

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 835**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2016 E 22190953 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2023 EP 4151748**

54 Título: **Análisis multiplex de especímenes biológicos de ácidos nucleicos espacialmente distinguidos**

30 Prioridad:

10.04.2015 US 201562145874 P

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

17.06.2024

73 Titular/es:

**10X GENOMICS SWEDEN AB (50.0%)
Solnavägen 3 H
113 63 Stockholm, SE y
ILLUMINA, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FRISÉN, JONAS;
STÅHL, PATRIK;
LUNDEBERG, JOAKIM;
CANN, GORDON M;
BAZARGAN, LEILA y
ARAVANIS, ALEX**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 972 835 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

Análisis multiplex de especímenes biológicos de ácidos nucleicos espacialmente distinguidos

Antecedentes

5 Uno de cada cuatro hombres morirá de cáncer. Otras estadísticas de la Sociedad Americana del Cáncer predicen que una de cada cinco mujeres sufrirá el mismo destino. Hay tratamientos disponibles para muchos tipos de cáncer. Sin embargo, el éxito para la mayoría depende de la detección temprana.

Ahora se dice que el cáncer es una enfermedad del genoma. Muchos oncólogos e investigadores del cáncer esperan que los avances en las herramientas de análisis genómico proporcionen una detección temprana y una dirección para el tratamiento. Sin embargo, estas herramientas son más prominentes en los laboratorios de investigación que aún no se han desarrollado hasta el nivel de estar fácilmente disponibles para la gran mayoría de los oncólogos. Se necesitan mejoras.

Se ha dicho que en el momento del diagnóstico, todos los pacientes de cáncer son mosaicos. Son mosaicos porque tienen al menos dos genomas distintos: el genoma con el que nacieron y el genoma que adquirieron sin querer mediante el cáncer. Asimismo, a medida que crecen los tumores, se hacen evidentes distintas poblaciones de células cancerosas. Lo que lleva a mosaicos aún más complejos dentro del tumor. Esta heterogeneidad de células cancerosas a menudo resulta en subpoblaciones de células que responden de manera diferente a las terapias contra el cáncer. El resultado final es a menudo una respuesta positiva inicial de una subpoblación de células, lo que resulta en la observación de que el tumor del paciente se reduce, solamente para ser seguido por un nuevo crecimiento del tejido tumoral y, en algunos casos, metástasis. A pesar de la detección temprana del tumor, la incapacidad de identificar la subpoblación de células que son resistentes al tratamiento puede resultar en la pérdida del tiempo necesario para tratar un cáncer agresivo. Esto crea consecuencias adversas para el paciente tanto emocional como físicamente.

Los documentos WO 2013/150083 A1 y WO 2014/060483 A1 desvelan procedimientos de secuenciación de moléculas de ácido nucleico de una muestra con identificación posicional mediante la colocación de la muestra sobre un soporte sólido que tiene regiones que contienen oligonucleótidos con códigos específicos.

25 Existe la necesidad de herramientas genómicas que puedan distinguir subpoblaciones de células cancerosas en los tumores. La presente divulgación aborda esta necesidad y proporciona también otras ventajas.

Breve resumen

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

30 En un aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una pluralidad de sondas de ácido nucleico en un soporte sólido, en el que las sondas de ácido nucleico están situadas y unidas de forma aleatoria a través de una población de características en el soporte sólido, y en el que una sonda de ácido nucleico de la pluralidad de sondas de ácido nucleico comprende: i) una secuencia de unión a cebador universal, y ii) una secuencia de código de barras espacial que difiere de la secuencia de código de barras espacial de otras sondas de ácido nucleico en el soporte sólido; con la condición de que el soporte sólido no comprende una pluralidad de cuentas sintéticas asociadas a la pluralidad de códigos de barras espaciales. La condición surge del documento WO 2016/138496 A1 y elimina del ámbito de las reivindicaciones el tópico desvelado en las mismas.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una matriz espacial sobre un soporte sólido que comprende una pluralidad de sondas de ácido nucleico que se localizan y fijan de forma aleatoria a través de una población de características sobre el soporte sólido, dicho procedimiento comprende: a) distribuir de forma aleatoria la pluralidad de sondas de ácido nucleico sobre el soporte sólido, en el que una sonda de ácido nucleico de la pluralidad comprende: (i) una secuencia de unión a cebador universal, y (ii) una secuencia de código de barras espacial que difiere de la secuencia de código de barras espacial de otras sondas de ácido nucleico en el soporte sólido, y b) descodificar la secuencia de código de barras espacial de la pluralidad de sondas de ácido nucleico unidas a través de la población de características en el soporte sólido, identificando así la ubicación de las secuencias de código de barras espaciales en el soporte sólido y produciendo una matriz espacial, con la condición de que el soporte sólido no comprenda una pluralidad de cuentas sintéticas asociadas con la pluralidad de códigos de barras espaciales. La condición surge del documento WO 2016/138496 A1 y elimina del ámbito de las reivindicaciones el tópico desvelado en las mismas.

50 La presente divulgación proporciona un procedimiento para etiquetar espacialmente los ácidos nucleicos de un espécimen biológico. El procedimiento puede incluir pasos de (a) proporcionar un soporte sólido que comprende una pluralidad de diferentes sondas de ácido nucleico que se localizan aleatoriamente en el soporte sólido, en donde cada una de las diferentes sondas de ácido nucleico incluye una secuencia de código de barras que es diferente de la secuencia de código de barras de otras sondas localizadas aleatoriamente en el soporte sólido; (b) realizar una reacción de detección de ácido nucleico en el soporte sólido para localizar las secuencias de código de barras en el soporte sólido; (c) poner en contacto un espécimen biológico con el soporte sólido que tiene las sondas localizadas aleatoriamente; (d) hibridar las sondas localizadas aleatoriamente con ácidos nucleicos objetivo de porciones del

espécimen biológico que están próximas a las sondas localizadas aleatoriamente; y (e) modificar las sondas localizadas aleatoriamente que se hibridan con los ácidos nucleicos objetivo, produciendo así sondas modificadas que incluyen las secuencias de código de barras y una modificación específica del objetivo, espacialmente etiquetando así a los ácidos nucleicos del espécimen biológico.

5 Esta divulgación proporciona además un procedimiento para etiquetar espacialmente los ácidos nucleicos de un espécimen biológico, el procedimiento incluye los pasos de (a) anclar diferentes sondas de ácidos nucleicos a un soporte sólido para producir sondas localizadas aleatoriamente en el soporte sólido, en donde las diferentes sondas de ácidos nucleicos cada una incluye una secuencia de código de barras, y en donde cada una de las sondas localizadas aleatoriamente incluye diferentes secuencias de códigos de barras de otras sondas localizadas aleatoriamente en el soporte sólido; (b) realizar una reacción de detección de ácido nucleico en el soporte sólido para determinar las secuencias de código de barras de las sondas localizadas aleatoriamente en el soporte sólido; (c) poner en contacto un espécimen biológico con el soporte sólido que tiene las sondas localizadas aleatoriamente; (d) hibridar las sondas localizadas aleatoriamente con ácidos nucleicos objetivo de porciones del espécimen biológico que están próximas a las sondas localizadas aleatoriamente; y (e) extender las sondas localizadas aleatoriamente para producir sondas extendidas que incluyen las secuencias de código de barras y las secuencias de los ácidos nucleicos objetivo, espacialmente etiquetando así a los ácidos nucleicos del espécimen biológico.

También se proporciona un procedimiento para etiquetar espacialmente los ácidos nucleicos de un espécimen biológico que incluye los pasos de (a) proporcionar una pluralidad de cebadores de ácidos nucleicos anclados a un soporte sólido, en donde los cebadores de ácidos nucleicos de la pluralidad incluyen una secuencia de cebador universal que es común a los cebadores de ácido nucleico en la pluralidad; (b) unir una población de sondas de ácido nucleico a la pluralidad de cebadores de ácido nucleico, en donde las sondas de ácido nucleico incluyen una secuencia de unión de cebador universal que se hibrida con la secuencia de cebador universal, una secuencia de captura del objetivo y una secuencia de código de barras que difiere de las secuencias de código de barras de otras sondas de ácido nucleico en la población, anclando así las diferentes sondas de ácido nucleico en posiciones localizadas aleatoriamente en el soporte sólido; (c) amplificar las diferentes sondas de ácido nucleico por extensión de los cebadores de ácido nucleico, produciendo así agrupaciones de ácidos nucleicos que tienen copias de la secuencia de código de barras y la secuencia de captura del objetivo en las posiciones localizadas aleatoriamente en el soporte sólido; (d) realizar una reacción de secuenciación para determinar las secuencias de código de barras en las posiciones localizadas aleatoriamente en el soporte sólido; poner en contacto un espécimen biológico con las agrupaciones de ácidos nucleicos en el soporte sólido; (f) hibridar las secuencias de captura del objetivo de las agrupaciones con ácidos nucleicos objetivo de porciones del espécimen biológico que están próximas a las agrupaciones; y (g) extender las secuencias de captura del objetivo para producir sondas extendidas que incluyen secuencias de los ácidos nucleicos objetivo y las copias de las secuencias de código de barras, etiquetando así los ácidos nucleicos del espécimen biológico.

35 **Breve descripción de los dibujos**

Fig. 1 muestra una representación diagramática de las etapas y los reactivos que se pueden usar para generar sondas oligo dT con código de barras en una celda de flujo de Illumina, crear sondas extendidas con código de barras que tienen secuencias de ARNm, y liberar las sondas extendidas de la celda de flujo.

40 Fig. 2 muestra datos que indican la disponibilidad de secuencias de captura de oligo dT en sondas después de la amplificación en puente de las sondas y la digestión de la enzima de restricción con BspH1 para eliminar uno de los sitios de unión del cebador usados para la amplificación en puente.

Fig. 3 muestra los criterios de medición de secuenciación de la celda de flujo descrita en el Ejemplo 1 y mostrada en la Fig. 2.

45 Fig. 4 el número de códigos de barras únicos determinados en 21 placas de la celda de flujo descrita en el Ejemplo 1 y mostrada en la Fig. 2.

Fig. 5 muestra una imagen de células capturadas en una celda de flujo con patrones (Panel A) y datos de recuento de células (Panel B).

Fig. 6 muestra células que permanecen adheridas a una celda de flujo en diferentes condiciones.

50 Fig. 7 muestra una representación diagramática de las etapas y los reactivos usados para crear sondas unidas a un gel (Panel A), una representación diagramática de las etapas y los reactivos usados para capturar los ácidos nucleicos objetivo usando las sondas unidas al gel y etiquetar con fluorescencia las sondas (Panel B), y una imagen creada por los ácidos nucleicos diana etiquetados con fluorescencia después de la captura por las sondas y la eliminación del tejido del gel.

55 Fig. 8 muestra una representación esquemática de las etapas y los reactivos usados para capturar los ácidos nucleicos objetivo usando sondas unidas a BeadArray™ y etiquetar con fluorescencia las sondas (Panel A), y una imagen creada por los ácidos nucleicos objetivo etiquetados con fluorescencia después de la captura por las sondas y eliminación del tejido del BeadArray™.

Descripción detallada

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación proporciona composiciones, aparatos y procedimientos para conservar la información espacial cuando se realizan análisis de ácidos nucleicos multiplex de especímenes biológicos. Se encuentra disponible una variedad de herramientas para análisis de ácidos nucleicos multiplex que incluyen, por ejemplo, micromatrices de ácidos nucleicos y las denominadas plataformas de secuenciación de "próxima generación". Tales herramientas permiten la detección paralela de colecciones muy grandes y complejas de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo, colecciones de ADN que representan todo o casi todo el material genético de un organismo (es decir, el "genoma"), colecciones de ARN (o ADNc) que representan todo o casi todo el complemento de genes expresados (es decir, el "transcriptoma") para un organismo y, en algunos casos, las colecciones pueden incluir varios genomas y/o transcriptomas de varios organismos diferentes (por ejemplo, un metaboloma o un bioma de una comunidad o ecosistema). Aunque estas herramientas brindan una gran cantidad de información respecto a *qué* secuencias de ácido nucleico están presentes en un espécimen biológico que se está evaluando, no distinguen de forma inherente *el sitio en que* reside un ácido nucleico particular en el espécimen biológico. De hecho, la gran mayoría de las muestras aplicadas a las herramientas de análisis de ácidos nucleicos multiplex son homogeneizadas derivados de mezclas de muchas células diferentes de un espécimen biológico. Como resultado, se pierde información espacial y los resultados obtenidos con estas herramientas constituyen un transcriptoma promedio o un genoma promedio para el espécimen, perdiéndose diferencias importantes entre las células individuales.

La presente divulgación proporciona modificaciones nuevas y útiles a las herramientas de análisis de ácidos nucleicos multiplex existentes para permitir la conservación de la información espacial de los especímenes biológicos de las que se obtienen los ácidos nucleicos. Por ejemplo, los soportes sólidos que se usan usualmente para las técnicas de secuenciación por síntesis multiplex (SBS, por sus siglas en inglés) se pueden modificar para su uso en la captura y el etiquetado espacial de los ácidos nucleicos de un espécimen biológico. Como se establece en los ejemplos a continuación, los soportes sólidos usados para una plataforma SBS o BeadArray™ comercializada por Illumina (San Diego, CA) se pueden modificar para el etiquetado espacial. Sin embargo, se entenderá que se puede hacer y usar cualquiera de una variedad de soportes sólidos de acuerdo con las enseñanzas de la presente. Los ácidos nucleicos etiquetados espacialmente se pueden eliminar del soporte sólido, agrupar y anclar a un segundo soporte sólido para la detección en cualquiera de una variedad de sistemas de análisis de ácidos nucleicos multiplex que incluyen, por ejemplo, una plataforma de secuenciación o una plataforma de microarreglos establecida en la presente.

La información espacial proporcionada por un procedimiento, composición o aparato en la presente memoria puede incluir, por ejemplo, la localización de una o más células en un tejido (u otro espécimen) que tiene un alelo particular en uno o más loci (por ejemplo, un genotipo), tiene una variación estructural particular en el genoma (por ejemplo, fusión, inserción, delección, reordenamiento, etc.), tiene una firma epigenética particular (por ejemplo, metilación), expresa un gen particular, expresa un alelo particular de un gen, expresa una variante de empalme particular de un gen o similar. Además de identificar ácidos nucleicos de acuerdo con su localización espacial en un espécimen biológico, un procedimiento, una composición o un aparato de la presente divulgación se pueden usar para cuantificar uno o más ácidos nucleicos de acuerdo con su localización espacial. Por ejemplo, la información espacial de una o más células en un tejido (u otro espécimen) puede incluir la cantidad de un alelo particular o una región cromosómica en un genoma (por ejemplo, ploidía); la cantidad de modificación epigenética de un locus genético (por ejemplo, metilación); nivel de expresión para un gen, alelo o variante de empalme particular; o similar. Las cantidades pueden ser cantidades absolutas o cantidades relativas de acuerdo con medidas similares obtenidas en la técnica para muestras mixtas o no etiquetadas espacialmente.

Se puede usar un procedimiento establecido en la presente para la detección localizada de un ácido nucleico en un espécimen biológico. Se puede usar un procedimiento para identificar o caracterizar todo el transcriptoma o genoma de un espécimen biológico. Alternativamente, se puede usar un procedimiento para identificar o caracterizar solamente una parte del transcriptoma o genoma de un espécimen. Un subconjunto de transcritos o genes evaluados en un procedimiento de la presente puede estar relacionado con una enfermedad o afección particular.

Un procedimiento establecido en la presente se puede usar para la detección localizada o espacial de ácidos nucleicos, ya sea ADN o ARN, en un espécimen biológico. Por lo tanto, se pueden localizar una o más moléculas de ARN o ADN con respecto a su posición o localización nativa dentro de una célula o tejido u otro espécimen biológico. Por ejemplo, uno o más ácidos nucleicos se pueden localizar en una célula o grupo de células adyacentes, o tipo de célula, o en regiones particulares de áreas dentro de una muestra de tejido. La localización o posición nativa de las moléculas individuales de ARN o ADN se puede determinar usando un procedimiento, aparato o composición de la presente divulgación.

Se entenderá que los términos usados en la presente adquieren su significado ordinario en la técnica correspondiente, a menos que se especifique lo contrario. Varios términos usados en la presente y sus significados se establecen a continuación.

Como se usa en la presente memoria, el término "amplicón", cuando se usa en referencia a un ácido nucleico, significa el producto de copiar el ácido nucleico, en el que el producto tiene una secuencia de nucleótidos que es igual o

complementaria a al menos una porción de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico. Un amplicón puede ser producido por cualquiera de una variedad de procedimientos de amplificación que usan el ácido nucleico, o un amplicón del mismo, como un molde, incluyendo, por ejemplo, extensión de polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), amplificación de círculo rodante (RCA, por sus siglas en inglés), amplificación por desplazamiento múltiple (MDA, por sus siglas en inglés), extensión de ligadura, o reacción en cadena de ligadura. Un amplicón puede ser una molécula de ácido nucleico que tiene una sola copia de una secuencia de nucleótidos particular (por ejemplo, un producto de PCR) o múltiples copias de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, un producto concatémico de RCA). Un primer amplicón de un ácido nucleico objetivo suele ser una copia complementaria. Los amplicones subsecuentes son copias que se crean, después de la generación del primer amplicón, a partir del ácido nucleico objetivo o del primer amplicón. Un amplicón subsecuente puede tener una secuencia que sea sustancialmente complementaria al ácido nucleico objetivo o sustancialmente idéntica al ácido nucleico objetivo.

Como se usa en la presente, el termino "arreglo" se refiere a una población de atributos o sitios que se pueden diferenciar entre si de acuerdo con la localización relativa. Las diferentes moléculas que se encuentran en diferentes sitios de un arreglo se pueden diferenciar entre si de acuerdo con las localizaciones de los sitios en el arreglo. Un sitio individual de un arreglo puede incluir una o más moléculas de un tipo particular. Por ejemplo, un sitio puede incluir una sola molécula de ácido nucleico objetivo que tiene una secuencia particular, o un sitio puede incluir varias moléculas de ácido nucleico que tienen la misma secuencia (y/o secuencia complementaria de la misma). Los sitios de un arreglo pueden ser diferentes atributos localizados en el mismo sustrato. Los atributos ejemplares incluyen, sin limitación, pocillos en un sustrato, proyecciones desde un sustrato, crestas en un sustrato, o canales en un sustrato. Los sitios de un arreglo pueden ser sustratos separados, cada uno con una molécula diferente. Se pueden identificar diferentes moléculas ancladas a sustratos separados de acuerdo con las localizaciones de los sustratos en una superficie a la cual están asociados los sustratos, o de acuerdo con las localizaciones de los sustratos en un líquido o gel.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "unido" se refiere al estado de dos cosas que están unidas, sujetas, adheridas, conectadas o ligadas entre sí. Por ejemplo, un analito, tal como un ácido nucleico, puede unirse a un material, tal como un gel o un soporte sólido, mediante un enlace covalente o no covalente. Una unión covalente se caracteriza por compartir pares de electrones entre átomos. Una unión no covalente es una unión química que no involucra compartir pares de electrones y puede incluir, por ejemplo, puentes de hidrogeno, uniones iónicas, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofílicas e interacciones hidrofóbicas.

Como se usa en la presente memoria, el término "secuencia de código de barras" significa una serie de nucleótidos en un ácido nucleico que se puede usar para identificar el ácido nucleico, una característica del ácido nucleico, o una manipulación que se ha llevado a cabo en el ácido nucleico. La secuencia de código de barras puede ser una secuencia que ocurre naturalmente o una secuencia que no ocurre naturalmente en el organismo del cual se obtuvo el ácido nucleico con el código de barras. Una secuencia de código de barras puede ser única para una sola especie de ácido nucleico en una población, o una secuencia de código de barras puede ser compartida por varias especies diferentes de ácidos nucleicos en una población. Por ejemplo, cada sonda de ácido nucleico de una población puede incluir diferentes secuencias de código de barras de todas las demás sondas de ácidos nucleicos de la población. Alternativamente, cada sonda de ácido nucleico en una población puede incluir diferentes secuencias de código de barras de algunas o la mayoría de las otras sondas de ácidos nucleicos en una población. Por ejemplo, cada sonda en una población puede tener un código de barras que está presente para varias sondas diferentes en la población, aunque las sondas con el código de barras común difieren entre sí en otras regiones de secuencia a lo largo de su longitud. En realizaciones particulares, una o más secuencias de código de barras que se usan con un espécimen biológico no están presentes en el genoma, transcriptoma u en otros ácidos nucleicos del espécimen biológico. Por ejemplo, las secuencias de código de barras pueden tener menos de 80%, 70%, 60%, 50% o 40% de identidad de secuencia con las secuencias de ácido nucleico en un espécimen biológico particular.

Como se usa en la presente memoria, el término "especimen biológico" pretende significar una o más células, tejidos, organismos o porciones de los mismos. Un espécimen biológico se puede obtener de cualquiera de una variedad de organismos. Los ejemplos de organismos incluyen, pero sin limitación, un mamífero, tal como roedores, ratones, ratas, conejos, cobayos, ungulados, caballos, ovejas, cerdos, cabras, vacas, gatos, perros, primates (es decir, seres humanos o primates no humanos); una planta tal como *Arabidopsis thaliana*, maíz, sorgo, avena, trigo, arroz, canola o soja; un alga tal como *Chlamydomonas reinhardtii*; un nematodo tal como *Caenorhabditis elegans*; un insecto tal como *Drosophila melanogaster*, mosquitos, moscas de la fruta, abejas melíferas o arañas; un pez tal como peces cebra; un reptil; un anfibio tal como ranas o *Xenopus laevis*; *Dictyostelium discoideum*; un hongo tal como *Pneumocystis carinii*, *Takifugu rubripes*, levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*; o *Plasmodium falciparum*. Los ácidos nucleicos objetivo también se pueden derivar de un procarionta tal como bacterias, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* o *Mycoplasma pneumoniae*; una arquea; un virus tal como el virus de la Hepatitis C o el virus de la inmunodeficiencia humana; o un viroide. Los especímenes se pueden derivar de un cultivo o población homogéneos de los organismos anteriores o, alternativamente, de una colección de varios organismos diferentes, por ejemplo, en una comunidad o ecosistema.

Como se usa en la presente memoria, el término "sitio de escisión" pretende significar una localización en una molécula de ácido nucleico que es susceptible de rupturas de uniones. La localización puede ser específica de un proceso químico, enzimático o físico en particular que resulte en la ruptura de uniones. Por ejemplo, la localización puede ser

un nucleótido que sea abásico o un nucleótido que tiene una base que es susceptible de eliminarse para crear un sitio abásico. Los ejemplos de nucleótidos que son susceptibles de ser eliminados incluyen uracilo y 8-oxo-guanina, como se establece con más detalle a continuación. La localización también puede estar en o cerca de una secuencia de reconocimiento para una endonucleasa de restricción tal como una enzima de corte.

5 Como se usa en la presente memoria, el término "agrupación", cuando se usa en referencia a ácidos nucleicos, se refiere a una población de ácidos nucleicos que se une a un soporte sólido para formar un atributo o sitio. Los ácidos nucleicos son generalmente miembros de una sola especie, formando así una agrupación monoclonal. Una "población monoclonal" de ácidos nucleicos es una población que es homogénea con respecto a una secuencia de nucleótidos particular. Las agrupación no necesitan ser monoclonales. Mas bien, para algunas aplicaciones, una agrupación puede estar poblada predominantemente con amplicónes de un primer ácido nucleico y también puede tener un nivel bajo de amplicónes contaminantes de un segundo ácido nucleico. Por ejemplo, cuando se va a usar un arreglo de agrupaciones en una aplicación de detección, un nivel aceptable de contaminación sería un nivel que no afecte la relación señal/ruido o la resolución de la técnica de detección de forma inaceptable. En consecuencia, la clonalidad aparente generalmente será relevante para un uso o aplicación particular de un arreglo hecha por los procedimientos establecidos en la presente. Los niveles ejemplares de contaminación que pueden ser aceptables en un grupo individual incluyen, pero no se limitan a, como máximo 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 5 25% o 35% de amplicónes contaminantes. Los ácidos nucleicos en una agrupación generalmente se unen covalentemente a un soporte sólido, por ejemplo, mediante sus extremos 5', pero en algunos casos son posibles otros medios de unión. Los ácidos nucleicos en una agrupación pueden ser de una sola hebra o de doble hebra. En algunas realizaciones, pero no en todas, las agrupaciones se realizan por un procedimiento de amplificación en fase solida conocido como amplificación en puente. Las configuraciones ejemplares para agrupaciones y procedimientos para su producción se establecen, por ejemplo, en la Patente de los EE. UU. Núm. 5.641.658; la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 2002/0055100; la Patente de los EE. UU. Núm. 7.115.400; la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 2004/0096853; la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 2004/0002090; la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 2007/0128624; y la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 2008/0009420.

Como se usa en la presente memoria, el término "diferente", cuando se usa en referencia a ácidos nucleicos, significa que los ácidos nucleicos tienen secuencias de nucleótidos que no son iguales entre sí. Dos o más ácidos nucleicos pueden tener secuencias de nucleótidos diferentes en el total de su longitud. Alternativamente, dos o más ácidos nucleicos pueden tener secuencias de nucleótidos que son diferentes a lo largo de una parte sustancial de su longitud. Por ejemplo, dos o más ácidos nucleicos pueden tener porciones de la secuencia de nucleótidos objetivo que son diferentes para las dos o más moléculas y al mismo tiempo tener una porción de la secuencia universal que es la misma en las dos o más moléculas. Dos perlas pueden ser diferentes entre sí en virtud de estar ancladas a diferentes ácidos nucleicos.

Como se usa en la presente memoria, el término "cada uno", cuando se usa en referencia a una colección de artículos, pretende identificar un artículo individual en la colección pero no necesariamente se refiere a cada artículo en la colección. Pueden ocurrir excepciones si la divulgación explícita o el contexto dictan claramente lo contrario.

Como se usa en la presente memoria, el término "extender", cuando se usa en referencia a un ácido nucleico, pretende significar la adición de al menos un nucleótido u oligonucleótido al ácido nucleico. En realizaciones particulares, se pueden añadir uno o más nucleótidos al extremo 3' de un ácido nucleico, por ejemplo, mediante catálisis de polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa reversa). Se pueden usar procedimientos químicos o enzimáticos para añadir uno o más nucleótidos al extremo 3' o 5' de un ácido nucleico. Se pueden añadir uno o más oligonucleótidos al extremo 3' o 5' de un ácido nucleico, por ejemplo, mediante procedimientos químicos o enzimáticos (por ejemplo, catálisis de ligasa). Un ácido nucleico se puede extender de una manera dirigida por un molde, por lo que el producto de extensión es complementario a un ácido nucleico molde que se hibrida con el ácido nucleico que se extiende.

Como se usa en la presente memoria, el término "atributo" significa una localización en una disposición para una especie particular de molécula. Un atributo puede contener solamente una sola molécula o puede contener una población de varias moléculas de la misma especie. Los atributos de un arreglo típicamente son discretos. Los atributos discretos pueden ser contiguos o tener espacios entre sí. El tamaño de los atributos y/o del espacio entre los atributos puede variar de modo tal que las disposiciones pueden ser de densidad alta, densidad media o densidad baja. Las disposiciones de alta densidad se caracterizan por tener sitios separados por menos de aproximadamente 15 µm. las disposiciones de densidad media tienen sitios separados por aproximadamente de 15 a 30 µm, mientras que las disposiciones de densidad baja tienen sitios separados por más de 30 µm. Una disposición útil en la presente puede tener, por ejemplo, sitios que están separados por menos de 100 µm, 50 µm, 10 µm, 5 µm, 1 µm o 0,5 µm. Se puede usar un aparato o procedimiento de la presente divulgación para detectar un arreglo a una resolución suficiente para distinguir sitios en las densidades o rangos de densidad anteriores.

Como se usa en la presente memoria, el término "mezcla fluidica" pretende significar dos o más elementos diferentes que están presentes simultáneamente en una solución. Típicamente, los dos o más elementos se pueden difundir libremente en la solución. Los dos o más elementos pueden ser diferentes tipos de elementos (por ejemplo, un ácido nucleico y una proteína que son diferentes tipos de moléculas) o pueden ser diferentes especies del mismo tipo de elementos (por ejemplo, dos moléculas de ácido nucleico que tienen secuencias diferentes). Los elementos ejemplares

que pueden estar en una mezcla fluidica incluyen, pero no se limitan a, moléculas, células o perlas.

Como se usa en la presente memoria, el término "celda de flujo" pretende significar un recipiente que tiene una cámara en donde se puede llevar a cabo una reacción, una entrada para suministrar reactivos a la cámara y una salida para retirar reactivos de la cámara. En algunas realizaciones, la cámara está configurada para la detección de la reacción que ocurre en la cámara. Por ejemplo, la cámara puede incluir una o más superficies transparentes que permiten la detección óptica de especímenes biológicos, moléculas etiquetadas ópticamente, o similares, en la cámara. Los ejemplos de celdas de flujo incluyen, pero sin limitación, las usadas en un aparato de secuenciación de ácidos nucleicos tal como las celdas de flujo para las plataformas Genome Analyzer®, MiSeq®, NextSeq® o HiSeq® comercializadas por Illumina, Inc. (San Diego, CA); o para las plataformas de secuenciación SOLiD™ o Ion Torrent™ comercializadas por Life Technologies (Carlsbad, CA). También se describen celdas de flujo ejemplares y procedimientos para su fabricación y uso, por ejemplo, en el documento WO 2014/142841 A1; la Publicación de la Solicitud de Patente de los EE. UU. Núm. 2010/0111768 A1, y la Patente de los EE. UU. Núm. 8,951,781.

Como se usa en la presente memoria, el término "gel" pretende significar un material semirígido que es permeable a líquidos y gases. Típicamente, el material de gel se puede hinchar cuando se absorbe líquido y se puede contraer cuando se elimina líquido por secado. Los ejemplos de geles incluyen, pero sin limitación, los que tienen una estructura coloidal, tal como agarosa; una estructura de malla de polímero, tal como gelatina; o una estructura polimérica reticulada, tal como poli(acrilamida), SFA (véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente de los EE. UU. Núm. 2011/0059865 A1) o PAZAM (véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente de los EE. UU. Núm. 2014/0079923 A1). Un material de gel particularmente útil se adaptará a la forma de un pozo u otro atributo cóncavo en donde resida.

Como se usa en la presente memoria, se pretende que los términos "ácido nucleico" y "nucleótido" sean consistentes con su uso en la técnica, e incluyan especies que ocurren naturalmente o análogos funcionales de las mismas. Los análogos funcionales de ácidos nucleicos particularmente útiles son capaces de hibridarse con un ácido nucleico de una manera específica a la secuencia o se pueden usar como molde para la replicación de una secuencia de nucleótidos particular. Los ácidos nucleicos que ocurren naturalmente generalmente tienen un esqueleto que contiene uniones fosfodiéster. Una estructura análoga puede tener un enlace al esqueleto alternativo, que incluye cualquiera de una variedad de los conocidos en la técnica. Los ácidos nucleicos que ocurren naturalmente generalmente tienen un azúcar desoxirribosa (por ejemplo, se encuentra en el ácido desoxirribonucleico (ADN)), o un azúcar ribosa (por ejemplo, se encuentra en el ácido ribonucleico (ARN)). Un ácido nucleico puede contener nucleótidos que tienen cualquiera de una variedad de análogos de estos restos de azúcar que se conocen en la técnica. Un ácido nucleico puede incluir nucleótidos nativos o no nativos. En este sentido, un ácido desoxirribonucleico nativo puede tener una o más bases seleccionadas del grupo que consiste en adenina, timina, citosina o guanina, y un ácido ribonucleico puede tener una o más bases seleccionadas del grupo que consiste en uracilo, adenina, citosina o guanina. Las bases no nativas útiles que se pueden incluir en un ácido nucleico o nucleótido se conocen en la técnica. Los términos "sonda" o "diana", cuando se usan en referencia a un ácido nucleico o una secuencia de un ácido nucleico, pretenden ser identificadores semánticos para el ácido nucleico o la secuencia en el contexto de un procedimiento o composición establecidos en la presente memoria, y no limitan necesariamente la estructura o función del ácido nucleico o secuencia más allá de lo que se indica explícitamente. Los términos "sonda" y "objetivo" se pueden aplicar similarmente a otros analitos tal como proteínas, moléculas pequeñas, células o similares.

Como se usa en la presente memoria, el término "paso", cuando se usa en referencia a las características de una disposición, pretende referirse al espacio de centro a centro para las características adyacentes. Un patrón de atributos se puede caracterizar en términos de campo promedio. El patrón se puede ordenar de modo tal que el coeficiente de variación alrededor del campo promedio sea pequeño o el patrón puede ser aleatorio, en cuyo caso el coeficiente de variación puede ser relativamente grande. En cualquier caso, el paso promedio puede ser, por ejemplo, de al menos aproximadamente 10 nm, 0,1 µm, 0,5 µm, 1 µm, 5 µm, 10 µm, 100 µm o mayor. Alternativa o adicionalmente, el paso promedio puede ser, por ejemplo, como máximo de aproximadamente 100 µm, 10 µm, 5 µm, 1 µm, 0,5 µm, 0,1 µm o menor. Por supuesto, el campo promedio para un patrón particular de atributos puede estar entre uno de los valores más bajos y uno de los valores más altos seleccionados de los rangos anteriores.

Como se usa en la presente memoria, el término "poli T o poli A", cuando se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico, pretende significar una serie de dos o más bases de timina (T) o adenina (A), respectivamente. Una poli T o poli A puede incluir al menos aproximadamente 2, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20 o más de las bases T o A, respectivamente. Alternativa o adicionalmente, una poli T o poli A puede incluir como máximo aproximadamente 30, 20, 18, 15, 12, 10, 8, 5 o 2 de las bases T o A, respectivamente.

Como se usa en la presente memoria, el término "aleatorio" se puede usar para hacer referencia a la disposición espacial o composición de localizaciones en una superficie. Por ejemplo, existen al menos dos tipos de orden para una matriz descrita en la presente memoria, el primero relacionado con el espacio y la localización relativa de los atributos (también denominados "sitios"), y el segundo relacionado con la identidad o el conocimiento predeterminado de la especie particular de molécula que está presente en un atributo particular. En consecuencia, los atributos de una matriz pueden estar espaciados al azar de manera que los atributos vecinos más cercanos tengan un espaciado variable entre sí. Alternativamente, el espaciado entre los atributos puede ordenarse, por ejemplo, formando un patrón regular, tal como una rejilla rectilínea o una rejilla hexagonal. En otro aspecto, los atributos de un arreglo pueden ser

aleatorios con respecto a la identidad o al conocimiento predeterminado de la especie de analito (por ejemplo, un ácido nucleico de una secuencia particular) que ocupa cada atributo independientemente de si el espacio produce un patrón aleatorio o un patrón ordenado. Un arreglo establecido en la presente puede estar ordenado en un aspecto y aleatorio en otro. Por ejemplo, en algunas realizaciones establecidas en la presente memoria, una superficie se pone en contacto con una población de ácidos nucleicos en condiciones en las que los ácidos nucleicos se unen en sitios que están ordenados con respecto a sus localizaciones relativas pero "localizados de forma aleatoria" con respecto al conocimiento de la secuencia de las especies de ácidos nucleicos presentes en cualquier sitio particular. La referencia a la "distribución aleatoria" de ácidos nucleicos en localizaciones sobre una superficie pretende referir a la ausencia de conocimiento o ausencia de predeterminación con respecto a que ácido nucleico se capturara en que localización (independientemente de si las localizaciones están dispuestas en un patrón ordenado o no).

Como se usa en la presente memoria, el término "soporte sólido" se refiere a un sustrato rígido que es insoluble en líquido acuoso. El sustrato puede ser no poroso o poroso. Opcionalmente, el sustrato puede ser capaz de absorber un líquido (por ejemplo, debido a la porosidad), pero típicamente será lo suficientemente rígido para que el sustrato no se hinche sustancialmente cuando absorba el líquido y no se contraiga sustancialmente cuando el líquido se elimine por secado. Un soporte sólido no poroso es generalmente impermeable a líquidos o gases. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluyendo acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon™, olefinas cíclicas, poliimidas, etc.), nylon, cerámicas, resinas, Zeonor, sílice o materiales basados en sílice, incluidos silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, paquetes de fibras ópticas y polímeros.

Los soportes sólidos particularmente útiles para algunas realizaciones están localizados dentro de un aparato de celda de flujo. Las celdas de flujo ejemplares se establecen con mayor detalle en la presente.

Como se usa en la presente memoria, el término "etiqueta espacial" pretende significar un ácido nucleico que tiene una secuencia que es indicativa de una localización. Típicamente, el ácido nucleico es una molécula sintética que tiene una secuencia que no se encuentra en uno o más especímenes biológicos que se usaran con el ácido nucleico. Sin embargo, en algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se puede derivar naturalmente o la secuencia del ácido nucleico puede ocurrir naturalmente, por ejemplo, en un espécimen biológico que se usa con el ácido nucleico. La localización indicada por una etiqueta espacial puede ser una localización en o sobre un espécimen biológico, en o sobre un soporte sólido, o una combinación de los mismos. Una secuencia de código de barras puede funcionar como una etiqueta espacial.

Como se usa en la presente memoria, el término "tejido" pretende significar una agregación de células y, opcionalmente, materia intercelular. Típicamente, las células de un tejido no flotan libremente en la solución y, en cambio, están ancladas entre sí para formar una estructura multicelular. Los tipos de tejido ejemplares incluyen tejidos musculares, nerviosos, epidérmicos y conectivos.

Como se usa en la presente memoria, el término "secuencia universal" se refiere a una serie de nucleótidos que es común a dos o más moléculas de ácido nucleico, incluso si las moléculas también tienen regiones de secuencia que difieren entre sí. Una secuencia universal presente en diferentes miembros de una colección de moléculas puede permitir la captura de múltiples ácidos nucleicos diferentes usando una población de cebadores universales que son complementarios a la secuencia universal. Similarmente, una secuencia universal presente en diferentes miembros de una colección de moléculas puede permitir la replicación o amplificación de múltiples ácidos nucleicos diferentes usando una población de cebadores universales que son complementarios a la secuencia universal. Por lo tanto, un ácido nucleico de captura universal o un cebador universal incluye una secuencia que se puede hibridar específicamente con una secuencia universal. Las moléculas de ácido nucleico objetivo se pueden modificar para unirse a adaptadores universales, por ejemplo, en uno o ambos extremos de las diferentes secuencias objetivo.

Las realizaciones establecidas a continuación, y enumeradas en las reivindicaciones, se pueden entender en vista de las definiciones anteriores.

La presente divulgación proporciona un procedimiento para etiquetar espacialmente los ácidos nucleicos de un espécimen biológico. El procedimiento puede incluir los pasos de (a) anclar diferentes sondas de ácido nucleico a un soporte sólido para producir sondas localizadas aleatoriamente en el soporte sólido, en donde cada una de las diferentes sondas de ácido nucleico incluye una secuencia de código de barras, y en donde cada una de las sondas localizadas aleatoriamente incluye diferentes secuencias de códigos de barras de otras sondas localizadas aleatoriamente en el soporte sólido; (b) realizar una reacción de detección de ácido nucleico en el soporte sólido para determinar las secuencias de código de barras de las sondas localizadas aleatoriamente en el soporte sólido; (c) poner en contacto un espécimen biológico con el soporte sólido que tiene las sondas localizadas aleatoriamente; (d) hibridar las sondas localizadas aleatoriamente con ácidos nucleicos objetivo de porciones del espécimen biológico que están próximas a las sondas localizadas aleatoriamente; y (e) extender las sondas localizadas aleatoriamente para producir sondas extendidas que incluyen las secuencias de código de barras y las secuencias de los ácidos nucleicos objetivo, espacialmente etiquetando así los ácidos nucleicos del espécimen biológico.

Cualquiera de una variedad de soportes sólidos se puede usar en un procedimiento, composición o aparato de la presente divulgación. Los soportes sólidos particularmente útiles son los usados para los arreglos de ácidos nucleicos.

Los ejemplos incluyen vidrio, vidrio modificado, vidrio funcionalizado, vidrios inorgánicos, microesferas (por ejemplo, partículas inertes y/o magnéticas), plásticos, polisacáridos, nylon, nitrocelulosa, cerámica, resinas, sílice, materiales a base de sílice, carbono, metales, una fibra óptica o paquetes de fibra óptica, polímeros y placas de múltiples pozos (por ejemplo, de microtitulación). Los plásticos ejemplares incluyen acrílicos, poliestireno, copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos y Teflon™. Los ejemplos de materiales basados en sílice incluyen silicio y varias formas de silicio modificado.

En realizaciones particulares, un soporte sólido puede estar dentro o ser parte de un recipiente, tal como un pozo, tubo, canal, cubeta, placa de Petri, botella o similar. Un recipiente particularmente útil es una celda de flujo, por ejemplo, como se describe en el documento WO 2014/142841 A1; la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 2010/0111768 A1, y la Patente de los EE. UU. Núm. 8.951.781, o Bentley *et al.*, *Nature* 456:53-59 (2008). Las celdas de flujo ejemplares son aquellas que están comercialmente disponibles a partir de Illumina, Inc. (San Diego, CA) para uso con una plataforma de secuenciación tal como una plataforma Genome Analyzer®, MiSeq®, NextSeq® o HiSeq®. Otro recipiente particularmente útil es un pozo en una placa de múltiples pozos o placa de microtitulación.

Opcionalmente, un soporte sólido puede incluir un recubrimiento de gel. La unión de ácidos nucleicos a un soporte sólido mediante un gel se ejemplifica por las celdas de flujo disponibles comercialmente por Illumina Inc. (San Diego, CA) o descritas en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 2011/0059865 A1, 2014/0079923 A1, o 2015/0005447 A1; o la Publicación PCT Núm. WO 2008/093098. Núm. WO 2008/093098. Los geles ejemplares que se pueden usar en los procedimientos y aparatos establecidos en la presente incluyen, pero sin limitación, aquellos que tienen una estructura coloidal, tal como agarosa; una estructura de malla de polímero, tal como gelatina; o una estructura polimérica reticulada, tal como poliacrilamida, SFA (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 2011/0059865 A1) o PAZAM (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 2014/0079923 A1, o 2015/0005447 A1).

En algunas realizaciones, un soporte sólido se puede configurar como una serie de atributos a los que se pueden anclar los ácidos nucleicos. Los atributos pueden estar presentes en cualquiera de una variedad de formatos deseados. Por ejemplo, los atributos pueden ser pozos, fosas, canales, crestas, regiones elevadas, picas, postes o similares. Los atributos ejemplares incluyen pozos que están presentes en sustratos usados para plataformas comerciales de secuenciación vendidas por 454 LifeSciences (una subsidiaria de Roche; Basilea, Suiza) o Ion Torrent (una subsidiaria de Life Technologies; Carlsbad, California). Otros sustratos que tienen pocillos incluyen, por ejemplo, fibra óptica grabada y otros sustratos descritos en las Patentes de los EE. UU. Núm. 6.266.459; 6.355.431; 6.770.441; 6.859.570; 6.210.891; 6.258.568; 6.274.320; la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 2009/0026082 A1; 2009/0127589 A1; 2010/0137143 A1; 2010/0282617 A1 o la Publicación PCT Núm. WO 00/63437. En algunas realizaciones, los pocillos de un sustrato pueden incluir un material de gel como se establece en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 2014/0243224 A1.

Los atributos sobre un soporte sólido pueden ser atributos metálicas sobre una superficie no metálica tal como vidrio, plástico u otros materiales ejemplificados anteriormente. Se puede depositar una capa de metal sobre una superficie usando procedimientos conocidos en la técnica tales como grabado con plasma húmedo, grabado con plasma seco, deposición de capa atómica, grabado con haz de iones, deposición de vapor químico, pulverización al vacío, o similares. Se puede usar cualquiera de una variedad de instrumentos comerciales según corresponda, incluyendo, por ejemplo, los sistemas FlexAL®, OpAL®, Ionfab 300plus® u Optofab 3000® (Oxford Instruments, Reino Unido). Una capa de metal también se puede depositar por evaporación por haz de electrones o pulverización catódica, como se establece en Thornton, *Ann. Rev. Mater. Sci.* 7:239-60 (1977). Las técnicas de depósito de capas de metal, tales como las ejemplificadas anteriormente, se pueden combinar con técnicas de fotolitografía para crear regiones o parches de metal en una superficie. Se proporcionan ejemplos de procedimientos para combinar técnicas de deposición de capas metálicas y técnicas de fotolitografía en la Patente de los EE. UU. Núm. 8.895.249 o la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 2014/0243224 A1.

Los atributos pueden aparecer en un soporte sólido como una cuadrícula de puntos o parches. Los atributos se pueden localizar en un patrón repetitivo o en un patrón irregular, no repetitivo. Los patrones repetitivos particularmente útiles son los patrones hexagonales, los patrones rectilíneos, los patrones de rejilla, los patrones que tienen simetría reflectante, los patrones que tienen simetría rotacional, o similares. Los patrones asimétricos También pueden ser útiles. El campo puede ser el mismo entre diferentes pares de entidades vecinas más cercanas, o el campo puede variar entre diferentes pares de entidades vecinas más cercanas.

Las disposiciones de densidad alta se caracterizan por tener un paso promedio menor a aproximadamente 15 μm . Las disposiciones de densidad media tienen un paso promedio de aproximadamente 15 a 30 μm , mientras que las disposiciones de densidad baja tienen un paso promedio mayor a 30 μm . Una disposición útil en la invención puede tener un paso promedio menor a 100 μm , 50 μm , 10 μm , 5 μm , 1 μm o 0,5 μm . Los valores y rangos promedio de campo establecidos anteriormente o en cualquier otro lugar de la presente presenten ser aplicables a arreglos ordenados o arreglos aleatorios.

En realizaciones particulares, cada una de las características de un soporte sólido puede tener un área mayor que aproximadamente 100 nm^2 , 250 nm^2 , 500 nm^2 , 1 μm^2 , 2,5 μm^2 , 5 μm^2 , 10 μm^2 , 100 μm^2 o 500 μm^2 . Alternativa o adicionalmente, cada una de las características puede tener un área menor que aproximadamente 1 mm^2 , 500 μm^2 ,

100 μm^2 , 25 μm^2 , 10 μm^2 , 5 μm^2 , 1 μm^2 , 500 nm^2 , o 100 nm^2 . Los rangos anteriores pueden describir el área aparente de una perla u otra partícula en un soporte sólido cuando se ve o se captura una imagen desde arriba.

Los ejemplos de arreglos que tienen perlas localizadas en una superficie incluyen aquellas en donde las perlas están localizadas en pozos como un arreglo BeadChip (Illumina Inc., San Diego CA), sustratos usados en plataformas de secuenciación de 454 LifeSciences (una subsidiaria de Roche; Basilea, Suiza) o sustratos usados en plataformas de secuenciación de Ion Torrent (una subsidiaria de Life Technologies; Carlsbad, California). Otros soportes sólidos que tienen cuentas situadas sobre una superficie se describen en la Patente de los EE. UU. Núm. 6.266.459; 6.355.431; 6.770.441; 6.859.570; 6.210.891; 6.258.568; o 6.274.320; la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 2009/0026082 A1; 2009/0127589 A1; 2010/0137143 A1; o 2010/0282617 A1 o la Publicación PCT Núm. WO 00/63437. Varias de las referencias anteriores describen procedimientos para anclar sondas de ácido nucleico a perlas antes de cargar las perlas en o sobre un soporte sólido. Como se establece anteriormente en la presente, los soportes sólidos que se usan típicamente para arreglos de perlas se pueden usar sin perlas. Por ejemplo, los ácidos nucleicos, tales como sondas o cebadores, se pueden anclar directamente a los pozos o al material de gel en los pozos. Por lo tanto, las referencias anteriores son ilustrativas de materiales, composiciones o aparatos que se pueden modificar para su uso en los procedimientos y composiciones establecidos en la presente.

Un soporte sólido puede incluir una pluralidad de sondas de ácido nucleico diferentes, o se puede fabricar por los procedimientos establecidos en la presente para anclarse. Por ejemplo, un soporte sólido puede incluir al menos 10, 100, 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 o más sondas diferentes. Alternativa o adicionalmente, un soporte sólido puede incluir como máximo 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 100 o menos sondas diferentes. Se entenderá que cada una de las diferentes sondas puede estar presente en varias copias, por ejemplo, cuando las sondas han sido amplificadas para formar una agrupación. Por lo tanto, los rangos anteriores pueden describir el número de diferentes agrupaciones de ácidos nucleicos en un soporte sólido. También se entenderá que los rangos anteriores pueden describir el número de diferentes códigos de barras, secuencias de captura del objetivo u otros elementos de secuencia establecidos en la presente como únicos de sondas de ácido nucleico particulares. Alternativa o adicionalmente, los rangos pueden describir el número de sondas extendidas o sondas modificadas creadas en un soporte sólido usando un procedimiento establecido en la presente.

Los atributos pueden estar presentes en un soporte sólido antes de poner en contacto el soporte sólido con las sondas de ácido nucleico. Por ejemplo, en realizaciones en donde las sondas se unen a un soporte mediante hibridación con cebadores, los cebadores se pueden unir a los atributos, mientras que las áreas intersticiales fuera de los atributos carecen sustancialmente de cualquiera de los cebadores. Las sondas de ácido nucleico se pueden capturar en características preformadas sobre un soporte sólido y, opcionalmente, amplificar sobre el soporte sólido, usando procedimientos establecidos en la Patente de los EE. UU. Núm. 8.895.249, en la Patente de los EE. UU. Núm. 8.778.849, o en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 2014/0243224 A1. Alternativamente, un soporte sólido puede tener un jardín de cebadores o puede carecer de atributos. En este caso, se puede formar un atributo en virtud del anclaje de una sonda de ácido nucleico sobre el soporte sólido. Opcionalmente, la sonda de ácido nucleico capturada se puede amplificar en el soporte sólido de modo tal que la agrupación resultante se convierta en un atributo. Aunque el anclaje se ejemplifica anteriormente como captura entre un cebador y una porción complementaria de una sonda, se entenderá que los restos de captura distintos de los cebadores pueden estar presentes en atributos preformados o como un jardín. Otros restos de captura ejemplares incluyen, pero no se limitan a, restos químicos capaces de reaccionar con una sonda de ácido nucleico para crear una unión covalente o receptores capaces de unirse de forma no covalente a un ligando en una sonda de ácido nucleico.

Se puede llevar a cabo un paso de anclaje de sondas de ácido nucleico a un soporte sólido proporcionando un fluido que contiene una mezcla de diferentes sondas de ácido nucleico y poniendo en contacto esta mezcla fluidica con el soporte sólido. El contacto puede resultar en que la mezcla fluidica este en contacto con una superficie a la que se anclan muchas sondas de ácido nucleico diferentes de la mezcla fluidica. Por lo tanto, las sondas tienen acceso aleatorio a la superficie (ya sea que la superficie tenga atributos preformados configurados para anclar las sondas o una superficie uniforme configurada para el anclaje). En consecuencia, las sondas se pueden localizar aleatoriamente en el soporte sólido.

El número total y la variedad de diferentes sondas que terminan ancladas a una superficie se pueden seleccionar para una aplicación o uso en particular. Por ejemplo, en realizaciones en donde una mezcla fluidica de diferentes sondas de ácido nucleico se pone en contacto con un soporte sólido para unir las sondas al soporte, el número de diferentes especies de sondas puede exceder la ocupación del soporte sólido para las sondas. Por lo tanto, el número y la variedad de sondas diferentes que se anclan al soporte sólido pueden ser equivalentes a la ocupación de sondas del soporte sólido. Alternativamente, el número y la variedad de diferentes especies de sonda en el soporte sólido puede ser menor que la ocupación (es decir, habrá redundancia de especies de sonda de modo tal que el soporte sólido puede contener múltiples atributos que tienen la misma especie de sonda). Tal redundancia se puede lograr, por ejemplo, poniendo en contacto el soporte sólido con una mezcla fluidica que contiene un número y variedad de especies de sonda que es sustancialmente menor que la ocupación de la sonda del soporte sólido.

La unión de las sondas de ácido nucleico puede estar mediada por la hibridación de las sondas de ácido nucleico con cebadores complementarios que se unen al soporte sólido, por la formación de uniones químicas entre un resto reactivo en la sonda de ácido nucleico y el soporte sólido (se establecen ejemplos en la Patente de los EE. UU. Núm.

8.895.249, en la Patente de los EE. UU. Núm. 8.778.849, o en la Solicitud de Patente de los EE. UU. Pub. Núm. 2014/0243224 A1), por interacciones de afinidad de un resto en la sonda de ácido nucleico con un resto sólido unido a un soporte (por ejemplo, entre pares conocidos de receptor-ligando tal como estreptavidina-biotina, anticuerpo-epítipo, lectina-carbohidrato y similares), por interacciones físicas de las sondas de ácido nucleico con el soporte sólido (por ejemplo, unión de hidrógeno, fuerzas iónicas, fuerzas de van der Waals, y similares), o por otras interacciones conocidas en la técnica para unir ácidos nucleicos a superficies.

En algunas realizaciones, el anclaje de una sonda de ácido nucleico no es específica con respecto a cualquier diferencia de secuencia entre la sonda de ácido nucleico y otras sondas de ácido nucleico que están o estarán ancladas al soporte sólido. Por ejemplo, diferentes sondas pueden tener una secuencia universal que complementa los cebadores anclados a la superficie o las diferentes sondas pueden tener un resto común que media el anclaje a la superficie. Alternativamente, cada una de las diferentes sondas (o una subpoblación de diferentes sondas) puede tener una secuencia única que complementa un cebador único en el soporte sólido o pueden tener un resto único que interactúa con uno o más restos reactivos diferentes en el soporte sólido. En tales casos, los cebadores únicos o restos únicos se pueden, opcionalmente, anclar en localizaciones predefinidas para capturar selectivamente sondas particulares, o tipos particulares de sondas, en las respectivas localizaciones predefinidas.

Uno o más atributos en un soporte sólido pueden incluir cada uno una sola molécula de una sonda particular. Los atributos se pueden configurar, en algunas realizaciones, para acomodar no más de una sola molécula de sonda de ácido nucleico. Sin embargo, ya sea que el atributo pueda acomodar o no más de una molécula de sonda de ácido nucleico, el atributo puede no obstante incluir no más de una sola molécula de sonda de ácido nucleico. Alternativamente, una característica individual puede incluir una pluralidad de moléculas de sonda de ácido nucleico, por ejemplo, un conjunto de moléculas de sonda de ácido nucleico que tengan la misma secuencia entre sí. En realizaciones particulares, el conjunto puede producirse por amplificación a partir de una única plantilla de sonda de ácido nucleico para producir amplicones, por ejemplo, como un grupo unido a la superficie.

Un procedimiento establecido en la presente puede usar cualquiera de una variedad de técnicas de amplificación. Las técnicas ejemplares que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación de círculo rodante (RCA), amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), o amplificación de cebadores aleatorios (RPA, por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones, la amplificación se puede llevar a cabo en solución, por ejemplo, cuando los atributos de un arreglo son capaces de contener amplicones en un volumen que tiene la capacidad deseada. Preferiblemente, una técnica de amplificación usada en un procedimiento de la presente divulgación se llevará a cabo en fase sólida. Por ejemplo, una o más especies de cebadores (por ejemplo, cebadores universales para uno o más sitios de unión de cebadores universales presentes en una sonda de ácido nucleico) se pueden anclar a un soporte sólido. En las realizaciones de PCR, uno o ambos cebadores usados para la amplificación se pueden unir a un soporte sólido (por ejemplo, mediante un gel). Los formatos que usan dos especies de cebadores anclados a un soporte sólido a menudo se denominan amplificación en puente porque los amplicones de doble hebra forman una estructura similar a un puente entre los dos cebadores unidos a la superficie que flanquean la secuencia molde que se ha copiado. Los ejemplos de reactivos y condiciones que se pueden usar para la amplificación en puente se describen, por ejemplo, en la Patente de los EE. UU. Núm. 5.641.658, 7.115.400, u 8.895.249; o la publicación de patente de EE. UU. Núm. 2002/0055100 A1, 2004/0096853 A1, 2004/0002090 A1, 2007/0128624 A1 o 2008/0009420 A1. La amplificación por PCR en fase sólida También se puede realizar con uno de los cebadores de amplificación anclado a un soporte sólido y el segundo cebador en solución. Un formato ejemplar que usa una combinación de un cebador unido a la superficie y un cebador soluble es el formato usado en la PCR en emulsión como se describe, por ejemplo, en Dressman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977: 66: 1-19". USA 100:88178822 (2003), documento WO 05/010145 o la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 2005/0130173 A1 o 2005/0064460 A1. La PCR en emulsión es ilustrativa del formato y se entenderá que para los fines de los procedimientos establecidos en la presente, el uso de una emulsión es opcional y, de hecho, para varias realizaciones no se usa una emulsión.

Las técnicas de RCA se pueden modificar para su uso en un procedimiento de la presente divulgación. Los componentes de ejemplo que se pueden usar en una reacción de RCA y los principios por los cuales RCA produce amplicones se describen, por ejemplo, en Lizardi et al., *Nat. Genet.* 19:225-232 (1998) y la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 2007/0099208 A1. Los cebadores usados para RCA pueden estar en solución o anclados a un soporte sólido. Los cebadores pueden ser uno o más de los cebadores universales descritos en la presente.

Las técnicas de MDA se pueden modificar para su uso en un procedimiento de la presente divulgación. Algunos principios básicos y condiciones útiles para MDA se describen, por ejemplo, en Dean et al., *Proc Natl. Acad. Sci.* 1977: 66: 1-19". USA 99:5261-66 (2002); Lage et al., *Genome Research* 13:294-307 (2003); Walker et al., *Molecular Methods for Virus Detección*, Academic Press, Inc., 1995; Walker et al., *Nucl. Acids Res.* 20:1691-96 (1992); documento US 5.455.166; US 5.130.238; y US 6.214.587. Los cebadores usados para MDA pueden estar en solución o anclados a un soporte sólido en un sitio de amplificación. Nuevamente, los cebadores pueden ser uno o más de los cebadores universales descritos en la presente.

En realizaciones particulares, se puede usar una combinación de las técnicas de amplificación ejemplificadas anteriormente. Por ejemplo, RCA y MDA se pueden usar en una combinación, en donde RCA se usa para generar un amplicón concatémico en solución (por ejemplo, usando cebadores en fase de solución). Posteriormente, el amplicón se puede usar como un molde para MDA usando cebadores que se anclan a un soporte sólido (por ejemplo, cebadores

universales). En este ejemplo, los amplicóns producidos después de las etapas combinadas de RCA y MDa se unen al soporte sólido.

Las sondas de ácido nucleico que se usan en un procedimiento establecido en la presente o presentes en un aparato o composición de la presente divulgación pueden incluir secuencias de código de barras, y para realizaciones que incluyen una pluralidad de sondas de ácido nucleico diferentes, cada una de las sondas puede incluir una secuencia de código de barras diferente de otras sondas en la pluralidad. Las secuencias de código de barras pueden tener una variedad de longitudes. Las secuencias más largas generalmente pueden acomodar una mayor cantidad y variedad de códigos de barras para una población. Generalmente, todas las sondas en una pluralidad tendrán el mismo código de barras de longitud (aunque con diferentes secuencias), pero También es posible usar códigos de barras de diferente longitud para diferentes sondas. Una secuencia de código de barras puede tener al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 o más nucleótidos de longitud. Alternativa o adicionalmente, la longitud de la secuencia de código de barras puede ser como máximo de 20, 15, 12, 10, 8, 6, 4 o menos nucleótidos. Se establecen ejemplos de secuencias de códigos de barras que se pueden usar, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 2014/0342921 A1 y la Patente de los EE. UU. Núm. 8,460,865.

Un procedimiento de la presente divulgación puede incluir un paso de realizar una reacción de detección de ácido nucleico en un soporte sólido para determinar las secuencias de código de barras de las sondas de ácido nucleico que se localizan en el soporte sólido. En muchas realizaciones, las sondas se localizan aleatoriamente en el soporte sólido y la reacción de detección de ácido nucleico proporciona información para localizar cada una de las diferentes sondas. Los procedimientos de detección ejemplares de ácidos nucleicos incluyen, pero sin limitación, secuenciación de ácidos nucleicos de una sonda, hibridación de ácidos nucleicos con una sonda, ligadura de ácidos nucleicos que se hibridan con una sonda, extensión de ácidos nucleicos que se hibridan con una sonda, extensión de un primer ácido nucleico que se hibrida con una sonda, seguido de la ligadura del ácido nucleico extendido con un segundo ácido nucleico que se hibrida con la sonda, u otros procedimientos conocidos en la técnica, como los establecidos en la Patente de los EE. UU. Núm. 8.288.103 u 8.486.625.

Las técnicas de secuenciación, tales como las técnicas de secuenciación por síntesis (SBS), son un procedimiento particularmente útil para determinar secuencias de códigos de barras. La SBS se puede llevar a cabo de la siguiente manera. Para iniciar un primer ciclo SBS, uno o más nucleótidos etiquetados, ADN polimerasa, cebadores SBS, etc., se pueden poner en contacto con uno o más atributos en un soporte sólido (por ejemplo, atributos en donde las sondas de ácido nucleico se anclan al soporte sólido). Se pueden detectar aquellos atributos en donde la extensión del cebador SBS hace que se incorpore un nucleótido etiquetado. Opcionalmente, los nucleótidos pueden incluir un resto de terminación reversible que termina la extensión adicional del cebador una vez que se ha adicionado un nucleótido al cebador SBS. Por ejemplo, se puede adicionar un análogo de nucleótido que tiene un resto terminador reversible a un cebador de modo que no ocurra una extensión subsecuente hasta que se suministre un agente de desbloqueo para eliminar el resto. Por lo tanto, para realizaciones que usan terminación reversible, se puede suministrar un reactivo de desbloqueo al soporte sólido (antes o después de que ocurra la detección). Los lavados se pueden realizar entre los distintos pasos de suministro. Posteriormente, el ciclo se puede repetir n veces para extender el cebador en n nucleótidos, detectando así una secuencia de longitud n. Los procedimientos de SBS ejemplares, sistemas fluidicos y plataformas de detección que se pueden adaptar fácilmente para su uso con una composición, aparato o procedimiento de la presente divulgación se describen, por ejemplo, en Bentley *et al.*, *Nature* 456: 53-59 (2008), la Publicación de PCT Núm. WO 91/06678, WO 04/018497 o WO 07/123744; la Patente de los EE. UU. Núm. 7.057.026, 7.329.492, 7.211.414, 7.315.019 o 7.405.281, y la Publicación de la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 2008/0108082.

Se pueden usar otros procedimientos de secuenciación que usan reacciones cíclicas, como la pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) a medida que se incorporan nucleótidos particulares en una hebra de ácido nucleico naciente (Ronaghi, *et al.*, *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9 (1996); Ronaghi, *Genome Res.* 11(1), 3-11 (2001); Ronaghi et al. *Science* 281 (5375), 363 (1998); o la Patente de los EE. UU. Núm. 6.210.891, 6.258.568 o 6.274.320). En la pirosecuenciación, el PPi liberado se puede detectar al convertirlo inmediatamente en trifosfato de adenosina (ATP) por la ATP sulfurilasa, y el nivel de ATP generado se puede detectar mediante fotones producidos por luciferasa. Por lo tanto, la reacción de secuenciación se puede controlar mediante un sistema de detección de luminiscencia. Las fuentes de radiación de excitación usadas para los sistemas de detección basados en fluorescencia no son necesarias para los procedimientos de pirosecuenciación. Los sistemas fluidicos, detectores y procedimientos útiles que se pueden usar para la aplicación de pirosecuenciación a aparatos, composiciones o procedimientos de la presente divulgación se describen, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. WO2012/058096, la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 2005/0191698 A1, o la Patente de los EE. UU. Núm. 7.595.883 o 7.244.559.

Las reacciones de secuenciación por ligadura también son útiles, incluyendo, por ejemplo, las descritas en Shendure *et al.* *Science* 309:1728-1732 (2005); o la Patente de los EE. UU. Núm. 5.599.675 o 5.750.341. Algunas realizaciones pueden incluir procedimientos de secuenciación por hibridación como se describe, por ejemplo, en Bains *et al.*, *Journal of Theoretical Biology* 135(3), 303-7 (1988); Drmanac *et al.*, *Nature Biotechnology* 16, 54-58 (1998); Fodor *et al.*, *Science* 251(4995), 767-773 (1995); o la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. WO 1989/10977. Tanto en los procedimientos de secuenciación por ligadura como de secuenciación por hibridación, los ácidos nucleicos objetivo (o sus amplicóns) que están presentes en los sitios de una matriz se someten a ciclos repetidos

de suministro y detección de oligonucleótidos. Las composiciones, aparatos o procedimientos establecidos en la presente o en las referencias citadas en la presente se pueden adaptar fácilmente para procedimientos de secuenciación por ligación o secuenciación por hibridación. Típicamente, los oligonucleótidos están etiquetados con fluorescencia y se pueden detectar usando detectores de fluorescencia similares a los descritos con respecto a los procedimientos de SBS en la presente o en las referencias citadas en la presente.

Algunas realizaciones de secuenciación pueden usar procedimientos que involucran la monitorización en tiempo real de la actividad de la ADN polimerasa. Por ejemplo, las incorporaciones de nucleótidos se pueden detectar a través de interacciones de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre una polimerasa portadora de fluoroforo y nucleótidos etiquetados con fosfato- γ , o con guías de ondas de modo cero (ZMW). Las técnicas y los reactivos para la secuenciación basada en FRET se describen, por ejemplo, en Levene et al. *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist et al. *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Korklach et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977; 66: 1-19". USA 105, 1176-1181 (2008).

Algunas realizaciones de secuenciación incluyen la detección de un protón liberado tras la incorporación de un nucleótido en un producto de extensión. Por ejemplo, la secuenciación basada en la detección de protones liberados puede usar un detector eléctrico y técnicas asociadas que están disponibles comercialmente por Ion Torrent (Guilford, CT, una subsidiaria de Life Technologies y ThermoFisher) o procedimientos y sistemas de secuenciación descritos en la Publicación de la Solicitud de Patente de los EE. UU. Núm. 2009/0026082 A1; 2009/0127589 A1; 2010/0137143 A1; o US 2010/0282617 A1.

Las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos También son procedimientos útiles para determinar secuencias de códigos de barras. En algunos casos, se pueden usar procedimientos de hibridación combinatoria, tal como los que se usan para decodificar matrices de cuentas multiplex (véase, por ejemplo, la Patente de los EE. UU. Núm. 8.460.865). Tales procedimientos usan sondas decodificadoras de ácidos nucleicos etiquetadas que son complementarias a al menos una porción de una secuencia de código de barras. Se puede llevar a cabo una reacción de hibridación usando sondas decodificadoras que tienen etiquetas conocidas de modo tal que la localización en donde terminan las etiquetas en el soporte sólido identifica las sondas de ácido nucleico de acuerdo con las reglas de complementariedad de ácidos nucleicos. En algunos casos, se usan grupos de muchas sondas diferentes con etiquetas distinguibles, permitiendo así una operación de decodificación multiplex. El número de códigos de barras diferentes determinados en una operación de decodificación puede exceder el número de etiquetas usadas para la operación de decodificación. Por ejemplo, la decodificación se puede llevar a cabo en varias etapas en donde cada etapa constituye una hibridación con un grupo diferente de sondas decodificadoras. Las mismas sondas del decodificador pueden estar presentes en diferentes grupos, pero la etiqueta presente en cada sonda del decodificador puede diferir de un grupo a otro (es decir, cada sonda del decodificador está en un "estado" diferente cuando está en diferentes grupos). Se pueden usar varias combinaciones de estos estados y etapas para expandir el número de códigos de barras que se pueden decodificar mucho más allá del número de etiquetas distintas disponibles para la decodificación. Tales procedimientos de combinación se establecen con mayor detalle en la Patente de los EE. UU. Núm. 8.460.865 o Gunderson et al., *Genome Research* 14:870-877 (2004).

Un procedimiento de la presente divulgación puede incluir un paso de poner en contacto un espécimen biológico con un soporte sólido que tiene sondas de ácido nucleico ancladas al mismo. En algunas realizaciones, las sondas de ácido nucleico se localizan aleatoriamente en el soporte sólido. La identidad y localización de las sondas de ácido nucleico se pueden haber decodificado antes de poner en contacto el espécimen biológico con el soporte sólido. Alternativamente, la identidad y localización de las sondas de ácido nucleico se pueden determinar después de poner en contacto el soporte sólido con el espécimen biológico.

En algunas realizaciones, el espécimen biológico es una o más células. Las células pueden ser individuales y libres de cualquier tejido o estructura multicelular en el momento en que se realiza el contacto con el soporte sólido. Por ejemplo, las células pueden estar presentes en un fluido (por ejemplo, cuando hay una pluralidad de células diferentes, el fluido puede ser una mezcla fluida de las diferentes células) y el fluido se puede poner en contacto con el soporte sólido al cual se anclan las diferentes sondas. Se puede usar cualquiera de una variedad de células incluyendo, por ejemplo, las de un procarionta, una arquea o un eucariota. Una o más células usadas en un procedimiento, composición o aparato de la presente divulgación pueden ser organismos unicelulares o de un organismo multicelular. Los organismos ejemplares a partir de los cuales se pueden obtener una o más células incluyen, pero sin limitación, mamíferos, plantas, algas, nematodos, insectos, peces, reptiles, anfibios, hongos o *Plasmodium falciparum*. Las especies ejemplares se establecen anteriormente en la presente o son conocidas en la técnica.

Las realizaciones de la presente divulgación También pueden usar uno o más componentes subcelulares como espécimen biológico. Por ejemplo, una mezcla fluida puede incluir uno o más núcleos, aparatos de Golgi, mitocondrias, cloroplastos, fracciones de membrana, vesículas, retículos endoplásmicos, u otros componentes conocidos en la técnica. Otros tipos útiles de especímenes biológicos son uno o más virus o viroides.

Se entenderá que un espécimen biológico puede ser un cultivo o población homogénea de las células, componentes subcelulares, virus o viroides anteriores. Alternativamente, el espécimen biológico puede ser una colección no homogénea de células, componentes subcelulares, virus o viroides, por ejemplo, derivados de varios organismos diferentes en una comunidad o ecosistema. Una comunidad ejemplar es la colección de bacterias presentes en el

sistema digestivo, pulmones u otro órgano de un organismo multicelular tal como un mamífero.

Una o más células, componentes subcelulares, virus o viroides que se ponen en contacto con un soporte sólido en un procedimiento establecido en la presente se pueden anclar al soporte sólido. En anclaje se puede lograr usando procedimientos conocidos en la técnica, tal como los que se ejemplifican en la presente con respecto al anclaje de ácidos nucleicos a un soporte sólido. En algunas realizaciones, la unión es selectiva para tipos específicos de células, componentes subcelulares, virus o viroides. Por ejemplo, el soporte sólido puede incluir anticuerpos u otros receptores que sean selectivos para epítomos o ligandos presentes en una o un subconjunto de diferentes células, componentes subcelulares, virus o viroides presentes en una mezcla fluidica. En otras realizaciones, el anclaje de células, componentes subcelulares, virus o viroides puede estar mediado por fracciones no selectivas tales como fracciones químicas que son ampliamente reactivas.

En realizaciones particulares, se pueden lisar una o más células, componentes subcelulares, virus o viroides que se han puesto en contacto con un soporte sólido para liberar ácidos nucleicos objetivo. La lisis se puede llevar a cabo usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como los que emplean uno o más de tratamiento químico, tratamiento enzimático, electroporación, calor, tratamiento hipotónico, sonicación, o similares. Las técnicas de lisis ejemplares se establecen en Sambrook et al., *Molécular Cloning: A Laboratory Manual, Third Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001) y en Ansubel et al., *Current Protocols in Molécular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1999).

En algunas realizaciones, el espécimen biológico es una sección de tejido. El tejido se puede derivar de un organismo multicelular tal como los ejemplificados anteriormente con respecto a las células. Una sección de tejido se puede poner en contacto con un soporte sólido, por ejemplo, colocando el tejido sobre la superficie del soporte sólido. El tejido se puede extirpar recientemente de un organismo o se puede haber conservado previamente, por ejemplo, por congelación, incrustar en un material como parafina (por ejemplo, muestras incrustadas en parafina fijadas con formalina), fijación con formalina, infiltración, deshidratación, o similares. Opcionalmente, una sección de tejido se puede anclar a un soporte sólido, por ejemplo, usando técnicas y composiciones ejemplificadas en la presente con respecto al anclaje de ácidos nucleicos, células, virus, perlas o similares a un soporte sólido. Como opción adicional, se puede permeabilizar un tejido y lisar las células del tejido cuando el tejido está en contacto con un soporte sólido. Se puede usar cualquiera de una variedad de tratamientos tales como los establecidos anteriormente con respecto a la lisis de células. Los ácidos nucleicos objetivo que se liberan de un tejido que esta permeabilizado se pueden capturar por sondas de ácido nucleico en la superficie.

Se puede preparar un tejido de cualquier forma conveniente o deseada para su uso en un procedimiento, composición o aparato de la presente. Se pueden usar tejidos frescos, congelados, fijados o no fijados. Un tejido se puede fijar o incrustar usando procedimientos descritos en la presente o conocidos en la técnica.

Una muestra de tejido para su uso en la presente memoria se puede fijar por congelación profunda a una temperatura adecuada para mantener o preservar la integridad de la estructura del tejido, por ejemplo, menos de -20 °C. En otro ejemplo, se puede preparar un tejido usando procedimientos de fijación con formalina e incrustación en parafina (FFPE) que son conocidos en la técnica. Si se desea, se pueden usar otros fijadores y/o materiales para incrustar. Una muestra de tejido fijada o incrustada se puede seccionar, es decir, cortar en tiras finas, usando procedimientos conocidos. Por ejemplo, una muestra de tejido se puede seccionar usando un microtomo o criostato enfriado, ajustado 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.

En algunas realizaciones, se tratará una muestra de tejido para eliminar el material para incrustar (por ejemplo, para eliminar la parafina o la formalina) de la muestra antes de la liberación, captura o modificación de los ácidos nucleicos. Esto se puede lograr poniendo en contacto la muestra con un disolvente apropiado (por ejemplo, lavados con xileno y etanol). El tratamiento puede ocurrir antes de poner en contacto la muestra de tejido con un soporte sólido establecido en la presente o el tratamiento puede ocurrir mientras la muestra de tejido esta sobre el soporte sólido. Los procedimientos ejemplares para manipular tejidos para su uso con soportes sólidos a los que se unen los ácidos nucleicos se establecen en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 2014/0066318 A1.

El espesor de una muestra de tejido u otro espécimen biológico que se pone en contacto con un soporte sólido en un procedimiento, composición o aparato establecido en la presente puede ser cualquier espesor adecuado que se desee. En realizaciones representativas, el espesor será de al menos 0,1 µm, 0,25 µm, 0,5 µm, 0,75 µm, 1 µm, 5 µm, 10 µm, 50 µm, 100 µm o mayor. Alternativa o adicionalmente, el espesor de un espécimen biológico que se pone en contacto con un soporte sólido no será mayor a 100 µm, 50 µm, 10 µm, 5 µm, 1 µm, 0,5 µm, 0,25 µm, 0,1 µm o menor.

Una fuente particularmente relevante para un espécimen biológico es un humano. El espécimen puede derivar de un órgano que incluye, por ejemplo, un órgano del sistema musculo-esquelético tal como musculo, hueso, tendón o ligamento; un órgano del sistema digestivo tal como glándula salival, faringe, esófago, estomago, intestino delgado, intestino grueso, hígado, vesícula biliar o páncreas; un órgano del sistema respiratorio tal como laringe, tráquea, bronquios, pulmones o diafragma; un órgano del sistema urinario tal como riñón, uréter, vejiga o uretra; un órgano reproductor tal como ovario, trompa de Falopio, útero, vagina, placenta, testículo, epidídimo, conducto deferente, vesícula seminal, próstata, pene o escroto; un órgano del sistema endocrino tal como glándula pituitaria, glándula

5 pineal, glándula tiroides, glándula paratiroides o glándula suprarrenal; un órgano del sistema circulatorio tal como corazón, arteria, vena o capilar; un órgano del sistema linfático tal como vaso linfático, ganglio linfático, medula ósea, timo o bazo; un órgano del sistema nervioso central tal como cerebro, tronco encefálico, cerebelo, medula espinal, nervio craneal o nervio espinal; un órgano sensorial como el ojo, el oído, la nariz o la lengua; o un órgano del tegumento tal como piel, tejido subcutáneo o glándula mamaria. En algunas realizaciones, se obtiene un espécimen biológico a partir de un fluido corporal o excrementos tales como sangre, linfa, lagrimas, sudor, saliva, semen, secreción vaginal, cerumen, materia fecal u orina.

10 Una muestra de un humano se puede considerar (o sospechar) sana o enferma cuando se usa. En algunos casos, se pueden usar dos muestras: la primera se considera enferma y la segunda se considera sana (por ejemplo, para usar como control sano). Cualquiera de una variedad de condiciones puede ser evaluada, que incluye, pero no se limita a, una enfermedad autoinmune, cáncer, fibrosis quística, aneuploidía, infección patógena, condición psicológica, hepatitis, diabetes, enfermedad de transmisión sexual, enfermedad cardíaca, accidente cerebrovascular, enfermedad cardiovascular, esclerosis múltiple o distrofia muscular. Las condiciones particularmente relevantes son condiciones genéticas o condiciones asociadas con patógenos que tienen firmas genéticas identificables.

15 Como se establece anteriormente, una celda de flujo proporciona un aparato conveniente para usar en un procedimiento establecido en la presente. Por ejemplo, una celda de flujo es un aparato conveniente para albergar un soporte sólido que se trata con múltiples reactivos fluidicos, tales como los suministros fluidicos repetidos usados para algunos protocolos de secuenciación de ácidos nucleicos o para algunos protocolos de hibridación de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, un espécimen biológico se puede suministrar a un soporte sólido en una celda de flujo, por ejemplo, cuando una mezcla fluida de células, componentes subcelulares, virus o viroides se suministra al soporte sólido. En algunas realizaciones, puede ser preferible abrir una celda de flujo para exponer un soporte sólido en el interior o eliminar el soporte sólido de la celda de flujo para permitir el suministro conveniente de un espécimen biológico al soporte sólido. Por ejemplo, abrir la celda de flujo o eliminar el soporte sólido puede permitir que un usuario o un dispositivo robótico coloque una sección de tejido sobre el soporte sólido. La apertura de una celda de flujo o la eliminación de un soporte sólido de una celda de flujo puede ser temporal. Por lo tanto, la celda de flujo se puede cerrar posteriormente o el soporte sólido se puede devolver a la celda de flujo para continuar con uno o más pasos subsecuentes de un procedimiento establecido en la presente.

20 En algunas realizaciones, una celda de flujo puede tener una construcción que permita abrirla o desarmarla. Por ejemplo, la celda de flujo puede estar en un estado cerrado mientras realiza una reacción de secuenciación, por ejemplo, para decodificar códigos de barras. Posteriormente, la celda de flujo se puede desarmar para que el tejido se pueda colocar en la superficie de la celda de flujo. La celda de flujo se puede mantener unida con un adhesivo de modo tal que se puedan eliminar una o más superficies para abrirla. Por ejemplo, una celda de flujo puede tener un espaciador con superficies adhesivas en la parte superior o inferior (similar a una cinta adhesiva de una o dos caras) y este espaciador puede estar entre dos soportes sólidos. Uno o ambos soportes sólidos se pueden configurar para anclar ácidos nucleicos y soportar un espécimen biológico como se establece en la presente. El espaciador puede tener regiones abiertas (por ejemplo, creadas por un corte por láser del material del espaciador) que crean canales fluidicos unidos por los dos soportes sólidos y el espaciador. Por lo tanto, uno o ambos soportes sólidos se pueden adherir no permanentemente al espaciador para permitir que uno o ambos se eliminen para permitir el acceso a la superficie cuando se coloca un tejido u otro espécimen sobre el mismo.

30 Una sonda de ácido nucleico usada en una composición, aparato o procedimiento establecido en la presente puede incluir un resto de captura de objetivo. En realizaciones particulares, el resto de captura de objetivo es una secuencia de captura de objetivo. La secuencia de captura de objetivo es generalmente complementaria a una secuencia objetivo de modo tal que la captura de objetivo se produce por la formación de un complejo híbrido de sonda-objetivo. Una secuencia de captura del objetivo puede tener cualquiera de una variedad de longitudes que incluyen, por ejemplo, las longitudes ejemplificadas anteriormente en el contexto de las secuencias de código de barras.

35 En realizaciones multiplex, una pluralidad de diferentes sondas de ácido nucleico pueden incluir diferentes secuencias de captura de objetivo que hibridan con diferentes secuencias de ácido nucleico objetivo de un espécimen biológico. Se pueden usar diferentes secuencias de captura del objetivo para unirse selectivamente a uno o más ácidos nucleicos objetivo deseados de un espécimen biológico. En algunos casos, las diferentes sondas de ácido nucleico pueden incluir una secuencia de captura del objetivo que es común a todas o a un subconjunto de las sondas sobre un soporte sólido. Por ejemplo, las sondas de ácido nucleico sobre un soporte sólido pueden tener una secuencia poli A o poli T. Dichas sondas o amplicónes de las mismas pueden hibridar con moléculas de ARNm, moléculas de ADNc o amplicónes de las mismas que tengan colas poli A o poli T. Aunque las especies de ARNm o ADNc tendrán diferentes secuencias diana, la captura estará mediada por las regiones de secuencias poli A o poli T comunes.

50 Cualquiera de una variedad de ácidos nucleicos objetivo se puede capturar y analizar en un procedimiento establecido en la presente que incluye, pero no se limita a, ARN mensajero (ARNm), copia de ADN (ADNc), ADN genómico (ADNg), ARN ribosómico (ARNr), o ARN de transferencia (ARNt). Se pueden seleccionar secuencias objetivo particulares de bases de datos y diseñar secuencias de captura apropiadas usando técnicas y bases de datos conocidas en la técnica.

60 Otras fracciones de captura de objetivo que son útiles incluyen, por ejemplo, las fracciones establecidas en la presente

como útiles para anclar sondas de ácido nucleico a un soporte sólido.

Un procedimiento establecido en la presente puede incluir un paso de hibridación de sondas de ácido nucleico, que están sobre un soporte sólido, para dirigirse a ácidos nucleicos que provienen de porciones del espécimen biológico que están próximas a las sondas. Generalmente, un ácido nucleico objetivo se difundirá desde una región del espécimen biológico a un área del soporte sólido que está cerca de esa región del espécimen. Aquí, el ácido nucleico objetivo interactuara con las sondas de ácido nucleico que están próximas a la región de la muestra de la que se liberó el ácido nucleico objetivo. Se puede formar un complejo híbrido de objetivo-sonda cuando el ácido nucleico objetivo encuentra una secuencia de captura del objetivo complementaria en una sonda de ácido nucleico. La localización del complejo híbrido de objetivo-sonda generalmente se correlacionará con la región del espécimen biológico de donde se derivó el ácido nucleico objetivo. En realizaciones multiplex, el soporte sólido incluirá una pluralidad de sondas de ácido nucleico, el espécimen biológico liberara una pluralidad de ácidos nucleicos objetivo y se formaran una pluralidad de híbridos de objetivo-sonda sobre el soporte sólido. Las secuencias de los ácidos nucleicos objetivo y sus localizaciones en el soporte proporcionaran información espacial sobre el contenido de ácidos nucleicos del espécimen biológico. Aunque el ejemplo anterior se describe en el contexto de los ácidos nucleicos objetivo que se liberan de un espécimen biológico, se entenderá que no es necesario liberar los ácidos nucleicos objetivo. Mas bien, los ácidos nucleicos objetivo pueden permanecer en contacto con el espécimen biológico, por ejemplo, cuando se anclan a una superficie establecida del espécimen biológico de modo tal que los ácidos nucleicos objetivo También se puedan unir a las sondas de ácido nucleico apropiadas en el soporte sólido.

Un procedimiento de la presente divulgación puede incluir un paso de extensión de sondas unidas a un soporte sólido a las que se hibridan los ácidos nucleicos objetivo. En realizaciones en las cuales las sondas incluyen secuencias de códigos de barras, las sondas extendidas resultantes incluirán las secuencias de códigos de barras y las secuencias de los ácidos nucleicos diana (aunque en forma complementaria). Las sondas extendidas son, por lo tanto, versiones etiquetadas espacialmente de los ácidos nucleicos objetivo del espécimen biológico. Las secuencias de las sondas extendidas identifican que ácidos nucleicos hay en el espécimen biológico y en que parte del espécimen biológico se encuentran los ácidos nucleicos objetivo. Se entenderá que otros elementos de secuencia que están presentes en las sondas de ácido nucleico También se pueden incluir en las sondas extendidas. Tales elementos incluyen, por ejemplo, sitios de unión a cebadores, sitios de escisión, otras secuencias de etiquetas (por ejemplo, etiquetas de identificación de muestras), secuencias de captura, sitios de reconocimiento para proteínas de unión a ácidos nucleicos o a enzimas de ácidos nucleicos, o similares.

La extensión de las sondas se puede llevar a cabo usando procedimientos ejemplificados en la presente o conocidos en la técnica para la amplificación de ácidos nucleicos o la secuenciación de ácidos nucleicos. En realizaciones particulares, se pueden añadir uno o más nucleótidos al extremo 3' de un ácido nucleico, por ejemplo, mediante catálisis de polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa reversa). Se pueden usar procedimientos químicos o enzimáticos para añadir uno o más nucleótidos al extremo 3' o 5' de un ácido nucleico. Se pueden añadir uno o más oligonucleótidos al extremo 3' o 5' de un ácido nucleico, por ejemplo, mediante procedimientos químicos o enzimáticos (por ejemplo, catálisis de ligasa). Un ácido nucleico se puede extender de una manera dirigida por un molde, por lo que el producto de extensión es complementario a un ácido nucleico molde que se hibrida con el ácido nucleico que se extiende. En algunas realizaciones, una transcriptasa reversa extiende un cebador de ADN usando un molde de ARN, produciendo así un ADNc. Por lo tanto, una sonda extendida hecha en un procedimiento establecido en la presente puede ser una molécula de ADN transcrita reversamente. Los procedimientos ejemplares para extender ácidos nucleicos se establecen en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. US 2005/0037393 A1 o la Patente de los EE. UU. Núm. 8.288.103 u 8.486.625.

Todo o una parte de un ácido nucleico objetivo que se hibrida con una sonda de ácido nucleico se puede copiar por extensión. Por ejemplo, una sonda extendida puede incluir al menos 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 o más nucleótidos que se copian de un ácido nucleico objetivo. La longitud del producto de extensión se puede controlar, por ejemplo, usando nucleótidos terminados reversiblemente en la reacción de extensión, y ejecutando un número limitado de ciclos de extensión. Los ciclos se pueden ejecutar como se ejemplifica para las técnicas de SBS y no es necesario el uso de nucleótidos etiquetados. En consecuencia, una sonda extendida producida en un procedimiento establecido en la presente puede incluir no más de 1000, 500, 200, 100, 50, 25, 10, 5, 2 o 1 nucleótidos que se copian de un ácido nucleico objetivo. Por supuesto, las sondas extendidas pueden tener cualquier longitud dentro o fuera de los rangos establecidos anteriormente.

Aunque los procedimientos de la presente divulgación se ejemplifican por una realización en donde las sondas que se hibridan con ácidos nucleicos objetivo se extienden para copiar al menos una parte del ácido nucleico objetivo, se entenderá que las sondas se pueden modificar de maneras alternativas. Las sondas que se hibridan con ácidos nucleicos objetivo se pueden someter a una reacción que crea una modificación específica de objetivo de la sonda. Solamente se producirá una modificación específica del objetivo cuando la sonda interactúe con un ácido nucleico objetivo, por ejemplo, mediante la hibridación basada en la complementariedad. En muchas realizaciones, la modificación específica del objetivo será específica de la secuencia del ácido nucleico objetivo particular que interactúa con la sonda.

Los ejemplos de modificaciones específicas objetivos útiles incluyen, pero sin limitación, la inserción o la adición de una secuencia por ligadura o transposición (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de EE. UU.

Núm. 2010/0120098 A1), modificaciones químicas tal como la reticulación del psoraleno o la adición de un resto de etiqueta detectable, modificaciones por enzimas de ácido nucleico, ligadura de un enlazador en horquilla, u otras modificaciones establecidas en los ensayos de ácido nucleico de la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. US 2005/0037393 A1 o la Patente de los EE. UU. Núm. 8.288.103 u 8.486.625.

5 Se entenderá que las sondas usadas en un procedimiento, composición o aparato establecido en la presente no necesitan ser ácidos nucleicos. Se pueden usar otras moléculas tales como proteínas, carbohidratos, moléculas pequeñas, partículas, o similares. Las sondas pueden ser una combinación de un componente de ácido nucleico (por ejemplo, que tiene un código de barras, un sitio de unión al cebador, un sitio de escisión y/u otro elemento de secuencia establecido en la presente) y otro resto (por ejemplo, un resto que captura o modifica un ácido nucleico objetivo).

10 Un procedimiento establecido en la presente puede incluir Además un paso de adquisición de una imagen de un espécimen biológico que está en contacto con un soporte sólido. El soporte sólido puede estar en cualquiera de una variedad de estados establecidos en la presente. Por ejemplo, el soporte sólido puede incluir sondas de ácido nucleico ancladas o agrupaciones derivadas de sondas de ácido nucleico ancladas. Alternativamente, el soporte sólido puede no incluir sondas de ácido nucleico, sino que se encuentra en un estado que precede al anclaje de las sondas de ácido nucleico o en un estado que sigue a la eliminación de las sondas de ácido nucleico del soporte sólido. En consecuencia, se puede obtener una imagen en cualquiera de una variedad de puntos en un procedimiento establecido en la presente.

20 Se puede obtener una imagen usando dispositivos de detección conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen microscopios configurados para imágenes de luz, campo brillante, campo oscuro, contraste de fase, fluorescencia, reflexión, interferencia o confocal. Un espécimen biológico se puede teñir antes de la obtención de imágenes para proporcionar un contraste entre diferentes regiones o células. En algunas realizaciones, se puede usar más de una tinción para generar imágenes de diferentes aspectos de la muestra (por ejemplo, diferentes regiones de un tejido, diferentes células, componentes subcelulares específicos, o similares). En otras realizaciones, se pueden obtener imágenes de un espécimen biológico sin la tinción.

25 En realizaciones particulares, se puede usar un microscopio de fluorescencia (por ejemplo, un microscopio fluorescente confocal) para detectar un espécimen biológico que es fluorescente, por ejemplo, en virtud de una etiqueta fluorescente. Los especímenes fluorescentes también pueden generar imágenes usando un dispositivo de secuenciación de ácido nucleico que tiene la óptica para detección fluorescente tal como un dispositivo de plataforma Genome Analyzer®, MiSeq®, NextSeq® o HiSeq® comercializados por Illumina, Inc. (San Diego, CA); o una
30 plataforma de secuenciación SOLiD™ comercializada por Life Technologies (Carlsbad, CA).

Otras ópticas de formación de imágenes que se pueden usar incluyen aquellas que se encuentran en los dispositivos de detección descritos en Bentley et al., *Nature* 456:53-59 (2008), la Publicación PCT Núm. WO 91/06678, WO 04/018497 o WO 07/123744; la Patente de los EE. UU. Núm. 7.057.026, 7.329.492, 7.211.414, 7.315.019 o 7.405.281, y la Publicación de la Solicitud de Patente de los EE. UU. Núm. 2008/0108082.

35 Se puede obtener una imagen de un espécimen biológico con la resolución deseada, por ejemplo, para distinguir tejidos, células o componentes subcelulares. En consecuencia, la resolución puede ser suficiente para distinguir los componentes de un espécimen biológico que están separados por al menos 0,5 µm, 1 µm, 5 µm, 10 µm, 50 µm, 100 µm, 500 µm, 1 µm o más. Alternativa o adicionalmente, la resolución se puede configurar para distinguir los
40 componentes de un espécimen biológico que están separados por al menos 1 µm, 500 µm, 100 µm, 50 µm, 10 µm, 5 µm, 1 µm, 0,5 µm o menos.

45 Un procedimiento establecido en la presente puede incluir un paso de correlación de localizaciones en una imagen de un espécimen biológico con secuencias de código de barras de sondas de ácido nucleico que se anclan a una superficie a la que se pone en contacto, se puso o se pondrá en contacto el espécimen biológico. En consecuencia, las características del espécimen biológico que son identificables en la imagen se pueden correlacionar con los ácidos nucleicos que se encuentran presentes en su proximidad. Cualquiera de una variedad de características morfológicas se puede usar en tal correlación que incluye, por ejemplo, la forma celular, el tamaño celular, la forma del tejido, los patrones de tinción, la presencia de proteínas particulares (por ejemplo, detectadas por tinciones inmunohistoquímicas) u otras características que se evalúan de forma rutinaria en patología o aplicaciones de investigación. En consecuencia, el estado biológico de un tejido o sus componentes determinado por observación
50 visual se puede correlacionar con las características biológicas moleculares determinadas por análisis de ácido nucleico resuelto espacialmente.

55 Un soporte sólido sobre el que se obtienen imágenes de un espécimen biológico puede incluir marcadores fiduciales para facilitar la determinación de la orientación del espécimen o la imagen del mismo en relación con las sondas que están ancladas al soporte sólido. Los fiduciales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, perlas (con o sin restos fluorescentes o restos tales como ácidos nucleicos a los que se pueden unir sondas etiquetadas), moléculas fluorescentes ancladas a atributos conocidos o determinantes, o estructuras que combinan formas morfológicas con restos fluorescentes. Los fiduciales ejemplares se establecen en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. 2002/0150909 A1 o la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. Núm. 14/530299. Preferiblemente, uno o más fiduciales son visibles mientras se obtiene una imagen de un espécimen biológico. Preferiblemente, el soporte sólido

incluye al menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100 o más marcadores fiduciales. Los fiduciales se pueden proporcionar en un patrón, por ejemplo, a lo largo de un borde exterior de un soporte sólido o perímetro de una localización en donde reside un espécimen biológico. En una realización preferida, se detectan uno o más fiduciales usando las mismas condiciones de obtención de imágenes que se usan para visualizar un espécimen biológico. Sin embargo, si se desea, se pueden obtener imágenes separadas (por ejemplo, una imagen del espécimen biológico y otra imagen de los fiduciales) y las imágenes se pueden alinear entre sí

Opcionalmente, se puede eliminar un espécimen biológico de un soporte sólido después de que se haya obtenido una imagen y después de que las sondas de ácido nucleico hayan capturado los ácidos nucleicos objetivo en el soporte sólido. Por lo tanto, un procedimiento de la presente divulgación puede incluir una etapa de lavado de un soporte sólido para eliminar células, tejido u otros materiales de un espécimen biológico. La eliminación del espécimen se puede usando cualquier técnica adecuada y dependerá de la muestra de tejido. En algunos casos, el soporte sólido se puede lavar con agua. El agua puede contener varios aditivos, tales como tensioactivos (por ejemplo, detergentes), enzimas (por ejemplo, proteasas y colagenasas), reactivos de escisión o similares, para facilitar la eliminación del espécimen. En algunas realizaciones, el soporte sólido se trata con una solución que comprende una enzima proteínasa. Alternativa o adicionalmente, la solución puede incluir las enzimas celulasa, hemicelulasa o quitinasa (por ejemplo, si se desea extraer una muestra de tejido de una fuente vegetal o fúngica). En algunos casos, la temperatura de una solución de lavado será de al menos 30 °C, 35 °C, 50 °C, 60 °C o 90 °C. Las condiciones se pueden seleccionar para la eliminación de un espécimen biológico sin desnaturalizar los complejos híbridos formados entre los ácidos nucleicos objetivo y las sondas de ácido nucleico ancladas a un soporte sólido.

Un procedimiento de la presente divulgación puede incluir Además un paso de eliminar una o más sondas extendidas de un soporte sólido. En realizaciones particulares, las sondas habrán incluido un sitio de escisión de modo tal que el producto de extender las sondas También incluirá el sitio de escisión. Alternativamente, se puede introducir un sitio de escisión en una sonda durante un paso de modificación. Por ejemplo, se puede introducir un sitio de escisión en una sonda extendida durante el paso de extensión.

Los sitios de escisión a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, restos que son susceptibles a un proceso químico, enzimático o físico que resulta en la ruptura de una unión. Por ejemplo, la localización puede ser una secuencia de nucleótidos que sea reconocida por una endonucleasa. Las endonucleasas adecuadas y sus secuencias de reconocimiento son bien conocidas en la técnica y en muchos casos incluso están disponibles comercialmente (por ejemplo, de New England Biolabs, Beverly, MA; ThermoFisher, Waltham, MA; o Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Una endonucleasa particularmente útil romperá una unión en una hebra del ácido nucleico en un sitio que es 3'-remoto respecto a su sitio de unión en el ácido nucleico, cuyos ejemplos incluyen endonucleasas de restricción Tipo II o Tipo II. En algunas realizaciones, una endonucleasa cortara solamente una hebra en un ácido nucleico dúplex (por ejemplo, una enzima de corte). Los ejemplos de endonucleasas que cortan solamente una hebra incluyen Nt.BstNBI y Nt.AlwI (por sus siglas en inglés, respectivamente).

En algunas realizaciones, un sitio de escisión es un sitio abásico o un nucleótido que tiene una base que es susceptible de eliminarse para crear un sitio abásico. Los ejemplos de nucleótidos que son susceptibles de ser eliminados para formar un sitio abásico incluyen uracilo y 8-oxo-guanina. Los sitios abásicos se pueden crear por hidrólisis de residuos de nucleótidos usando reactivos químicos o enzimáticos. Una vez formados, los sitios abásicos se pueden escindir (por ejemplo, por el tratamiento con una endonucleasa u otra enzima de escisión de una sola hebra, exposición al calor o a un medio alcalino), lo que proporciona un medio para la escisión específica del sitio de un ácido nucleico. Se puede crear un sitio abásico en un nucleótido de uracilo en una hebra de un ácido nucleico. La enzima uracilo ADN glicosilasa (Udg, por sus siglas en inglés) se puede usar para eliminar la base de uracilo, generando un sitio abásico en la hebra. La hebra de ácido nucleico que tiene el sitio abásico se puede entonces escindir en el sitio abásico por el tratamiento con una endonucleasa (por ejemplo, endonucleasa EndoIV, liasa AP, glicosilasa Fpg/liasa AP, glicosilasa EndoVIII/liasa AP, por sus siglas en inglés, respectivamente), calor o un medio alcalino. En una realización particular, el reactivo USER™ disponible de New England Biolabs se usa para la creación de un hueco de un solo nucleótido en una base de uracilo en un ácido nucleico.

Los sitios abásicos También se pueden generar en desoxirribonucleótidos no naturales/modificados distintos del uracilo, y escindir de manera análoga por el tratamiento con una endonucleasa, calor o un medio alcalino. Por ejemplo, la 8-oxo-guanina se puede convertir en un sitio abásico por exposición a la glicosilasa Fpg. La desoxiinosina se puede convertir en un sitio abásico por exposición a la glicosilasa AlkA (por sus siglas en inglés). Los sitios abásicos así generados se pueden escindir posteriormente, típicamente por el tratamiento con una endonucleasa adecuada (por ejemplo, EndoIV o liasa AP).

Otros ejemplos de sitios de escisión y procedimientos que se pueden usar para escindir ácidos nucleicos se establecen, por ejemplo, en la Patente de los EE. UU. Núm. 7,960,120.

Las sondas de ácido nucleico modificadas (por ejemplo, sondas de ácido nucleico extendidas) que se liberan de un soporte sólido se pueden agrupar para formar una mezcla fluidica. La mezcla puede incluir, por ejemplo, al menos 10, 100, 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 o más sondas modificadas diferentes. Alternativa o adicionalmente, una mezcla fluidica puede incluir como máximo 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 100, 10 o menos sondas modificadas diferentes. La mezcla fluidica se puede manipular para permitir la detección

de las sondas de ácido nucleico modificadas. Por ejemplo, las sondas de ácido nucleico modificadas se pueden separar espacialmente en un segundo soporte sólido (es decir, diferente del soporte sólido del que se liberaron las sondas de ácido nucleico después de haber sido puestas en contacto con un espécimen biológico y modificadas), o las sondas se pueden separar temporalmente en una corriente de flujo.

5 Las sondas de ácido nucleico modificadas (por ejemplo, sondas de ácido nucleico extendidas) se pueden separar sobre un soporte sólido en un procedimiento de captura o detección comúnmente empleado para técnicas basadas en microarreglos o técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos como las establecidas anteriormente en la presente. Por ejemplo, las sondas modificadas se pueden anclar a un microarreglo por la hibridación con ácidos nucleicos complementarios. Las sondas modificadas se pueden anclar a perlas o a la superficie de una celda de flujo y, opcionalmente, amplificar como se lleva a cabo en muchas plataformas de secuenciación de ácidos nucleicos. Las sondas modificadas se pueden separar en una corriente de flujo usando un dispositivo de microfluidos, un dispositivo de manipulación de gotas o un citómetro de flujo. Normalmente, la detección se lleva a cabo en estos dispositivos de separación, pero la detección no es necesaria en todas las realizaciones.

15 Un dispositivo de manipulación de gotas particularmente útil es un accionador de gotas como se describe, por ejemplo, en la Patente de los EE. UU. Núm. 8.637.242, la Patente de los EE. UU. Núm. 6,911,132, titulada "Apparatus for Manipulating Droplets by Electrowetting-Based Techniques", concedida el 28 de junio de 2005; Pamula et al., la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 20060194331, titulada "Apparatus and Methods for Manipulating Droplets on a Printed Circuit Board", publicada el 31 de agosto de 2006; Pollack et al., y la Publicación de Patente Internacional Núm. WO/2007/120241, titulada "Droplet-Based Biochemistry", publicada el 25 de octubre de 2007; Shenderov, la Patente de los EE. UU. Núm. 6.773.566, titulada "Electrostatic Actuators for Microfluidics and Methods for Using Same", emitida el 10 de agosto de 2004; Shenderov, la Patente de los EE. UU. 6.565.727, titulada "Actuators for Microfluidics Without Moving Parts," emitida el 20 de mayo de 20, 2003; Kim et al., la Publicación de Patente los EE. UU. Núm. 20030205632, titulada "Electrowetting-driven Micropumping", publicada el 6 de noviembre de 2003; Kim et al., la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 20060164490, titulada "Method and Apparatus for Promoting the Complete Transfer of Liquid Drops from a Nozzle", publicada el 27 de julio de 2006; Kim et al., la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 20070023292, titulada "Small Object Moving on Printed Circuit Board", publicada el 1 de febrero de 2007; Shah et al., la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 20090283407, titulada "Method for Using Magnetic Particles in Droplet Microfluidics", publicada el 19 de noviembre de 2009; Kim et al., la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 20100096266, titulada "Method and Apparatus for Realtime Feedback Control of Electrical Manipulation of Droplets on Chip", publicada el 22 de abril de 2010; Velez, la Patente de los EE. UU. Núm. 7.547.380, titulada "Droplet Transportation Devices and Methods Having a Fluid Surface", publicada el 16 de junio de 2009; Sterling et al, la Patente de los EE. UU. Núm. 7.163.612, titulada "Method, Apparatus and Article for Microfluidic Control via Electrowetting, for Chemical, Biochemical and Biological Assays and the Like", emitida el 16 de enero de 2007; Becker et al, la Patente de los EE. UU. Núm. 7.641.779, titulada "Method and Apparatus for Programmable Fluidic Processing", publicada el 5 de enero de 2010; Becker et al., la Patente de los EE. UU. Núm. 6.977.033, titulada "Method and Apparatus for Programmable Fluidic Processing", publicada el 20 de diciembre de 2005; Deere et al, la Patente de los EE. UU. Núm. 7.328.979, titulada "System for Manipulation of a Body of Fluid", publicada el 12 de febrero de 2008; Yamakawa et al., la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 15 20060039823, titulada "Chemical Analysis Apparatus", publicada el 23 de febrero de 2006; Wu, la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 20110048951, titulada "Digital Microfluidics Based Apparatus for Heatexchanging Chemical Processes", publicada el 3 de marzo de 2011; Fouillet et al., la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 20090192044, titulada "Electrode Addressing Method", publicada el 30 de julio de 2009; Fouillet et al., la Patente de los EE. UU. Núm. 7.052.244, titulada "Device for Displacement of Small Liquid Volumes Along a Micro-catenary Line by Electrostatic Forces", emitida el 30 de mayo de 2006; Marchand et al., la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 20080124252, titulada "Droplet Microreactor", publicada el 29 de mayo de 2008; Adachi et al., la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 20090321262, titulada "Liquid Transfer Device", publicada el 31 de diciembre de 2009; Roux et al., la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 20050179746, titulada "Device for Controlling the Displacement of a Drop Between Two or Several Solid Substrates", publicada el 18 de agosto de 2005; y Dhindsa et al., "Virtual Electrowetting Channels: Electronic Liquid Transport with Continuous Channel Functionality," Lab Chip, 10:832-836 (2010).

50 Las sondas modificadas (por ejemplo, sondas de ácido nucleico extendidas) se pueden detectar, por ejemplo, después de la separación de una mezcla fluidica usando procedimientos establecidos anteriormente o conocidos en la técnica. En realizaciones particulares, las sondas modificadas que se separan en un segundo soporte sólido (es decir, un soporte sólido que es diferente del primer soporte sólido en donde se hizo contacto entre las sondas y el espécimen biológico) se pueden detectar usando técnicas basadas en microarreglos o técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos como las establecidas anteriormente en la presente. Las sondas que se separan en una corriente de flujo se pueden detectar usando detectores ópticos, eléctricos u otros que están equipados en dispositivos microfluidicos conocidos, dispositivos de manipulación de gotas o citómetros de flujo. Se puede usar un procedimiento de detección para determinar secuencias de ácido nucleico objetivo, secuencias de código de barras u otras regiones de secuencia de sondas extendidas.

60 Se han ejemplificado varias realizaciones con respecto a la eliminación de sondas modificadas del soporte sólido en donde se produjeron las sondas. Sin embargo, se entenderá que las sondas sobre un soporte sólido se pueden poner en contacto con un espécimen biológico, modificar sobre el soporte sólido en presencia de ácidos nucleicos objetivo del espécimen y, posteriormente, las sondas modificadas se pueden detectar sobre el soporte sólido. En tal realización,

el espécimen biológico se puede eliminar del soporte sólido antes del paso de detección.

En realizaciones particulares, la presente divulgación proporciona un procedimiento para etiquetar espacialmente ácidos nucleicos de un espécimen biológico que incluye los pasos de (a) proporcionar una pluralidad de cebadores de ácidos nucleicos anclados a un soporte sólido, en donde los cebadores de ácidos nucleicos en la pluralidad incluyen una secuencia universal de cebador que es común a los cebadores de ácido nucleico de la pluralidad; (b) unir una población de sondas de ácido nucleico a la pluralidad de cebadores de ácido nucleico, en donde las sondas de ácido nucleico incluyen una secuencia de unión de cebador universal que se hibrida con la secuencia de cebador universal, una secuencia de captura del objetivo y una secuencia de código de barras que difiere de las secuencias de código de barras de otras sondas de ácido nucleico en la población, anclando así las diferentes sondas de ácido nucleico en posiciones localizadas aleatoriamente en el soporte sólido; (c) amplificar las diferentes sondas de ácido nucleico por extensión de los cebadores de ácido nucleico, produciendo así grupos de ácido nucleico que tienen copias de la secuencia de código de barras y la secuencia de captura del objetivo en las posiciones localizadas aleatoriamente en el soporte sólido; (d) realizar una reacción de secuenciación para determinar las secuencias de código de barras en las posiciones localizadas aleatoriamente en el soporte sólido; (e) poner en contacto un espécimen biológico con las agrupaciones de ácidos nucleicos sobre el soporte sólido; (f) hibridar las secuencias de captura del objetivo de las agrupaciones con ácidos nucleicos objetivo de porciones del espécimen biológico que están próximas a las agrupaciones; y (g) extender las secuencias de captura del objetivo para producir sondas extendidas que incluyen secuencias de los ácidos nucleicos objetivo y las copias de las secuencias de código de barras, etiquetando así los ácidos nucleicos del espécimen biológico.

Como se ejemplifico anteriormente en la presente, se puede unir una pluralidad de cebadores de ácido nucleico a un soporte sólido, en donde los cebadores de ácido nucleico de la pluralidad incluyen una secuencia de cebador universal que es común a los cebadores de ácido nucleico de la pluralidad. En esta realización, se puede anclar una segunda pluralidad de cebadores de ácido nucleico al soporte sólido, y los cebadores de ácido nucleico de la segunda pluralidad pueden tener una segunda secuencia de cebador universal que es común a los cebadores de ácido nucleico de la segunda pluralidad. En esta realización, una pluralidad de diferentes sondas de ácido nucleico que se ponen en contacto con el soporte pueden incluir una secuencia de unión de cebador universal que se hibrida con el cebador universal en el soporte sólido, como se establece anteriormente, y las diferentes sondas de ácido nucleico También pueden incluir una segunda secuencia de unión al cebador universal que se hibrida con la segunda secuencia del cebador universal. Esta configuración de cebadores universales y sitios de unión de cebadores universales puede ser particularmente útil para amplificar las diferentes sondas de ácido nucleico mediante la amplificación en puente, en donde se extienden los cebadores de ácido nucleico en la primera y segunda pluralidad.

Típicamente, cuando una sonda de ácido nucleico contiene un primer y un segundo sitio de unión a cebador universal, estarán localizados en los extremos de la sonda. En algunas realizaciones, puede ser deseable eliminar al menos uno de los sitios de unión del cebador de la sonda de ácido nucleico o de los amplicones producidos a partir de la sonda. En consecuencia, las sondas de ácido nucleico pueden incluir opcionalmente un sitio de escisión entre la secuencia de captura del objetivo y una de las secuencias de unión al cebador universal. En este caso, se puede realizar una reacción de escisión para separar el sitio de unión del cebador universal de la secuencia de captura del objetivo. Generalmente, la porción de la sonda (o sus amplicones) que contiene la secuencia de captura del objetivo se anclara al soporte sólido, lo que resultara en la eliminación del sitio de unión del cebador del soporte sólido y la retención de la secuencia de captura del objetivo. Por lo tanto, la sonda escindida se puede usar para hibridar ácidos nucleicos objetivo, y la sonda escindida se puede extender usando el procedimiento establecido anteriormente en la presente.

En algunas realizaciones, una sonda de ácido nucleico incluirá dos sitios de escisión diferentes. Un primer sitio de escisión estará localizado entre un primer sitio de unión al cebador y uno o más elementos de la secuencia de la sonda. Un segundo sitio de escisión se puede localizar entre un segundo sitio de unión al cebador y uno o más elementos de la secuencia de la sonda. Los sitios de escisión pueden ser reactivos a diferentes reacciones de escisión de modo tal que cada uno se puede escindir selectivamente sin necesariamente escindir el otro. En consecuencia, el primer sitio de escisión se puede escindir antes de modificar la sonda (por ejemplo, antes de producir una sonda extendida), separando así el primer sitio de unión del cebador de uno o más elementos de la secuencia que permanecen anclados a un soporte sólido. El segundo sitio de escisión se puede escindir después de modificar la sonda (por ejemplo, después de producir la sonda extendida), liberando así la sonda modificada para su detección subsecuente.

Alternativamente, una sonda de ácido nucleico puede incluir el primer sitio de escisión y un cebador que se usa para capturar o amplificar la sonda de ácido nucleico puede incluir el segundo sitio de escisión. En esta configuración, el primer sitio de escisión se puede localizar entre un primer sitio de unión del cebador y uno o más elementos de la secuencia de la sonda, de modo tal que la escisión separa el primer sitio de unión del cebador de uno o más elementos de la secuencia de la sonda que permanecen anclados a un soporte sólido. Nuevamente, este primer paso de escisión típicamente se llevara a cabo antes de modificar la sonda (por ejemplo, antes de producir una sonda extendida). Se puede llevar a cabo un segundo paso de escisión para escindir el segundo sitio de escisión después de modificar la sonda (por ejemplo, después de producir la sonda extendida), liberando así la sonda modificada para su detección subsecuente.

Las dos realizaciones anteriores ejemplifican un sitio de escisión localizado entre un punto de anclaje de una sonda

de ácido nucleico (o sonda de ácido nucleico modificada) y una o más secuencias de la sonda (o sonda modificada) que contienen información tal como un código de barras espacial o una secuencia objetivo. Por lo tanto, este sitio de escisión es útil para la liberación de sondas modificadas (por ejemplo, sondas extendidas) para detectar la información de la secuencia y determinar que secuencias están presentes en un espécimen biológico y en donde están presentes las secuencias en el espécimen.

En algunas realizaciones, una o más sondas que se ponen en contacto con un soporte sólido en un procedimiento descrito en la presente pueden incluir un sitio de unión del cebador de secuenciación. En consecuencia, una sonda modificada (por ejemplo, una sonda extendida) se puede detectar en una técnica de secuenciación que incluye un paso de hibridación de un cebador de secuenciación con el sitio de unión del cebador de secuenciación. El sitio de unión del cebador de secuenciación se puede localizar en la sonda de modo tal que la escisión de una versión modificada de la sonda (por ejemplo, una sonda extendida) producirá una sonda liberada que incluye el sitio de unión del cebador de secuenciación. El sitio de unión del cebador de secuenciación puede ser un sitio de unión del cebador de secuenciación universal, de modo tal que una pluralidad de sondas diferentes (por ejemplo, que tienen diferentes códigos de barras y/o secuencias objetivo) tendrá el mismo sitio de unión del cebador de secuenciación.

EJEMPLO I

Etiquetado espacial de ARNm de una muestra de tejido con celdas de flujo de Illumina

En la Fig. 1 se describe un procedimiento para generar agrupaciones que contienen un oligo dT con código de barras y, posteriormente, revelar el oligo dT con código de barras con una digestión por enzimas de restricción seguida de secuenciación. Se preparó una biblioteca de fragmentos que contienen un sitio de unión del cebador de secuenciación SBS3, P5', P7, oligo dA con código de barras de una sola hebra y un sitio de enzima de restricción BspHI (que se muestra en el panel superior de la Fig. 1) por la síntesis de oligo (Integrated DNA Technologies). Los códigos de barras eran de 27-meros y se generaron aleatoriamente durante la síntesis. El sitio de unión para el cebador de secuenciación SBS3 se incluyó para decodificar el código de barras por secuenciación. Se incluyó un tramo de oligo dA para generar un sitio de oligo dT tras el agrupamiento y la linealización. La amplificación en puente y el agrupamiento se realizaron de acuerdo con la química de agrupaciones estándar (Illumina TruSeq PE Cluster Kit v3 cBot P/N: 15037931) en una celda de flujo de GA Illumina usando el protocolo recomendado por el fabricante.

Después de la amplificación en puente y el agrupamiento, las agrupaciones se linealizaron por la escisión de 8-oxo-G en el cebador P7 usando la enzima formamidopirimidina ADN glicosilasa (Fpg) proporcionada en el kit TruSeq PE Cluster. A esto le siguió una digestión con enzimas de restricción con 200 Unidades/ml de BspH1 (Núm. de Cat. NEB R0517L a 37 °C durante 15 minutos para eliminar P7' de la hebra unida al adaptador P5 de la agrupación para revelar el tramo de oligo dT para la subsecuente extensión en presencia de un ARNm. Se han probado concentraciones de enzimas en el rango de 100-400 U/mL por 15 o 30 min. La decodificación del código de barras se inició con el cebador de secuenciación SBS3. Como se muestra en el panel inferior de la Fig.

1, las secuencias de oligo dT en la agrupación se usaron para capturar el ARN poli A+ después de decodificar el código de barras. El ADNc con código de barras se produjo por la extensión de la hebra oligo dT del grupo usando el kit de preparación de muestras de ARN TruSeq (Illumina P/N: 15012997) y el kit de síntesis de ADNc de primera hebra de transcriptasa reversa MMLV (Epicentre P/N: MM070150) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. El ARN capturado se usó como molde. El ADNc con código de barras se liberó de la secuencia P5 de la celda de flujo usando los reactivos de escisión específicos de uracilo (USER) por Illumina (kit TruSeq PE Cluster por Illumina) liberando una biblioteca de ADNc con código de barras que se usó para la secuenciación en una segunda celda de flujo de Illumina.

La disponibilidad de la secuencia de captura de oligo dT después de la digestión con enzimas de restricción por BspHI se confirmó por la hibridación de las agrupaciones linealizadas con una poli A etiquetada con Cy5 (por sus siglas en inglés), (24-mero) como se muestra en el diagrama del panel A de la Fig. 2. Brevemente, después de la digestión con enzimas de restricción, las agrupaciones se trataron con NaOH 0,1 N y se lavaron con un amortiguador HT2 (por sus siglas en inglés) bajo en sal para eliminar la segunda hebra en la celda de flujo. Después, se hizo fluir 500 nM de Cy5 oligo dA (24 nucleótidos) sobre los grupos linealizados y desnaturalizados a una velocidad de 30 µl/min y se incubaron a 40 °C durante 5 min, y después se obtuvieron imágenes. La hibridación de poli A etiquetado con Cy5 con el oligo dT se detectó en los carriles 2-7 de la celda de flujo de GA, en donde estaban presentes las bibliotecas de BODT-1 (por sus siglas en inglés) que contienen el oligo dT (ver la imagen de la celda de flujo que se muestra en la Fig. 2, Panel B). Como es evidente en la imagen de la celda de flujo (Panel B) y la grafica de barras (Panel C), se demostró que las bibliotecas PhiX (por sus siglas en inglés) de control (carriles 1 y 8 de la celda de flujo) tienen una fluorescencia muy baja en la señal de Cy5. Estos resultados demostraron que se puede crear un sitio oligo dT en la agrupación que, tras la linealización, se puede unir específicamente a una poli A Cy5 (24-mero).

Las métricas de secuenciación de la celda de flujo descrita anteriormente con 3,2 pM de la biblioteca BODT-1 se proporcionan en la tabla que se muestra en la Fig. 3. Se detectaron millones de lecturas en 21 placas de la secuenciación de GA. Después de la secuenciación, se determinó el número de códigos de barras únicos como se graficó en la Fig. 4. Esto se hizo asumiendo que cada lectura del filtro de paso (PF, por sus siglas en inglés) es un código de barras y determinando el número de lecturas únicas (códigos de barras) en cada carril. Se detectaron entre

5 y 11 millones de agrupaciones de códigos de barras únicos después de secuenciar placas en comparación con las bibliotecas de control PhiX. Estos resultados demostraron que la decodificación de secuencias de una biblioteca de secuencias de oligo dT con código de barras es factible y genera millones de códigos de barras únicos.

EJEMPLO II

5 Adhesión celular en celdas de flujo de Illumina

Las células individuales se capturan en una celda de flujo con un patrón (celda de flujo HiSeq X10, Illumina). Todos los pasos del flujo de reactivos se realizaron con una bomba peristáltica o el instrumento de generación de grupos cBot (Illumina). En pocas palabras, se hizo fluir agua libre de nucleasas en todos los carriles de la celda de flujo con un patrón seguido por solución de lisina poli D 30-70K (100 µg/ml y 20 pg/ml) a una velocidad de flujo de 100 µl/min durante 8 min. El suero bovino fetal inactivado por calor (Life Technologies #10082-139) también se probó como adhesivo. Los adhesivos se incubaron en los carriles de las celdas de flujo por 1 h, seguido de un lavado con PBS (por sus siglas en inglés) 1X + Pluronic F-68 al 0,5 % (Life Technologies No. 24040-032). Después, las células se adherieron a las células de flujo revestidas haciendo fluir de 5 a 50 células/µl o aproximadamente 100-1000 células por carril a una velocidad de 100 µl/min, seguido de una etapa de incubación durante 60 min para unir las células. La célula de flujo se lavó con PBS 1X/Pluronic al 0,5 % a una velocidad de 75 pl/min. Si las células se fijaron en la celda de flujo, se hizo fluir paraformaldehído (PFA) al 1 % en la celda de flujo después de hacer fluir las células como se describió anteriormente y se incubaron durante 15 minutos, seguido de la etapa PBS 1X/Pluronic al 0,5 %. Se eliminó la celda de flujo y se contó el número de células por carril usando un microscopio.

La Fig. 5, Panel A, muestra una imagen de células capturadas en la celda de flujo con patrón. Los datos de recuento celular que se muestran en la Fig. 5, Panel B confirmaron que las celdas de flujo recubiertas con poli D Lisina ayudaron a la adherencia celular en comparación con el control recubierto con BSA (por sus siglas en inglés) o sin tratamiento con adhesivo. Como se muestra en la Fig. 6, las células adheridas se pueden fijar satisfactoriamente con PFA al 1 %.

EJEMPLO III

25 Captura localizada espacialmente del ARNm objetivo por las sondas unidas a una superficie de gel

Este ejemplo describe la creación de un jardín de sondas poli T en un portaobjetos recubierto de gel, la colocación de tiras de tejido encima de un jardín de sondas poli T, la liberación de ARN de las tiras de tejido, la captura del ARNm liberado por las sondas poli T, la transcripción inversa de las sondas poli T etiquetadas con Cy3 (por sus siglas en inglés), la eliminación del tejido, y obtención de imágenes de los portaobjetos.

La Fig. 7, Panel A, muestra una representación esquemática de los pasos y reactivos usados para crear sondas adheridas a un gel. En pocas palabras, se revistió un portaobjetos de un microscopio con acrilamida libre de silano (SFA), se unieron los cebadores P5 y P7 (véase la Patente de los EE. UU. Núm. 2011/0059865 A1), las sondas que tenían una secuencia poli A y una secuencia complementaria P5 o P7 se hibridaron con los cebadores P5 y P7, respectivamente, y los cebadores P5 y P7 se extendieron para producir extensiones de secuencia poli T. Se realizó una etapa de control de calidad hibridando oligonucleótidos poliA marcados con Cy5 con los cebadores extendidos y obteniendo imágenes de la superficie mediante un Axon Imager.

Como se muestra en el Panel B de la Fig. 7, se colocó una sección de tejido en el gel que contenía los cebadores extendidos polyT. El tejido se trató para liberar ARNm, y se llevó a cabo la hibridación de las colas poli A del ARNm liberado con secuencias poli T de las cebadores extendidos. Las secuencias poli T se extendieron usando los ARNm capturados como moldes, y los cebadores extendidos se etiquetaron selectivamente con Cy3. Se eliminó el tejido del gel y se obtuvieron imágenes de la superficie para detectar la fluorescencia de Cy3.

Como se muestra en la imagen de la Fig. 7, las áreas del gel que están próximas a las áreas del tejido que liberaron especies de ARNm aparecen fluorescentes mientras que las áreas que no liberaron ARNm aparecen oscuras en la imagen. Por lo tanto, el ARNm capturado crea una imagen similar a una huella del tejido.

45 EJEMPLO DE REFERENCIA IV

Captura localizada espacialmente del ARNm objetivo por las sondas unidas a una superficie BeadArray™

Este ejemplo describe la colocación de tiras de tejido encima de un BeadArray™ que tiene sondas poli T, la liberación de ARN de las secciones de tejido, la captura del ARNm liberado por las sondas poli T, la transcripción inversa a las sondas poli T etiquetadas con Cy5, la eliminación del tejido, y la obtención de imágenes de BeadArray™.

50 Como se muestra en el Panel A de la Fig. 8, una sección de tejido olfativo de ratón se colocó en un BeadArray™ que tiene sondas poli T. 8, se colocó una tira de tejido olfativo de ratón en un BeadArray™ que tiene sondas poli T. El tejido se trató para liberar ARNm, y las colas poli A del ARNm liberado se hibridaron con secuencias poli T de las sondas. Las secuencias poli T se extendieron usando los ARNm capturados como moldes, y los cebadores extendidos se etiquetaron selectivamente con Cy5. El tejido se retiró de BeadArray™ y se obtuvieron imágenes de BeadArray™ para

detectar la fluorescencia de Cy5.

Como se muestra en el Panel B de la Fig. 7, las áreas del BeadArray™ que están próximas a las áreas del tejido que liberaron especies de ARNm aparecen fluorescentes, mientras que las áreas que no liberaron ARNm aparecen oscuras en la imagen. Por lo tanto, el ARNm capturado crea una imagen similar a una huella del tejido.

- 5 Se pretende que el término "que comprende" en la presente memoria sea abierto, incluyendo no solamente los elementos enumerados, sino que además abarque cualquier elemento adicional.

Se han descrito un número de realizaciones. No obstante, se entenderá que pueden realizarse diversas modificaciones. En consecuencia, otras realizaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
- 5 una pluralidad de sondas de ácido nucleico sobre un soporte sólido, en el que las sondas de ácido nucleico están situadas y unidas de forma aleatoria a través de una población de características sobre el soporte sólido, y en el que una sonda de ácido nucleico de la pluralidad de sondas de ácido nucleico comprende:
- i) una secuencia de unión del cebador universal, y
- ii) una secuencia de código de barras espacial que difiere de la secuencia de código de barras espacial de otras sondas de ácido nucleico en el soporte sólido;
- 10 a condición de que el soporte sólido no comprenda una pluralidad de cuentas sintéticas asociadas a la pluralidad de códigos de barras espaciales.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la población de características en el soporte sólido es un patrón de características discretas, en la que una característica en el patrón de características discretas se selecciona del grupo que consiste en: hoyos, pocillos, canales, crestas, regiones elevadas, clavijas, y postes, y en la que las características en el patrón de características discretas en el soporte sólido tienen un paso promedio de menos de 1 micrómetro.
- 15 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que el soporte sólido comprende además marcadores fiduciales y en la que el soporte sólido es una célula de flujo o un portaobjetos.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que el soporte sólido comprende un revestimiento de gel, en la que los cebadores de ácido nucleico están unidos al revestimiento de gel.
- 20 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la sonda de ácido nucleico comprende además una o más de una secuencia de captura y una secuencia identificadora molecular única.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la sonda de ácido nucleico está descodificada y comprende una secuencia de captura poli (T) que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico de un espécimen biológico permeabilizado.
- 25 7. La composición de la reivindicación 6, en la que el espécimen biológico se encuentra en la superficie del soporte sólido.
8. La composición de la reivindicación 7, que comprende la secuencia de ácido nucleico del espécimen biológico hibridada con la secuencia de captura.
- 30 9. La composición de la reivindicación 8, que comprende además una polimerasa, en la que la polimerasa es una ADN polimerasa, una ARN polimerasa o una transcriptasa inversa.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el espécimen biológico es una mezcla de células o una sección de tejido, en la que la sección de tejido es una sección de tejido fresco congelado o una sección de tejido fijado, y opcionalmente, en la que la sección de tejido fijado es un tejido desparafinado fijado en formalina e incrustado en parafina.
- 35 11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que el espécimen biológico es de una planta, un alga, un insecto, un nematodo, un pez, un reptil, un hongo, o un mamífero, y opcionalmente en la que el mamífero es un ser humano.
12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la secuencia de ácido nucleico del espécimen biológico es ARNm.
- 40 13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la secuencia de ácido nucleico del espécimen biológico es ADN genómico.
14. Un procedimiento para producir una matriz espacial en un soporte sólido que comprende una pluralidad de sondas de ácido nucleico que se localizan de forma aleatoria y se adhieren a través de una población de características en el soporte sólido, comprendiendo dicho procedimiento:
- 45 a) distribuir de forma aleatoria la pluralidad de sondas de ácido nucleico en el soporte sólido, en el que una sonda de ácido nucleico de la pluralidad comprende; (i) una secuencia de unión al cebador universal, y (ii) una secuencia de código de barras espacial que difiere de la secuencia de código de barras espacial de otras sondas de ácido nucleico en el soporte sólido, y

b) descodificar la secuencia de código de barras espacial de la pluralidad de sondas de ácido nucleico unidas a través de la población de características en el soporte sólido, identificando así la ubicación de las secuencias de código de barras espaciales en el soporte sólido y produciendo una matriz espacial,

5 a condición de que el soporte sólido no comprenda una pluralidad de cuentas sintéticas asociadas a la pluralidad de códigos de barras espaciales.

15. La composición de la reivindicación 1, en la que la secuencia de unión del cebador universal es un sitio de unión del cebador de secuenciación.

Figura 1

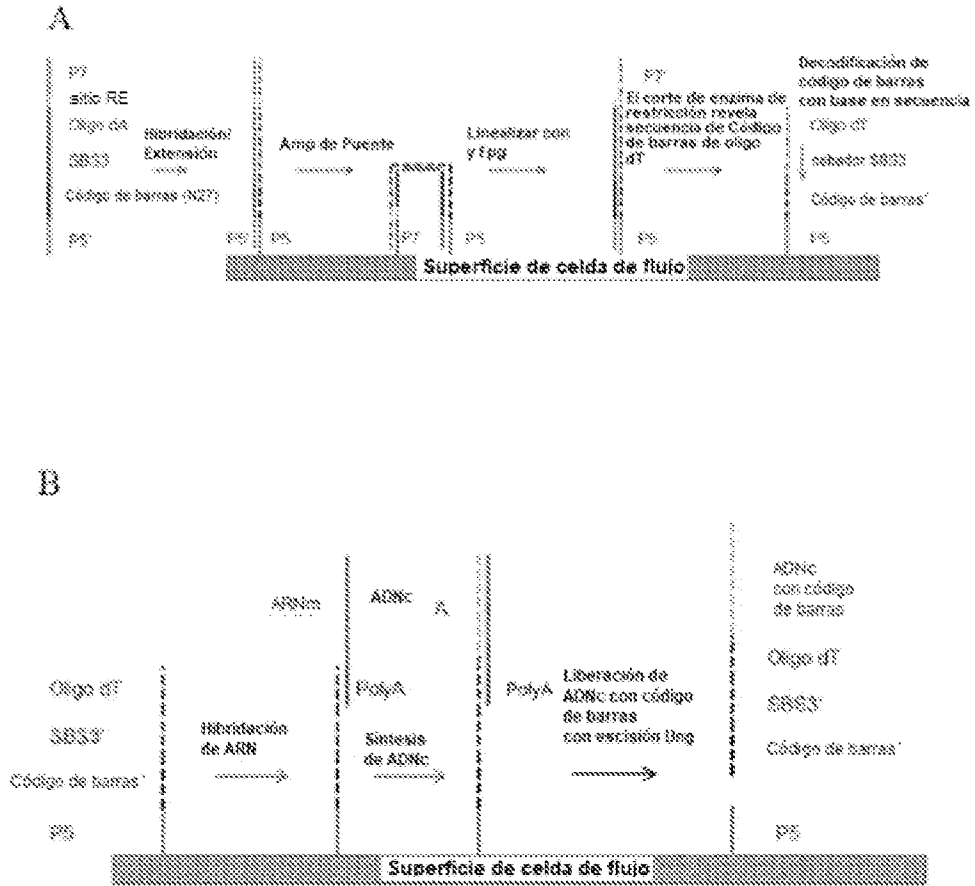
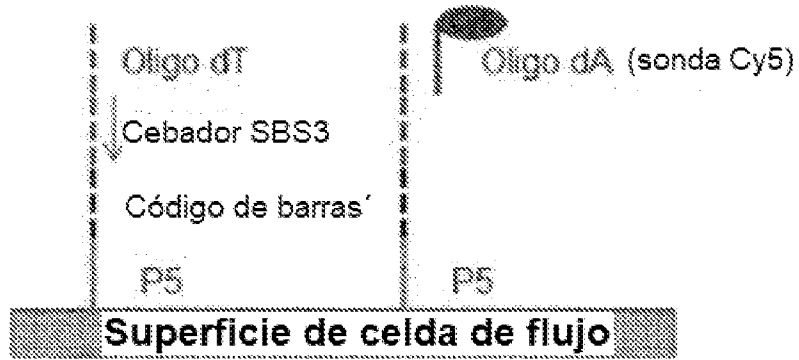
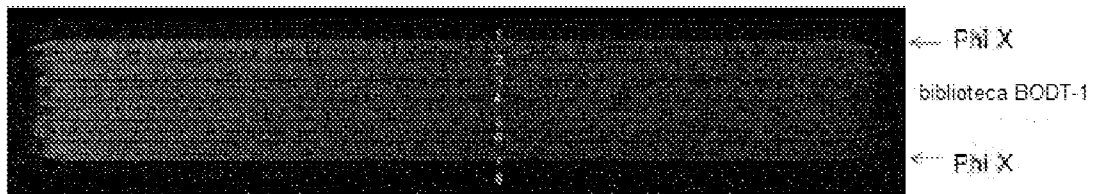


Figura 2

A



B



C

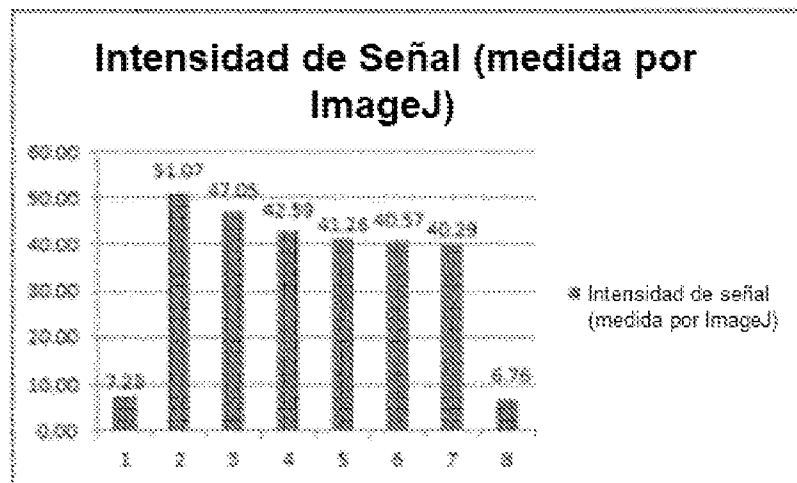


Figura 3

Carril	Placas	Densidad (K/mm ²)	Grupos PF (%)	Fase/Prefase (%)	Lecturas (M)	Lecturas PF (M)	% \geq Q30
1) Phi X	21	904 +/- 62	92.1 +/- 1.0	0.797 / 0.697	9.83	9.06	94.6
2) 3.2 nM BODT -1	21	1026 +/- 171	48.2 +/- 36.6	0.948 / 0.151	11.15	5.59	72.9
3) 3.2 nM BODT -1	21	979 +/- 186	41.9 +/- 43.2	0.964 / 0.154	10.6	5.03	70.8
4) 3.2 nM BODT -1	21	1144 +/- 24	85.3 +/- 14.3	0.969 / 0.163	12.45	10.62	76.4
5) 3.2 nM BODT -1	21	1136 +/- 37	90.6 +/- 0.8	0.977 / 0.173	12.35	11.19	80.5
6) 3.2 nM BODT -1	21	1128 +/- 28	90.5 +/- 0.7	0.953 / 0.182	12.27	11.1	80.6
7) 3.2 nM BODT -1	21	1131 +/- 28	90.3 +/- 0.8	0.955 / 0.170	12.3	11.1	82.6
8) Phi X	21	763 +/- 41	91.3 +/- 0.4	0.756 / 0.135	8.3	7.58	94

Figura 4

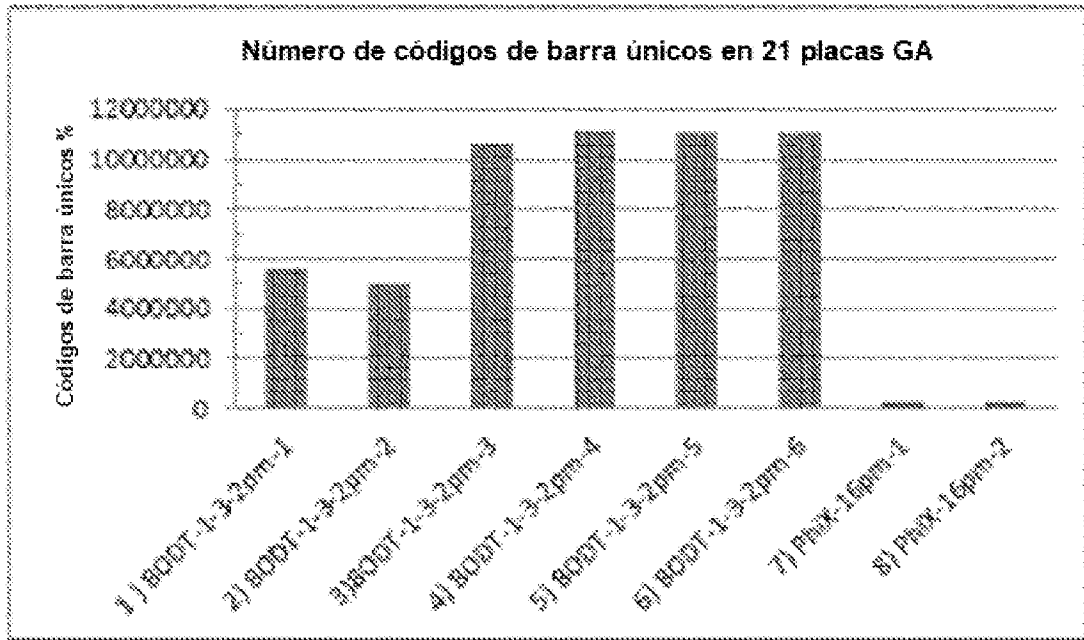
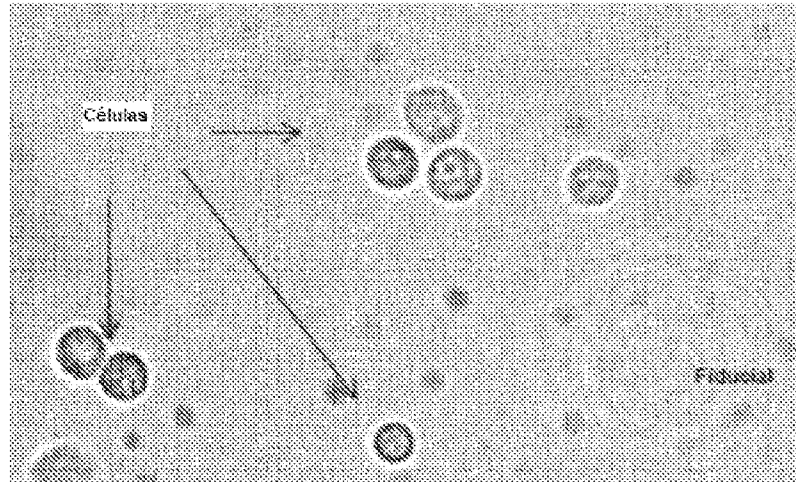


Figura 5

A



B

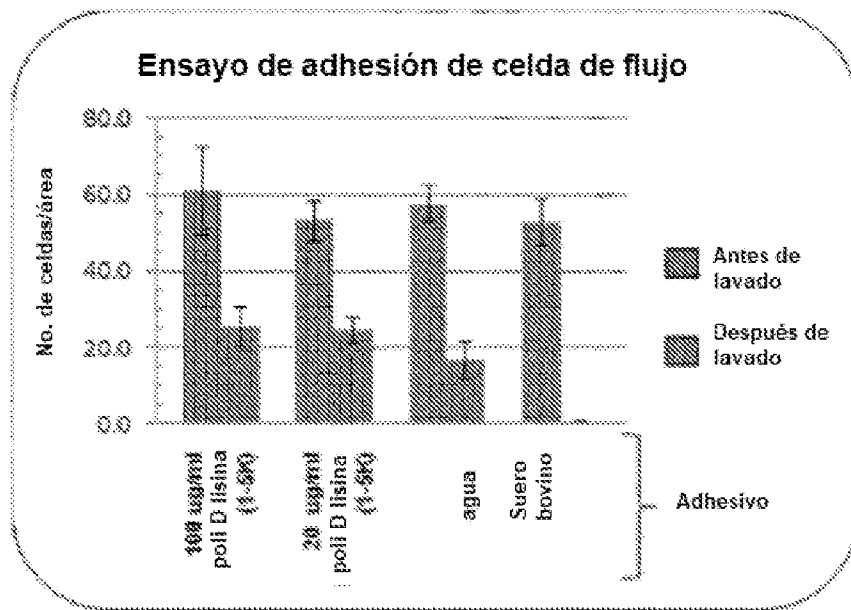


Figura 6

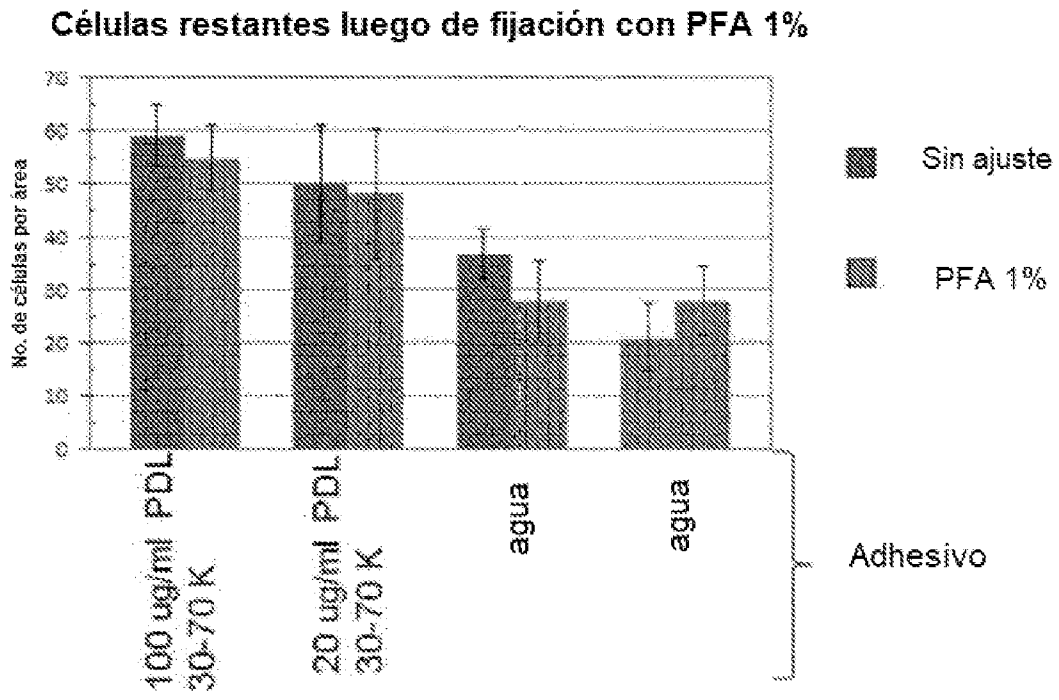
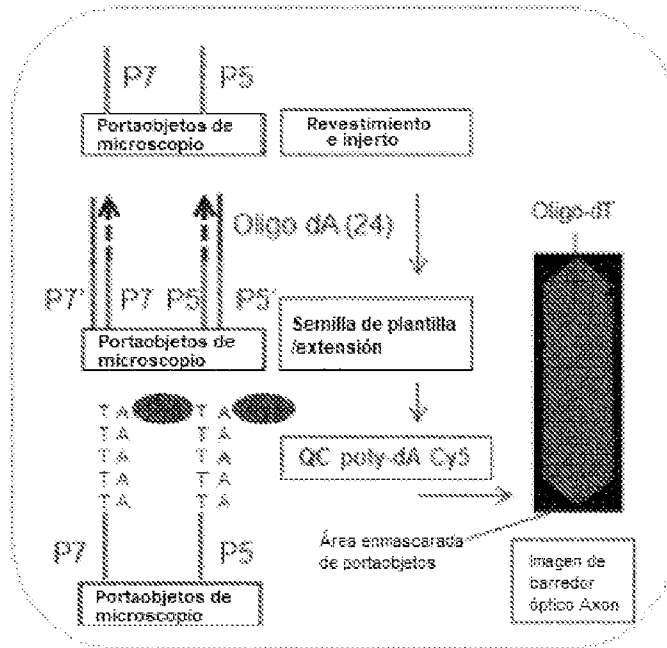


Figura 7

A



B

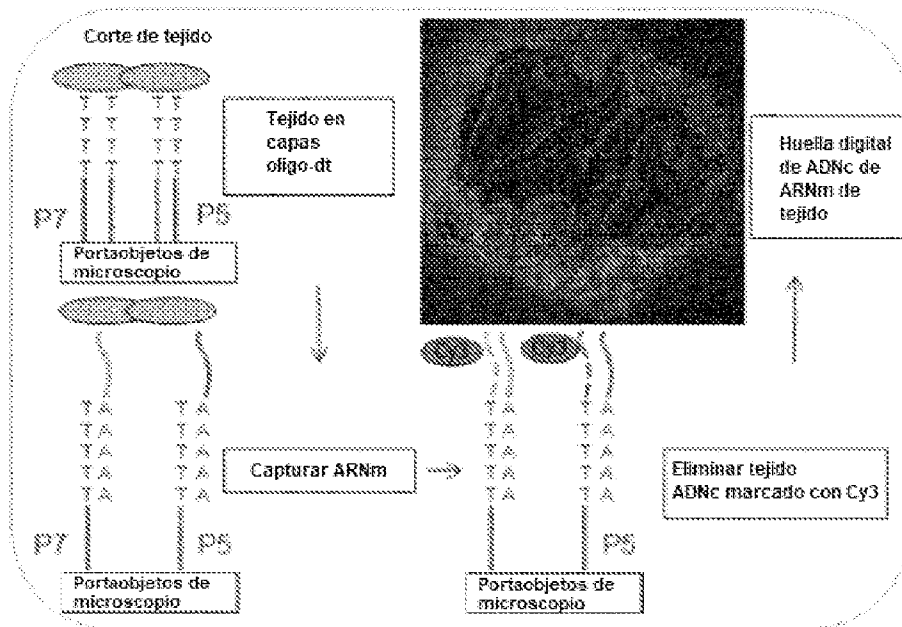
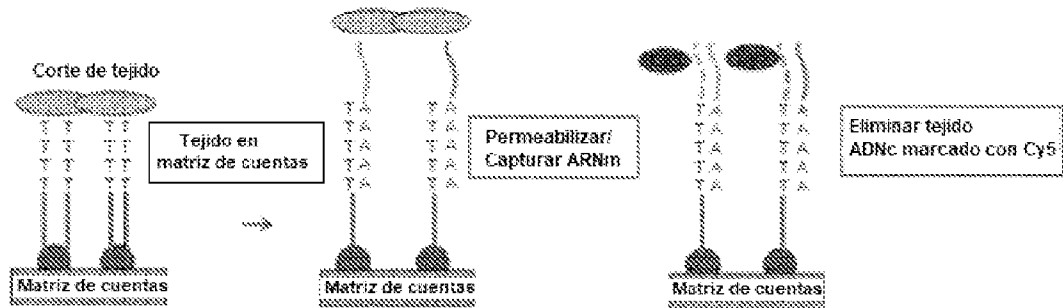


Figura 8

A



B

