos 13 pb, al menos 14 pb, al menos 15 pb, al menos 16 pb, al menos 17 pb, al menos 18 pb, al menos 19 pb, al menos 20 pb, al menos 25 pb, al menos 30 pb, al menos 35 pb, y puede ser de hasta 40 pb o más, donde la longitud de los cebadores variará generalmente de 18 a 50 pb. El material genético puede ponerse en contacto con un único cebador o un conjunto de dos cebadores (cebadores directos e inversos), en dependencia de si se desea la extensión del cebador, la amplificación lineal o exponencial del material genético.

30

35

En algunas modalidades, el proceso de amplificación por PCR usa una enzima ADN polimerasa. La actividad ADN polimerasa puede proporcionarse por una o más enzimas ADN polimerasas distintas. En ciertas modalidades, la enzima ADN polimerasa es de una bacteria, por ejemplo, la enzima ADN polimerasa es una enzima ADN polimerasa bacteriana. Por ejemplo, la ADN polimerasa puede ser de una bacteria del género *Escherichia*, *Bacillus*, *Thermophilus*, o *Pyrococcus*.

40

45

Ejemplos adecuados de ADN polimerasas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a: las enzimas ADN polimerasa I de *E.coli*, ADN polimerasa Bsu, ADN polimerasa Bst, ADN polimerasa Taq, ADN polimerasa VENT™, ADN polimerasa DEEPVENT™, ADN polimerasa LongAmp® Taq, ADN polimerasa LongAmp® Hot Start Taq, ADN polimerasa Crimson LongAmp® Taq, ADN polimerasa Crimson Taq, ADN polimerasa OneTaq®, ADN polimerasa OneTaq® Quick-Load®, ADN polimerasa Hemo KlenTaq®, ADN polimerasa REDTaq®, ADN polimerasa Phusion®, ADN polimerasa Phusion® de alta fidelidad, ADN polimerasa Pfx Platinum, ADN polimerasa Pfx AccuPrime, ADN polimerasa Phi29, fragmento de Klenow, ADN polimerasa Pwo, ADN polimerasa Pfu, ADN polimerasa T4 y ADN polimerasa T7.

50

El término "ADN polimerasa" incluye no solo enzimas de origen natural, sino también todos los derivados modificados de estas, lo que incluye además derivados de enzimas ADN polimerasas de origen natural. Por ejemplo, en algunas modalidades, la ADN polimerasa puede haberse modificado para eliminar la actividad exonucleasa 5'-3'. Los derivados de secuencia modificada o mutantes de enzimas ADN polimerasa que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, mutantes que retienen al menos parte de la actividad funcional, por ejemplo, la actividad ADN polimerasa de la secuencia de tipo silvestre. Las mutaciones pueden afectar el perfil de actividad de las enzimas, por ejemplo, potenciar o reducir la velocidad de polimerización, en diferentes condiciones de reacción, por ejemplo, temperatura,

55

60

65

concentración de la plantilla, concentración del cebador, etc. Las mutaciones o modificaciones de secuencias también pueden afectar la actividad exonucleasa y/o la termoestabilidad de la enzima.

5 En algunas modalidades, la amplificación por PCR puede incluir reacciones tales como, pero no limitadas a, una reacción de amplificación por desplazamiento de hebra, una reacción de amplificación por círculo rodante, una reacción en cadena con ligasa, una reacción de amplificación mediada por transcripción, una reacción de amplificación isotérmica, y/o una reacción de amplificación mediada por lazo.

10 En algunas modalidades, la amplificación por PCR usa un único cebador que es complementario a la etiqueta 3' de los fragmentos del ADN diana. En algunas modalidades, la amplificación por PCR usa un primer y un segundo cebador, donde al menos una porción del extremo 3' del primer cebador es complementaria a al menos una porción de la etiqueta 3' de los fragmentos del ácido nucleico diana, y donde al menos una porción del extremo 3' del segundo cebador exhibe la secuencia de al menos una porción de la etiqueta 5' de los fragmentos del ácido nucleico diana. En algunas modalidades, una porción del extremo 5' del primer cebador no es complementaria a la etiqueta 3' de los fragmentos del ácido nucleico diana, y una porción del extremo 5' del segundo cebador no exhibe la secuencia de al menos una porción de la etiqueta 5' de los fragmentos del ácido nucleico diana. En algunas modalidades, el primer cebador incluye una primera secuencia universal y/o el segundo cebador incluye una segunda secuencia universal.

20 En algunas modalidades (por ejemplo, cuando la amplificación por PCR amplifica ADN capturado), los productos de la amplificación por PCR pueden ligarse a secuencias adicionales mediante el uso de una enzima ADN ligasa. La actividad ADN ligasa puede proporcionarse por una o más enzimas ADN ligasa distintas. En algunas modalidades, la enzima ADN ligasa es de una bacteria, por ejemplo, la enzima ADN ligasa es una enzima ADN ligasa bacteriana. En algunas modalidades, la enzima ADN ligasa es de un virus (por ejemplo, un bacteriófago). Por ejemplo, la ADN ligasa puede ser ADN ligasa T4. Otras enzimas apropiadas para la etapa de ligadura incluyen, pero no se limitan a, ADN ligasa Tth, ADN ligasa Taq, ADN ligasa de *Thermococcus sp.* (cepa 9°N) (ADN ligasa 9°N™, disponible de New England Biolabs, Ipswich, MA), y Ampligase™ (disponible de Epicentre Biotechnologies, Madison, WI). También pueden usarse derivados, por ejemplo, derivados de secuencia modificada, y/o mutantes de estos.

30 En algunas modalidades, el material genético se amplifica mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). La actividad transcriptasa inversa deseada puede proporcionarse por una o más enzimas transcriptasas inversas distintas, cuyos ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a: las enzimas M-MLV, MuLV, AMV, HIV, ArrayScript™, MultiScribe™, ThermoScript™, y SuperScript® I, II, III, y IV. "Transcriptasa inversa" incluye no solo enzimas de origen natural sino también todos los derivados modificados de estas, lo que incluye además derivados de enzimas transcriptasas inversas de origen natural.

35 Además, la transcripción inversa puede realizarse mediante el uso de derivados de secuencia modificada o mutantes de las enzimas transcriptasas inversas M-MLV, MuLV, AMV, y HIV, lo que incluye mutantes que retienen al menos parte de la actividad funcional, por ejemplo, transcriptasa inversa, de la secuencia de tipo silvestre. La enzima transcriptasa inversa puede proporcionarse como parte de una composición que incluye otros componentes, por ejemplo, componentes estabilizantes, que potencian o mejoran la actividad de la enzima transcriptasa inversa, tal como inhibidor(es) de ARNasa, inhibidores de la síntesis de ADN dependiente de ADN, por ejemplo, actinomicina D. Muchos derivados de secuencia modificada o mutantes de enzimas transcriptasas inversas, por ejemplo, M-MLV, y composiciones, lo que incluye enzimas no modificadas y modificadas, están disponibles comercialmente, por ejemplo, enzimas ArrayScript™, MultiScribe™, ThermoScript™, y SuperScript® I, II, III, y IV.

40 Ciertas enzimas transcriptasas inversas (por ejemplo, la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV, MMLV)) pueden sintetizar una hebra de ADN complementaria mediante el uso tanto de ARN (síntesis de ADNc) como de ADN monocatenario (ADNmc) como plantilla. De esta forma, en algunas modalidades, la reacción de transcripción inversa puede usar una enzima (transcriptasa inversa) que es capaz de usar tanto ARN como ADNmc como plantilla para una reacción de extensión, por ejemplo, una transcriptasa inversa AMV o MMLV.

50 En algunas modalidades, la cuantificación de ARN y/o ADN se lleva a cabo mediante PCR en tiempo real (también conocida como PCR cuantitativa o qPCR), mediante el uso de técnicas bien conocidas en la técnica, tales como, pero no limitadas a "TAQMAN™" o "SYBR®", o en capilares ("capilares LightCycler®"). En algunas modalidades, la cuantificación del material genético se determina por absorbancia óptica y con PCR en tiempo real. En algunas modalidades, la cuantificación del material genético se determina mediante PCR digital. En algunas modalidades, los genes analizados pueden compararse con un extracto de ácido nucleico (ADN y ARN) de referencia que corresponde a la expresión (ARNm) y cantidad (ADN) para comparar los niveles de expresión de los ácidos nucleicos diana.

60 (x) Anticuerpo

65 Un "anticuerpo" es una molécula polipeptídica que reconoce y se une a un antígeno diana complementario. Los anticuerpos tienen típicamente una forma de estructura molecular que se asemeja a una forma de Y. Los anticuerpos de origen natural, denominados inmunoglobulinas, pertenecen a una de las clases de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE. Los anticuerpos también pueden producirse sintéticamente. Por ejemplo, los anticuerpos recombinantes,

que son anticuerpos monoclonales, pueden sintetizarse mediante el uso de genes sintéticos al recuperar los genes del anticuerpo de las células fuente, amplificar en un vector apropiado, e introducir el vector en un huésped para provocar que el huésped exprese el anticuerpo recombinante. En general, los anticuerpos recombinantes pueden clonarse a partir de cualquier especie de animal productor de anticuerpos, mediante el uso de cebadores de oligonucleótidos y/o sondas de hibridación adecuados. Pueden usarse técnicas recombinantes para generar anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, lo que incluye especies no endógenas.

Los anticuerpos sintéticos pueden derivarse de fuentes no inmunoglobulínicas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden generarse a partir de ácidos nucleicos (por ejemplo, aptámeros) y a partir de andamios de proteínas no inmunoglobulínicas (tales como aptámeros peptídicos) en los que se insertan lazos hipervariables para formar sitios de unión a antígeno. Los anticuerpos sintéticos basados en ácidos nucleicos o estructuras peptídicas pueden ser más pequeños que los anticuerpos derivados de inmunoglobulina, conduciendo a una mayor penetración tisular.

Los anticuerpos también pueden incluir proteínas afímeras, que son reactivos de afinidad que tienen típicamente un peso molecular de aproximadamente 12-14 kDa. Las proteínas afímeras se unen generalmente a una diana (por ejemplo, una proteína diana) tanto con alta afinidad como con alta especificidad. Los ejemplos de dichas dianas incluyen, pero no se limitan a, cadenas de ubiquitina, inmunoglobulinas, y proteína C reactiva. En algunas modalidades, las proteínas afímeras se derivan de inhibidores de cisteína proteasa, e incluyen lazos peptídicos y una secuencia N-terminal variable que proporciona el sitio de unión.

Anticuerpos también puede referirse a un “fragmento de unión a epítipo” o “fragmento de anticuerpo”, que como se usa en la presente, se refiere generalmente a una porción de un anticuerpo completo capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo completo, aunque no necesariamente en la misma medida. Aunque son posibles múltiples tipos de fragmentos de unión a epítipo, un fragmento de unión a epítipo comprende típicamente al menos un par de regiones variables de las cadenas pesada y ligera (VH y VL, respectivamente) unidas (*por ejemplo*, mediante enlaces disulfuro) para preservar el sitio de unión a antígeno, y no contiene toda o una porción de la región Fc. Los fragmentos de unión a epítipo de un anticuerpo pueden obtenerse a partir de un anticuerpo dado mediante cualquier técnica adecuada (*por ejemplo*, tecnología de ADN recombinante o escisión enzimática o química de un anticuerpo completo), y pueden tamizarse típicamente para determinar la especificidad de la misma manera en que se tamizan los anticuerpos completos. En algunas modalidades, un fragmento de unión a epítipo comprende un fragmento F(ab')₂, fragmento Fab', fragmento Fab, fragmento Fd, o fragmento Fv. En algunas modalidades, el término “anticuerpo” incluye polipéptidos derivados de anticuerpos, tales como fragmentos variables de cadena única (scFv), diacuerpos u otros scFv multiméricos, anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos de dominio único, u otros polipéptidos que comprenden una porción suficiente de un anticuerpo (*por ejemplo*, una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR)) para conferir capacidad de unión a antígeno específica al polipéptido.

(xi) Marcador, marcador detectable y marcador óptico

Los términos “marcador detectable”, “marcador óptico” y “marcador” se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a un resto detectable directa o indirectamente que está asociado con (por ejemplo, conjugado a) una molécula a detectar, por ejemplo, una sonda para ensayo *in situ* o analito. El marcador detectable puede detectarse directamente por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede detectarse indirectamente, por ejemplo, al catalizar alteraciones químicas de un compuesto o composición de sustrato, cuyo compuesto o composición de sustrato es detectable directamente. Los marcadores detectables pueden ser adecuados para la detección a pequeña escala y/o adecuados para el tamizaje de alto rendimiento. Como tal, los marcadores detectables adecuados incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos, fluoróforos, compuestos quimioluminiscentes, compuestos bioluminiscentes, y colorantes.

El marcador detectable puede detectarse cualitativamente (por ejemplo, ópticamente o espectralmente), o puede cuantificarse. La detección cualitativa incluye generalmente un método de detección en el que se confirma la existencia o presencia del marcador detectable, mientras que la detección cuantificable incluye generalmente un método de detección que tiene un valor cuantificable (por ejemplo, que puede informarse numéricamente) tal como una intensidad, duración, polarización, y/u otras propiedades. En algunas modalidades, el marcador detectable está unido a un elemento o a una sonda asociada con un elemento. Por ejemplo, los elementos marcados de manera detectable pueden incluir un marcador fluorescente, colorimétrico o quimioluminiscente unido a una perla (ver, por ejemplo, Rajeswari y otros, *J. Microbiol Methods* 139:22-28, 2017, y Forcucci y otros, *J. Biomed Opt.* 10:105010, 2015).

En algunas modalidades, una pluralidad de marcadores detectables pueden estar unidos a un elemento, sonda, o composición a detectar. Por ejemplo, pueden incorporarse marcadores detectables durante la polimerización o amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, nucleótidos marcados con Cy5®, tales como Cy5®-dCTP). Puede usarse cualquier marcador detectable adecuado. En algunas modalidades, el marcador detectable es un fluoróforo. Por ejemplo, el fluoróforo puede ser de un grupo que incluye: 7-AAD (7-aminoactinomicina D), naranja de acridina (+ADN), naranja de acridina (+ARN), Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor® 700, Alexa Fluor® 750, aloficocianina (APC), AMCA/AMCA-X, 7-aminoactinomicina D (7-AAD), 7-amino-4-metilcoumarina, 6-aminoquinolina, azul de anilina, ANS, APC-Cy7, ATTO-

TAG™ CBQCA, ATTO-TAG™ FQ, auramina O-Feulgen, BCECF (pH alto), BFP (proteína fluorescente azul), BFP/GFP FRET, BOBO™-1/BO-PRO™-1, BOBO™-3/BO-PRO™-3, BODIPY® FL, BODIPY® TMR, BODIPY® TR-X, BODIPY® 530/550, BODIPY® 558/568, BODIPY® 564/570, BODIPY® 581/591, BODIPY® 630/650-X, BODIPY® 650-665-X, BTC, calceína, azul calceína, Calcium Crimson™, Calcium Green-1™, Calcium Orange™, Calcofluor® White, 5-carboxifluoresceína (5-FAM), 5-carboxinaftofluoresceína, 6-carboxirodamina 6G, 5-carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA), carboxi-X-rodamina (5-ROX), Cascade Blue®, Cascade Yellow™, CCF2 (GeneBLAzer™), CFP (proteína fluorescente Cyan), CFP/YFP FRET, cromomicina A3, Cl-NERF (pH bajo), CPM, 6-CR 6G, CTC Formazan, Cy2®, Cy3®, Cy3.5®, Cy5®, Cy5.5®, Cy7®, cicromo (PE-Cy5), dansilamina, dansil cadaverina, cloruro de dansilo, DAPI, dapoxilo, DCFH, DHR, DiA (4-Di-16-ASP), DiD (DiIC18(5)), DIDS, Dil (DiIC18(3)), DiO (DiOC18(3)), DiR (DiIC18(7)), Di-4 ANEPPS, Di-8 ANEPPS, DM-NERF (pH 4,5-6,5), DsRed (proteína fluorescente roja), EBFP, ECFP, EGFP, alcohol ELF® -97, eosina, eritrosina, bromuro de etidio, homodímero de etidio-1 (EthD-1), cloruro de europio (III), 5-FAM (5-carboxifluoresceína), Fast Blue, fosforamida de fluoresceína-dT, FITC, Fluo-3, Fluo-4, FluorX®, Fluoro-Gold™ (pH alto), Fluoro-Gold™ (pH bajo), Fluoro-Jade, FM® 1-43, Fura-2 (alto contenido de calcio), Fura-2/BCECF, Fura Red™ (alto contenido de calcio), Fura Red™/Fluo-3, GeneBLAzer™ (CCF2), GFP desplazada al rojo (rsGFP), GFP de tipo silvestre, GFP/BFP FRET, GFP/DsRed FRET, Hoechst 33342 y 33258, 7-hidroxi-4-metilcoumarina (pH 9), 1,5 IAEDANS, indo-1 (alto contenido de calcio), Indo-1 (bajo contenido de calcio), indodicarbocianina, indotricarbocianina, JC-1, 6-JOE, JOJO™-1/JO-PRO™-1, LDS 751 (+ADN), LDS 751 (+ARN), LOLO™-1/LO-PRO™-1, amarillo Lucifer, azul LysoSensor™ (pH 5), verde LysoSensor™ (pH 5), amarillo/azul LysoSensor™ (pH 4,2), verde LysoTracker®, rojo LysoTracker®, amarillo LysoTracker®, Mag-Fura-2, Mag-Indo-1, Magnesium Green™, Marina Blue®, 4-metilumbeliferona, mitramicina, verde MitoTracker®, naranja MitoTracker®, rojo MitoTracker®, NBD (amina), Rojo Nilo, Oregon Green® 488, Oregon Green® 500, Oregon Green® 514, Azul pacífico, PBF1, PE (R-ficoeritrina), PE-Cy5, PE-Cy7, PE-rojo Texas, PerCP (proteína peridinina clorofila), PerCP-Cy5.5 (TruRed), PharRed (APC-Cy7), C-ficocianina, R-ficocianina, R-ficoeritrina (PE), IP (yoduro de propidio), PKH26, PKH67, POPO™-1/PO-PRO™-1, POPO™-3/PO-PRO™-3, yoduro de propidio (PI), PyMPO, pireno, pironina Y, Quantam Red (PE-Cy5), mostaza de quinacrina, R670 (PE-Cy5), rojo 613 (PE-Texas Red), proteína fluorescente roja (DsRed), resorufina, RH 414, Rhod-2, rodamina B, Rhodamine Green™, Rhodamine Red™, rodamina faloidina, rodamina 110, rodamina 123, 5-ROX (carboxi-X-rodamina), S65A, S65C, S65L, S65T, SBFI, SITS, SNAFL®-1 (pH alto), SNAFL®-2, SNARF®-1 (pH alto), SNARF®-1 (pH bajo), Sodium Green™, SpectrumAqua®, SpectrumGreen® #1, SpectrumGreen® #2, SpectrumOrange®, SpectrumRed®, SYTO® 11, SYTO® 13, SYTO® 17, SYTO® 45, azul SYTOX®, verde SYTOX®, naranja SYTOX®, 5-TAMRA (5-carboxitetrametilrodamina), tetrametilrodamina (TRITC), Texas Red®/Texas Red®-X, Texas Red®-X (éster NHS), tiadicarbocianina, naranja Tiazol, TOTO®-1/TO-PRO®-1, TOTO®-3/TO-PRO®-3, TO-PRO®-5, Tri-color (PE-Cy5), TRITC (tetrametilrodamina), TruRed (PerCP-Cy5.5), WW 781, X-rodamina (XRITC), Y66F, Y66H, Y66W, YFP (proteína fluorescente amarilla), YOYO®-1/YO-PRO®-1, YOYO®-3/YO-PRO®-3, 6-FAM (fluoresceína), 6-FAM (éster NHS), 6-FAM (azida), HEX, TAMRA (éster NHS), amarillo Yakima, MAX, TET, TEX615, ATTO 488, ATTO 532, ATTO 550, ATTO 565, ATTO Rho101, ATTO 590, ATTO 633, ATTO 647N, TYE 563, TYE 665, TYE 705, 5' IRDye® 700, 5' IRDye® 800, 5' IRDye® 800CW (éster NHS), colorante WellRED D4, colorante WellRED D3, colorante WellRED D2, Lightcycler® 640 (éster NHS), y Dy 750 (éster NHS).

Como se mencionó anteriormente, en algunas modalidades, un marcador detectable es o incluye un resto luminiscente o quimioluminiscente. Los restos luminiscentes/quimioluminiscentes comunes incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa tales como peroxidasa de rábano picante (HRP), peroxidasa de soja (SP), fosfatasa alcalina, y luciferasa. Estos restos de proteínas pueden catalizar reacciones quimioluminiscentes dados los sustratos apropiados (por ejemplo, un reactivo oxidante más un compuesto quimioluminiscente). Se conoce que una serie de familias de compuestos proporcionan quimioluminiscencia bajo una variedad de condiciones. Los ejemplos no limitantes de familias de compuestos quimioluminiscentes incluyen 2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona luminol, 5-amino-6,7,8-trimetoxi- y el análogo dimetilamino[ca]benz. Estos compuestos pueden emitir luminiscencia en presencia de peróxido de hidrógeno alcalino o hipoclorito de calcio y base. Otros ejemplos de familias de compuestos quimioluminiscentes incluyen, por ejemplo, 2,4,5-trifenilimidazoles, sustituyentes para-dimetilamino y -metoxi, oxalatos tales como ésteres activos de oxalilo, p-nitrofenilo, ésteres de N-alquilacridinio, luciferinas, lucigeninas, o ésteres de acridinio. En algunas modalidades, un marcador detectable es o incluye un marcador basado en metales o basado en masa. Por ejemplo, los conglomerados pequeños de iones metálicos, metales, o semiconductores pueden actuar como un código de masa. En algunos ejemplos, los metales pueden seleccionarse de los grupos 3-15 de la tabla periódica, por ejemplo, Y, La, Ag, Au, Pt, Ni, Pd, Rh, Ir, Co, Cu, Bi, o una de sus combinaciones.

55 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente descripción.

60 Ejemplo 1: Sincronización *in situ* de la amplificación por círculo rodante (RCA)

Este ejemplo describe métodos ilustrativos que mejoran la detección de dianas y el análisis de imágenes *in situ*. Ciertos métodos conocidos de amplificación de señales *in situ* mediante el uso de RCA pueden producir productos de amplificación de intensidad y tamaño heterogéneos, donde los productos de RCA de intensidad débil y/o tamaño pequeño pueden no alcanzar un umbral de detección. Por el contrario, los productos de RCA de intensidad desproporcionadamente fuerte y/o gran tamaño pueden dar como resultado apañamiento óptico, especialmente

cuando están en estrecha proximidad. En ambos casos, la sensibilidad puede verse comprometida, reduciendo la calidad del análisis de la imagen. Los métodos en este ejemplo pueden facilitar la producción de productos de amplificación homogéneos, proporcionando soluciones a una necesidad previamente no satisfecha de un mejor análisis de la diana.

La detección de la diana y el análisis de imágenes mejorados pueden lograrse mediante la sincronización del inicio de la RCA *in situ*, proporcionando de esta manera productos de RCA que tienen intensidades y tamaños homogéneos generados en reacciones concertadas en múltiples ubicaciones en una muestra. Formar complejos de cebadores con una polimerasa (por ejemplo, Phi29) antes de su adición a una muestra que contiene una plantilla circular (por ejemplo, ácido nucleico circular que comprende una región de hibridación del cebador) puede conducir a la sincronización, como se demuestra en los siguientes experimentos.

Glutamato descarboxilasa 2 (Gad2)

Se preparó una muestra de cerebro de ratón fresco/congelado para el análisis *in situ* de la expresión génica de glutamato descarboxilasa 2 (Gad2). Se añadieron sondas candado para Gad2 a la muestra y se dejaron hibridar. Después de la hibridación de la sonda, la muestra se lavó para eliminar las sondas no unidas. Para la ligadura de la sonda candado, se añadieron a la muestra inhibidores de ARNasa y ARN ligasa T4 2 (Rnl2 T4) y se incubaron. Los grupos experimentales y de control se configuraron como se muestra en la Tabla 1 más abajo.

Tabla 1

Mezcla	Componente	Cebador+	Phi29+	Complejo	Control
Mezcla de ligadura	Cebador	-	+	-	+
Tampón de unión	Cebador	+	-	+	No aplicable
	Phi29	-	+	+	No aplicable
Mezcla de reacción	Phi29	+	-	-	+

En el grupo "Complejo", se formó previamente un complejo de Phi29 y el cebador al mezclar los dos juntos en un tampón de unión. El EDTA en el tampón de unión ("tampón de apagado") puede quelar Mg²⁺ en la muestra que puede estar presente en cantidad residual de una o más reacciones anteriores, tales como la ligadura candado que usó un tampón que contenía Mg²⁺. Dado que Mg²⁺ es un cofactor de Phi29, el tampón de unión puede inhibir la actividad polimerasa. La mezcla de reacción que contenía el complejo Phi29-cebador formado previamente se añadió entonces a la muestra de tejido y se incubó durante 50 minutos a 37 °C. Esta incubación permitió que los complejos Phi29-cebador se difundieran a través de la muestra y "encontraran" sondas candado circularizadas hibridadas a los ácidos nucleicos diana de interés, por ejemplo, en este ejemplo, moléculas de ARNm de Gad2 en la muestra. Los complejos no unidos se eliminaron lavando tres veces. A continuación, los complejos Phi29-cebador restantes en la muestra se pusieron en contacto con un tampón de reacción (pH 8,5) que contenía Mg²⁺, dNTP, y Tris-HCl. Se suprimió la inhibición de la actividad de la polimerasa Phi29 y se permitió que la RCA continuara durante 3 horas a 37 °C antes de lavar el tejido con tampón TE.

Para la comparación, se realizaron experimentos similares con Phi29 sola ("Phi29+") o con el cebador ("Cebador+") solo en el tampón de unión (Tabla 1). En el grupo "Cebador+", se proporcionó Phi29 en el tampón de reacción de amplificación ("Mezcla de reacción" en la Tabla 1), mientras que el cebador se proporcionó en el tampón de unión. En el grupo "Phi29+", se proporcionó el cebador en la mezcla de reacción de ligadura ("mezcla de ligadura" en la Tabla 1), mientras que Phi29 se proporcionó en el tampón de unión. Observe que en el grupo "Complejo", Phi29 y el cebador formaron previamente un complejo en el tampón de unión; no hubo cebador en la mezcla de ligadura y no hubo Phi29 en el tampón de reacción de amplificación. En el grupo "Control", se proporcionó el cebador en la mezcla de ligadura, se proporcionó Phi29 en el tampón de reacción de amplificación, y la muestra se incubó con el tampón de reacción de amplificación ("Mezcla de reacción") y se detuvo después de 3 horas de incubación con tampón TE. El procesamiento de muestras, la hibridación de sondas, la ligadura, y la RCA en los grupos experimentales y de control se llevaron a cabo esencialmente como se describió anteriormente. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Antes de la obtención de las imágenes, las muestras de tejido se trataron con medio Gold Antifade Mountant para optimizar la trayectoria de la luz y prolongar la integridad de la muestra. La obtención de imágenes se realizó con un aumento de 40x, con un campo visual (FOV) de 4x4 para cada sección, mediante el uso de una cámara Orca Fusion. Las Figuras 2A-2B muestran los resultados en la intensidad del elemento (Figura 2A) y el tamaño estimado del elemento (Figura 2B) entre los experimentos con el complejo Phi29-cebador en el tampón de apagado y los experimentos con Phi29 sola en el tampón de apagado, cebador solo en el tampón de apagado, y el grupo de control. La Figura 2A muestra una tendencia de la intensidad de los elementos detectados en el grupo "Complejo" que es mayor que la intensidad del elemento detectada en los otros grupos. La Figura 2B muestra una tendencia hacia una distribución más estrecha del área del elemento (µm²) en el grupo "Complejo" en comparación con los otros grupos. Por lo tanto, se observó una tendencia de un tamaño de punto más grande así como también una distribución de tamaño de punto más estrecha en el grupo "Complejo" mediante el uso de reacciones de RCA sincronizadas. El grupo de control mostró un mayor número de productos de RCA por área de píxeles, probablemente porque el tiempo de incubación más largo con Phi29 presente en la muestra condujo a la generación de más productos de RCA.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que la formación del complejo de polimerasa y cebadores antes de entrar en contacto con la muestra puede afectar las características del elemento al potenciar la intensidad del producto de RCA y reducir la heterogeneidad en la distribución de tamaño del elemento.

5 Transportador de glutamato vesicular 1 (Slc17a7)

10 Para evaluar adicionalmente el impacto de la amplificación sincronizada en las características del elemento, se realizó otro conjunto de experimentos con el transportador de glutamato vesicular 1 (Slc17a7) como la diana de interés esencialmente como se describió anteriormente para Gad2. En los experimentos de Slc17a7, el complejo Phi29-
 10 cebador en el tampón de apagado se incubó con la muestra de tejido durante 120 minutos a 37 °C. La obtención de las imágenes se realizó como se describió anteriormente.

15 Las Figuras 3A-3B muestran la intensidad y el tamaño aparente del elemento, respectivamente, entre los grupos experimentales y de control. La Figura 3A muestra una tendencia de aumento en la intensidad del elemento en el grupo "Complejo" con relación a los otros grupos. La Figura 3B muestra una tendencia hacia una distribución más estrecha del área del elemento (μm^2) en el grupo "Complejo" en comparación con el grupo de control. Juntos, estos resultados son consistentes con los observados para Gad2. La aplicación de complejos Phi29-cebador formados
 20 previamente para sincronizar la RCA parece conducir a un aumento de la intensidad del punto y una distribución de tamaño más estrecha de los productos de RCA detectados en la muestra.

25 Se realizaron experimentos de secuencia temporal para probar los efectos de la amplificación sincronizada mediante la formación de complejos entre la polimerasa (Phi29) y los cebadores, mediante el uso de Slc17a7 como diana. Se dejó que la RCA continuara durante 60 minutos y 120 minutos para someter a prueba los efectos sobre las características del elemento al aumentar los tiempos de amplificación.

30 La Figura 4A muestra tendencias de aumento de la intensidad en condiciones sincronizadas con relación al grupo de control durante 60 minutos de RCA y 120 minutos de RCA. Estos resultados son consistentes con las observaciones de la amplificación sincronizada en los estudios con Gad2 y Slc17a7 descritos en la presente descripción. La Figura 4B muestra imágenes representativas de los elementos detectados en los grupos de control y sincronizados después
 30 de 120 minutos de amplificación. El grupo sincronizado muestra una tendencia hacia una mayor uniformidad en la intensidad del elemento en comparación con el grupo de control.

35 La Figura 4C muestra imágenes representativas después de la detección y filtrado del elemento en los grupos de control y sincronizados con 30 minutos de RCA. El grupo sincronizado mostró una tendencia a una mejor detección de los productos de RCA en las ubicaciones donde se esperaba la expresión de Slc17a7 en el tejido cerebral.

40 En conjunto, estos resultados indican que la sincronización de la RCA mediante la formación de un complejo entre la polimerasa y el cebador antes de la aplicación de la muestra puede potenciar la intensidad del elemento y reducir la heterogeneidad de tamaño. Con relación al control no sincronizado, los productos de RCA generados mediante el uso de RCA sincronizada pueden mejorar las características del elemento, facilitar la detección y el análisis de las imágenes, y conducir en general a una detección más precisa de los analitos *in situ*.

45 La presente descripción no pretende limitarse en alcance a las modalidades particulares descritas, que se proporcionan, por ejemplo, para ilustrar diversos aspectos de la descripción. Diversas modificaciones a las composiciones y métodos descritos se harán evidentes a partir de la descripción y las enseñanzas en la presente descripción.

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar una muestra biológica, que comprende:
 - (a) poner en contacto la muestra biológica con una primera mezcla de reacción, en donde:
 - la muestra biológica comprende un ácido nucleico circular que comprende una región de hibridación, la primera mezcla de reacción comprende una polimerasa, en donde la muestra biológica comprende células o es una muestra de tejido, el ácido nucleico circular o la polimerasa se une previamente a un polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a la región de hibridación, y se inhibe la actividad polimerasa de la polimerasa; y
 - (b) poner en contacto la muestra biológica con una segunda mezcla de reacción para permitir que la polimerasa extienda el polinucleótido hibridado a la región de hibridación mediante el uso del ácido nucleico circular como plantilla, en donde se genera un producto de la amplificación por círculo rodante del ácido nucleico circular en la muestra biológica.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la primera mezcla de reacción está sustancialmente libre de un cofactor de la polimerasa.
3. El método de la reivindicación 2, en donde el cofactor comprende Mg^{2+} , Co^{2+} y/o Mn^{2+} .
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la primera mezcla de reacción comprende un agente quelante.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la primera mezcla de reacción comprende un dicación que no es un cofactor de la polimerasa, y en donde el dicación es Sr^{2+} o Ca^{2+} .
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el polinucleótido comprende un grupo protector 3'.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el polinucleótido está protegido con tiofosfato en 3', de esta manera se protege al polinucleótido de la degradación exonucleasa 3'→5' por la polimerasa, al tiempo que permite el cebado por la polimerasa.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polinucleótido es un cebador, y el cebador se une previamente a la polimerasa en la primera mezcla de reacción antes de entrar en contacto con la muestra biológica en la etapa (a).
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el polinucleótido es un cebador, y el cebador se une previamente al ácido nucleico circular en la muestra biológica antes de entrar en contacto con la primera mezcla de reacción en la etapa (a).
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polinucleótido es un ácido nucleico diana, y el ácido nucleico diana se une previamente al ácido nucleico circular en la muestra biológica antes y/o durante la entrada en contacto con la primera mezcla de reacción en la etapa (a).
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la polimerasa se selecciona del grupo que consiste en ADN polimerasa Phi29, ADN polimerasa similar a Phi29, ADN polimerasa M2, ADN polimerasa B103, ADN polimerasa GA-1, polimerasa phi-PRD1, ADN polimerasa Vent, ADN polimerasa Deep Vent, (exo)ADN polimerasa Vent, ADN polimerasa KlenTaq, ADN polimerasa I, fragmento de Klenow de ADN polimerasa I, ADN polimerasa III, ADN polimerasa T3, ADN polimerasa T4, ADN polimerasa T5, ADN polimerasa T7, polimerasa Bst, ADN polimerasa rBST, ADN polimerasa N29, ADN polimerasa TopoTaq, ARN polimerasa T7, ARN polimerasa SP6, ARN polimerasa T3, y una variante o derivado de estas.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además, entre la entrada en contacto en la etapa (a) y la etapa (b), una etapa de eliminar las moléculas de la polimerasa y/o el polinucleótido que no están unidas al ácido nucleico circular de la muestra biológica.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la segunda mezcla de reacción comprende:
 - (i) un desoxinucleósido trifosfato (dNTP) y/o un nucleósido trifosfato (NTP), y (ii) un cofactor de la polimerasa.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el producto de la amplificación por círculo rodante se genera *in situ* en la muestra biológica.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el método comprende obtener imágenes de la muestra biológica para detectar el producto de la amplificación por círculo rodante, y en donde la obtención

de imágenes comprende detectar una señal asociada con una sonda marcada con fluorescencia que se une directa o indirectamente al producto de la amplificación por círculo rodante.

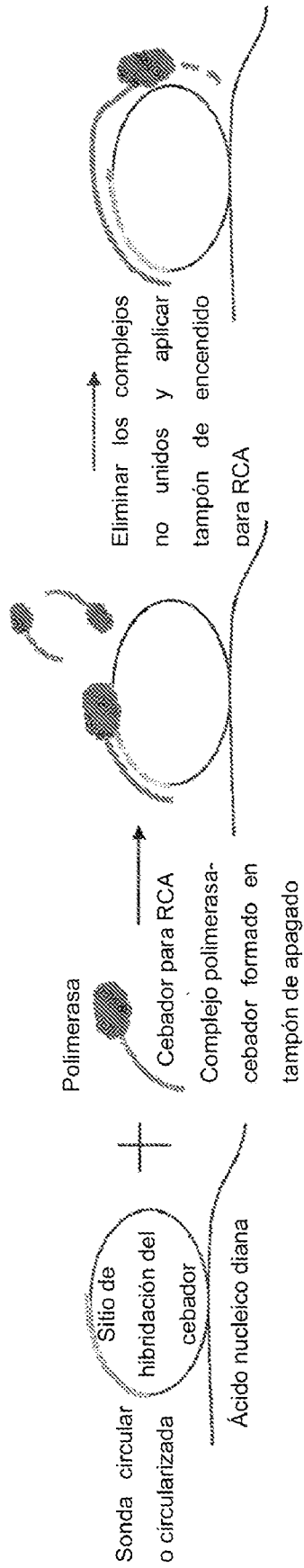


Figura 1A

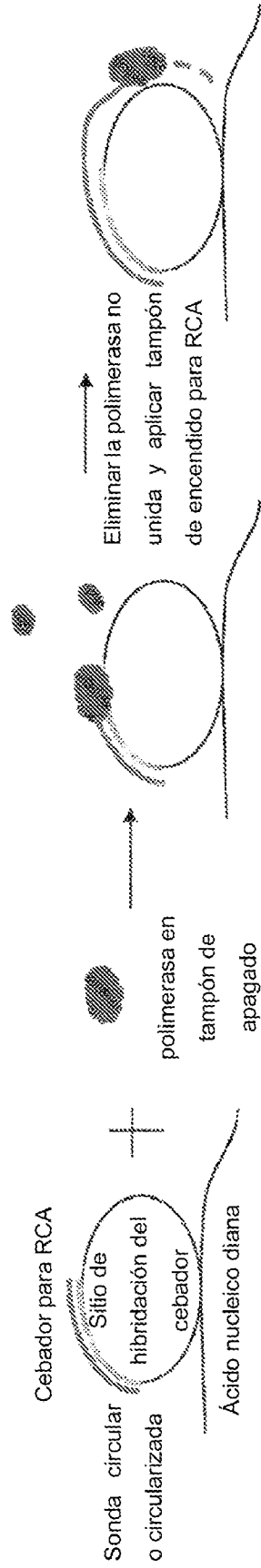


Figura 1B

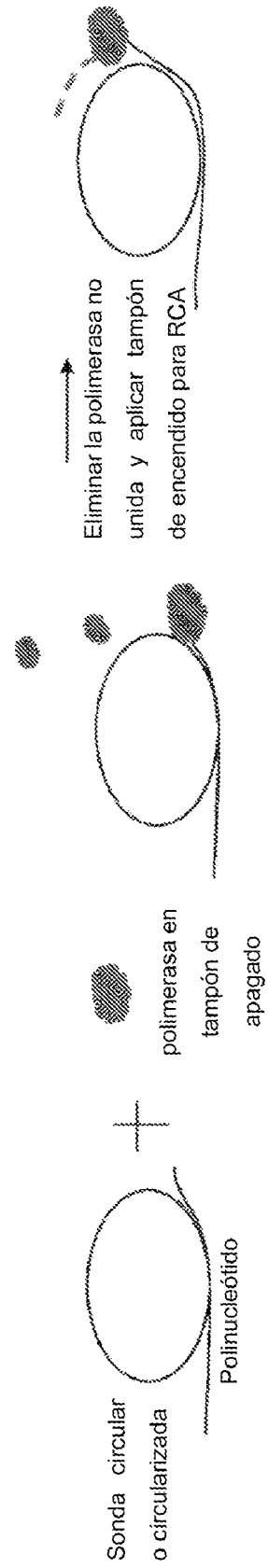
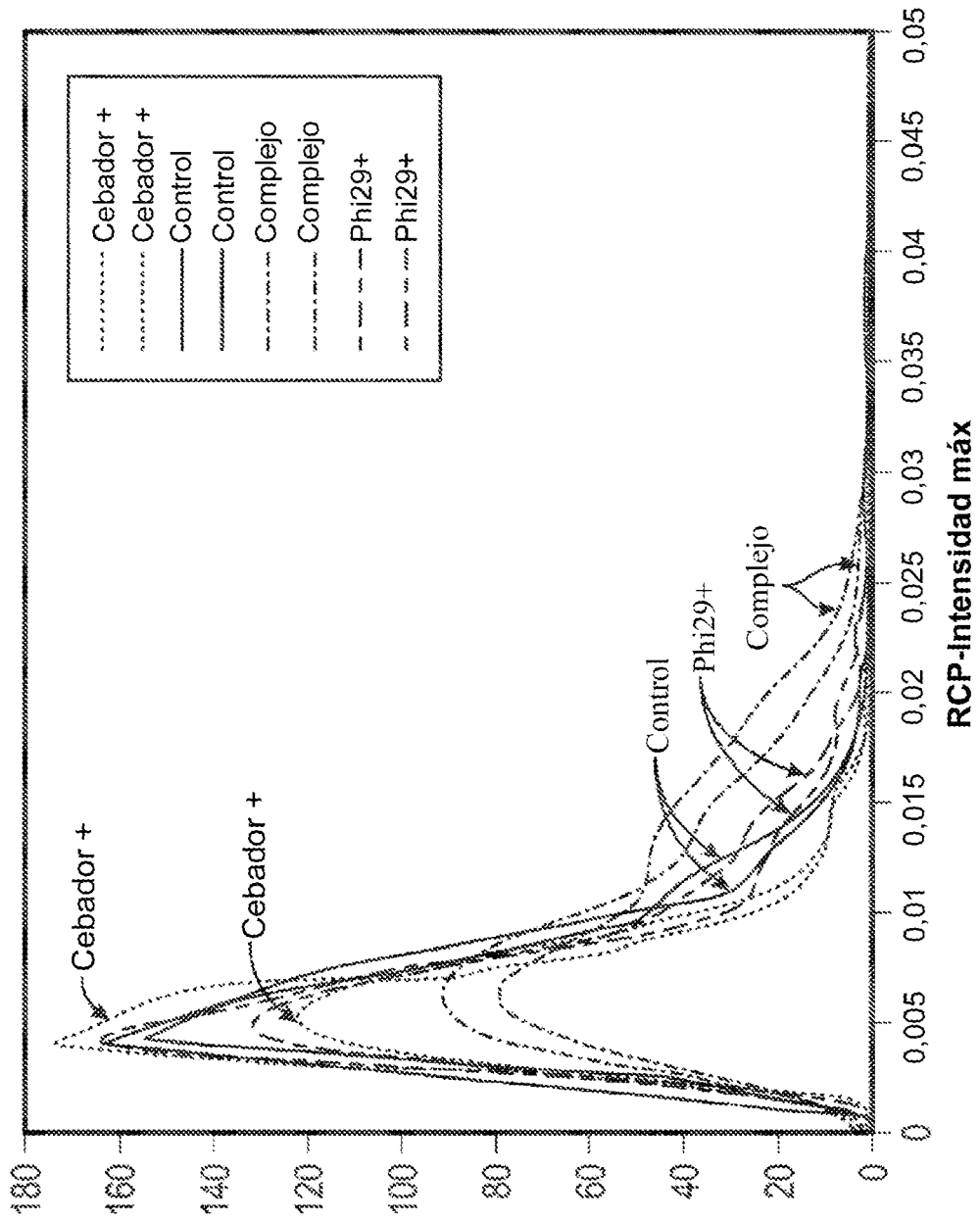
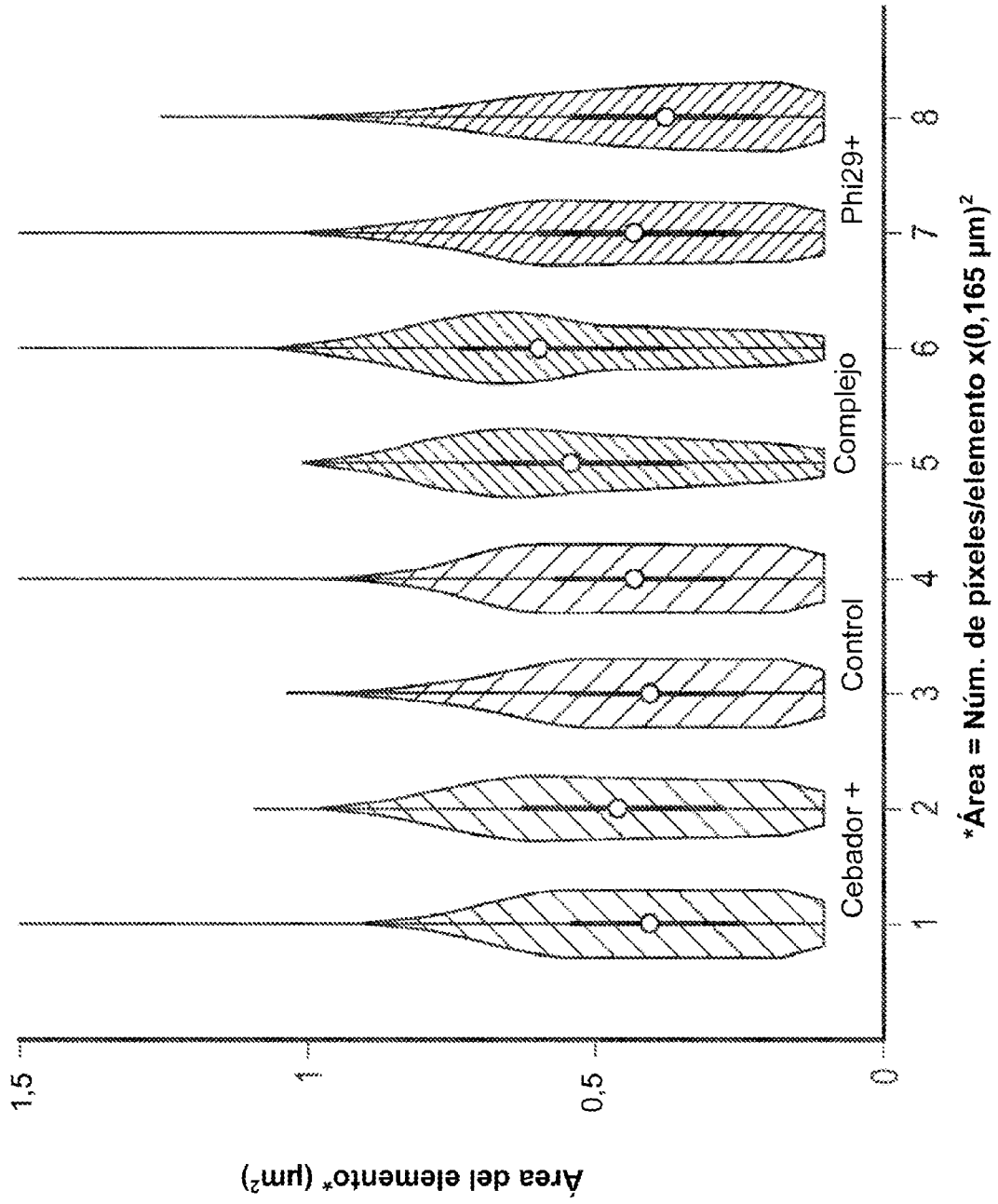


Figura 1C

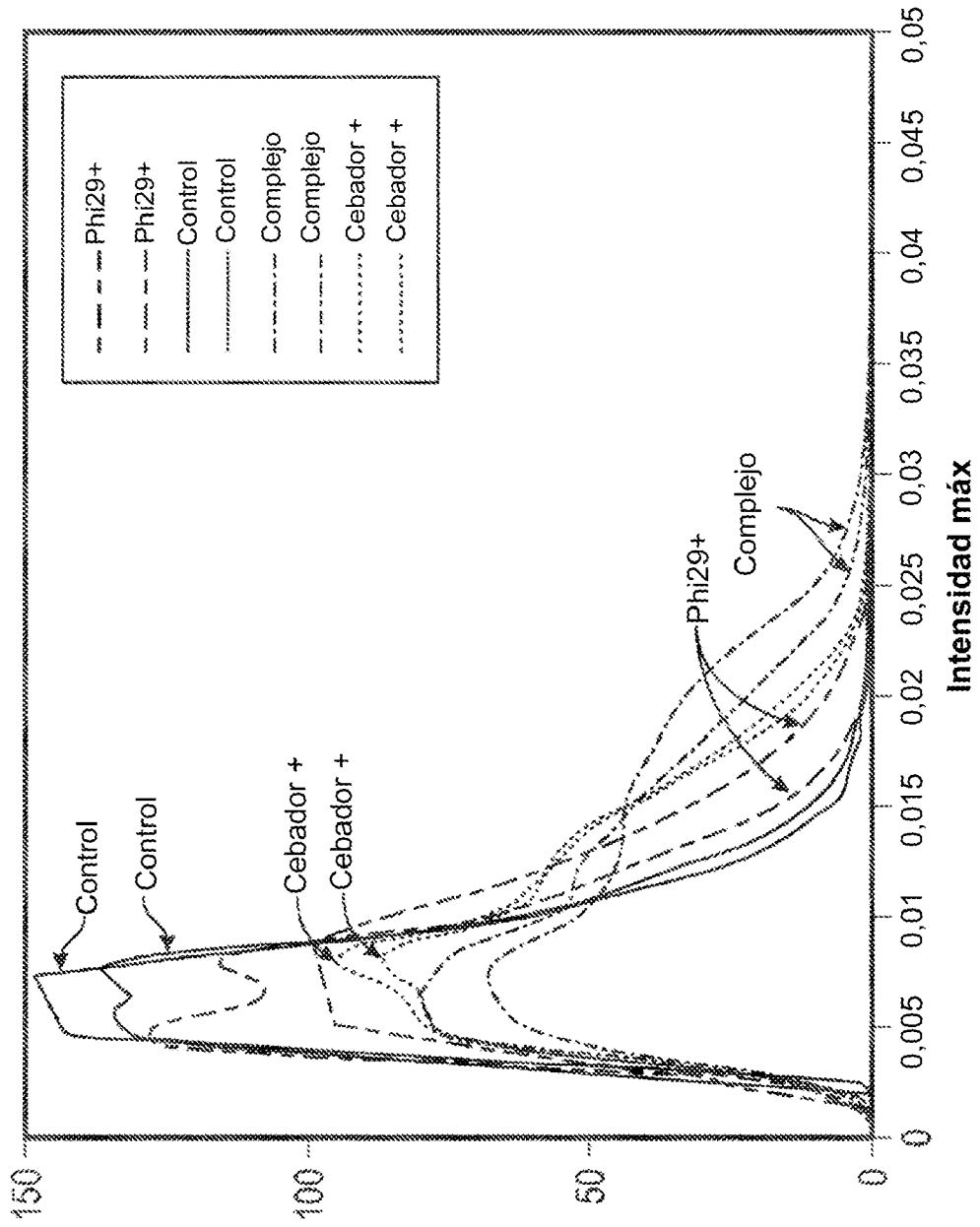


A.U.
Figura 2A



*Área = Núm. de píxeles/elemento x(0,165 μm)²

Figura 2B



A.U.
Figura 3A

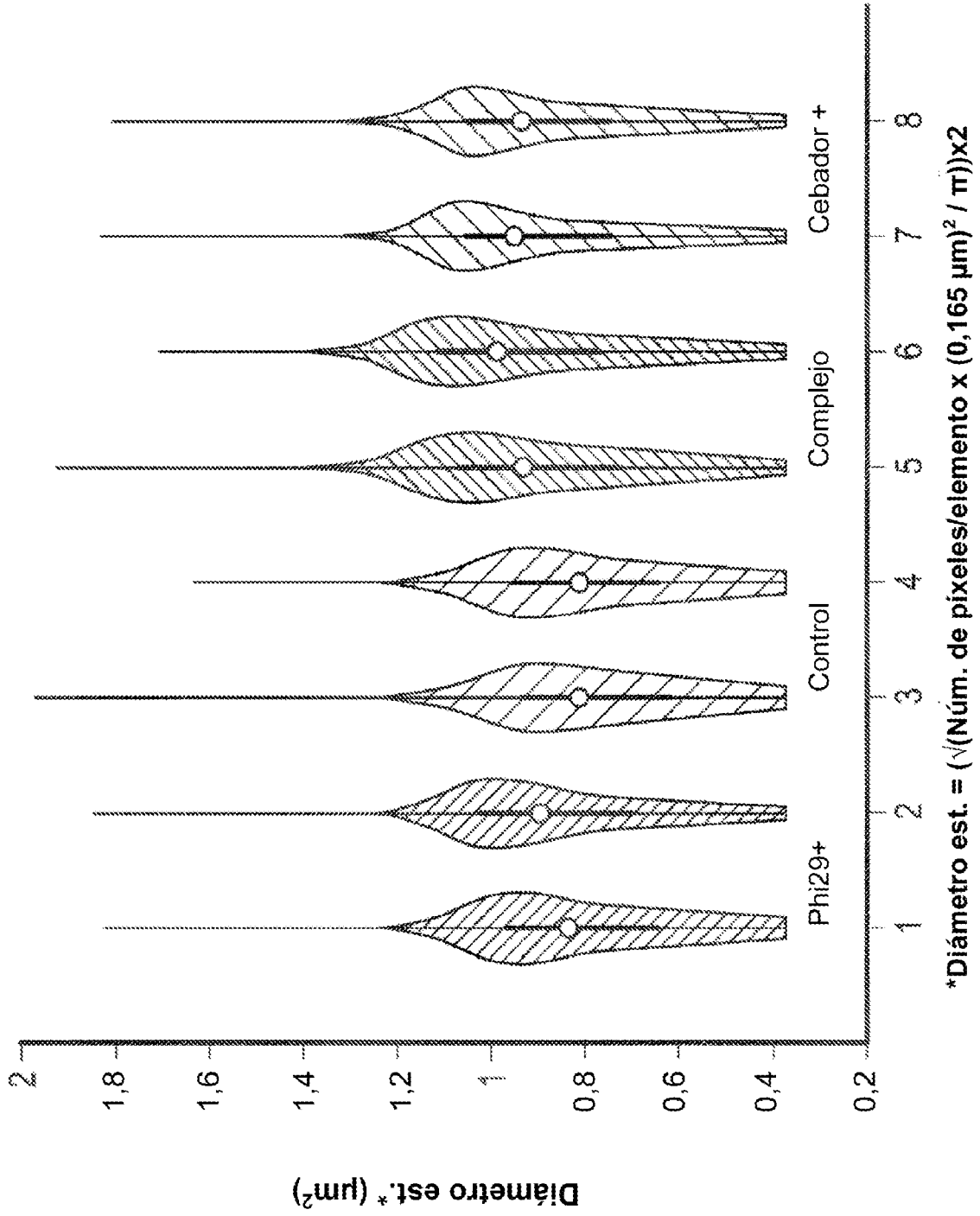


Figura 3B

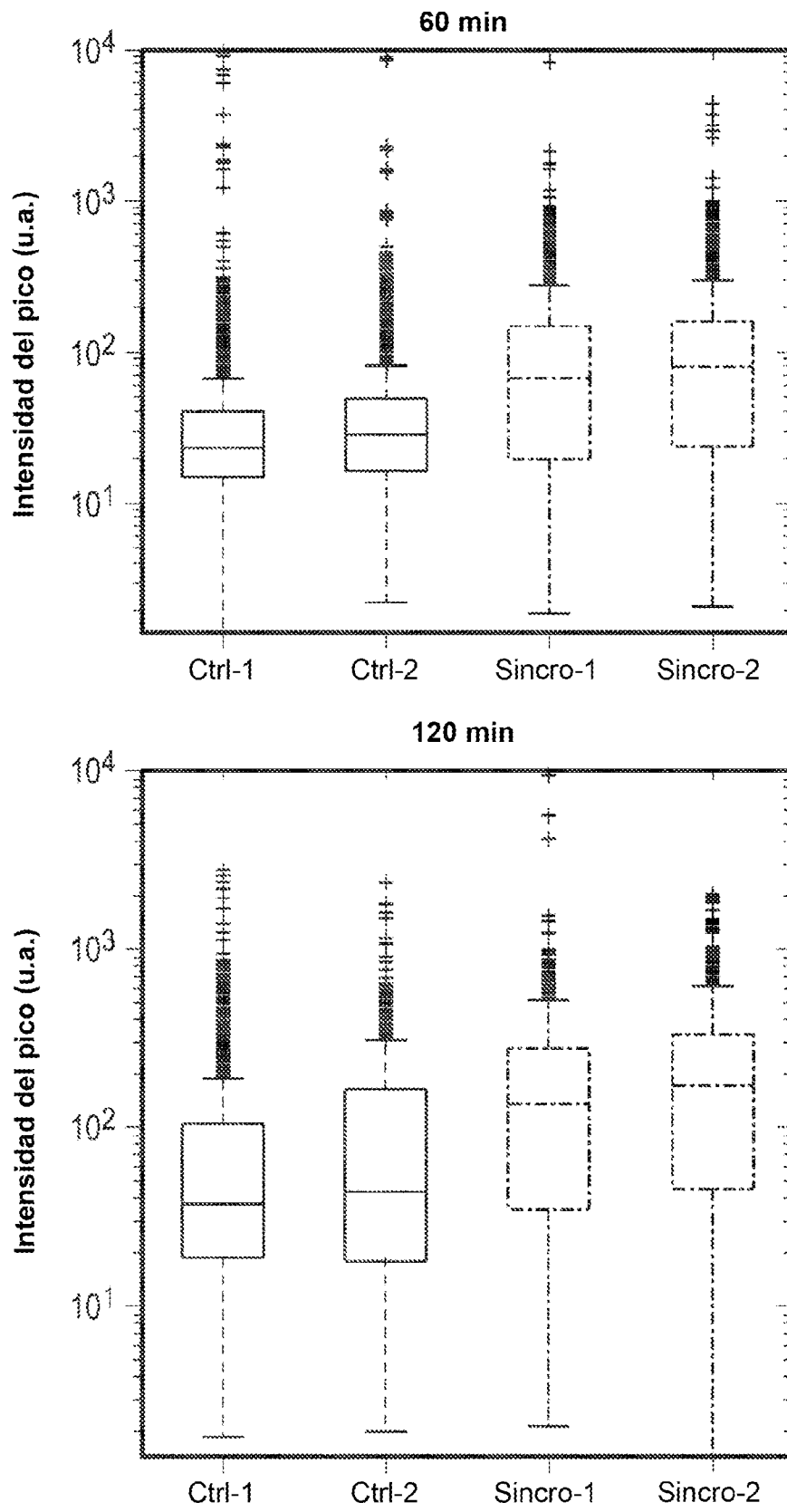


Figura 4A

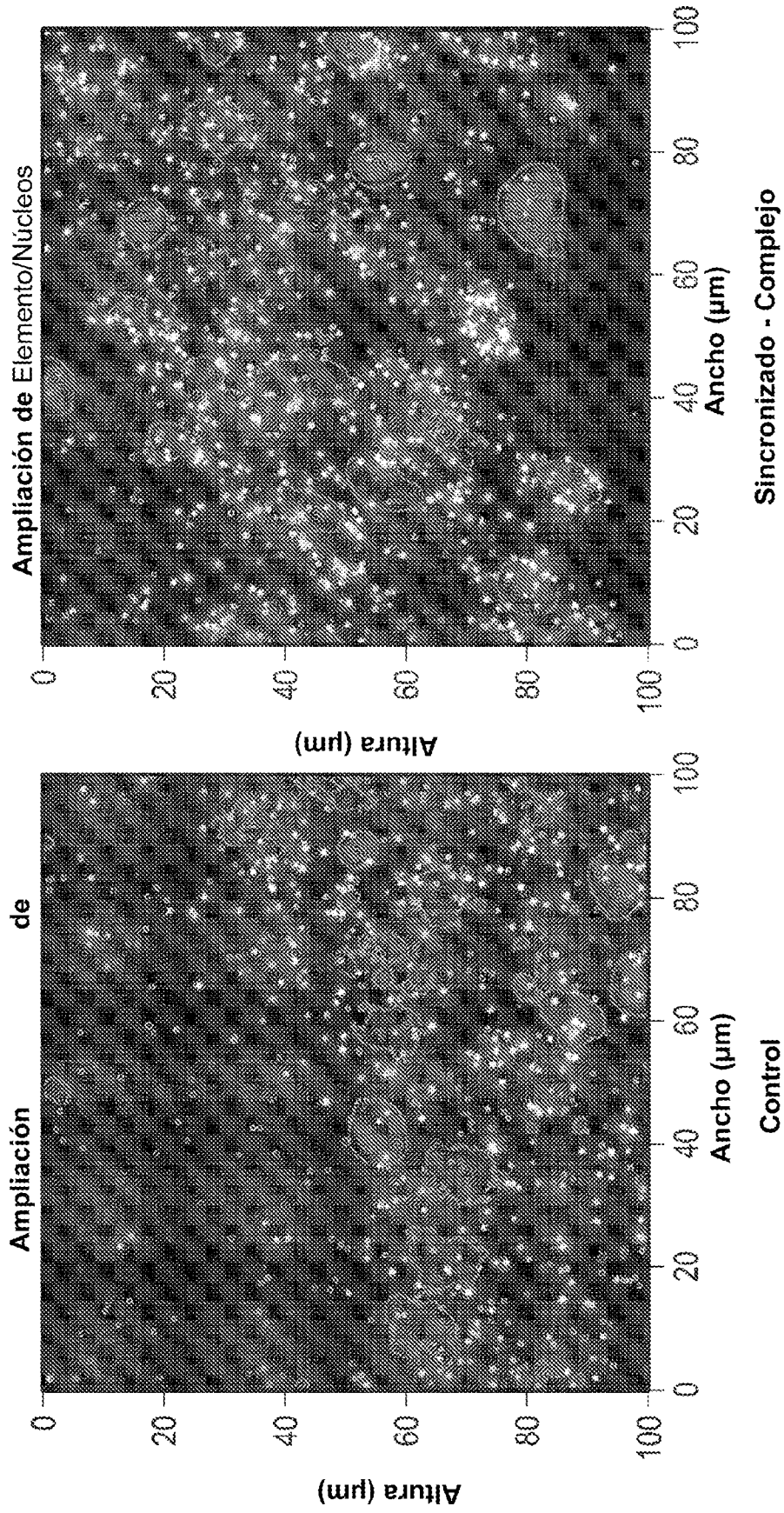


Figura 4B

