

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 434**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2014 PCT/CN2014/088542**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016 WO16058127**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2014 E 14903871 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3208335**

54 Título: **Método para romper un ácido nucleico y añadir un adaptador por medio de transposasa y reactivo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2021

73 Titular/es:

**MGI TECH CO., LTD. (100.0%)
Main Building and Second Floor of No. 11
Building, Beishan Industrial Zone, Yantian
District
Shenzhen Guangdong 518083, CN**

72 Inventor/es:

**GENG, CHUNYU;
CHEN, RUOYING;
GUO, RONGRONG;
ALEXEEV, ANDREI;
ZHANG, YINGXIN;
JIANG, HUI y
ZHANG, WENWEI**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 821 434 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

Método para romper un ácido nucleico y añadir un adaptador por medio de transposasa y reactivo

5 Campo técnico:

La presente descripción se refiere al campo de la biología molecular y, más particularmente, a un método para romper un ácido nucleico y añadir un adaptador por medio de transposasa y un reactivo.

10 Antecedentes de la invención

Desde el método de secuenciación de pirofosfato inventado por Roche, que ha dado paso a la nueva generación de secuenciación, hasta ahora, la nueva generación de secuenciación ha experimentado un período de rápido desarrollo. Sin embargo, con el desarrollo de la secuenciación de alto rendimiento, la preparación de muestras con alto rendimiento y bajo costo se ha convertido en un factor clave en el campo de la secuenciación. Se han desarrollado métodos de procesamiento de muestras y dispositivos de automatización de varios principios, que incluyen: fragmentación de muestras, tratamiento terminal de moléculas de ácido nucleico y ligación de adaptadores y la generación de bibliotecas finales.

20 Los métodos de fragmentación de muestras incluyen principalmente métodos físicos (tales como fragmentación por ultrasonidos) y métodos enzimáticos (es decir, el tratamiento de endonucleasa no específica). En donde Covaris tiene predominio en los métodos físicos basados en la tecnología patentada de acústica focalizada adaptativa (Adaptive Focused Acoustic, AFA). En condiciones isotérmicas, la energía acústica con una longitud de onda de 1 mm se concentra en una muestra mediante un sensor ultrasónico de estado sólido esférico con >400 kHz, mediante el uso de energía acústica de focalización geométrica. Este método garantiza la integridad de las muestras de ácido nucleico y puede lograrse una alta tasa de recuperación. Los instrumentos de Covaris incluyen una serie M económica, una serie S de un solo tubo de potencia completa y las series E y L de mayor rendimiento. La aleatorización de fragmentos basada en métodos físicos es buena, pero los métodos físicos dependen de un gran número de agentes de interrupción de Covaris y requieren un tratamiento terminal separado posterior, ligación de adaptadores y PCR, y varias operaciones de purificación. En donde los métodos enzimáticos incluyen la enzima fragmentasa de ADNbc NEB Next dsDNA Fragmentase de la compañía NEB. El reactivo primero escinde el ADN bicatenario para producir un sitio de escisión aleatorio y luego elimina la cadena de ADN complementaria mediante la identificación del sitio de escisión a través de otra enzima para lograr el propósito de la interrupción. Este reactivo puede usarse para ADN genómico, productos de amplificación del genoma completo y productos de PCR, y la aleatoriedad también es buena, pero se generarán algunos fragmentos de inserción y deleción artificiales cortos. E inevitablemente también es necesario llevar a cabo un tratamiento terminal separado posterior, ligación de adaptadores y PCR, y varias operaciones de purificación. Además, el kit de ruptura por transposasa liderado por el kit Nextera de la empresa Epicentra (adquirida por Illumina) se ha usado para completar simultáneamente la fragmentación del ADN y la ligación de adaptadores mediante el uso de la transposasa, para reducir de esta manera el tiempo de procesamiento de muestras.

40 Por la simplicidad de las diversas operaciones, el método de interrupción por transposasa es muy superior a otros métodos en términos de flujo y facilidad de operación, pero esta interrupción tiene sus propias deficiencias: la función de la transposasa depende de una secuencia Me específica de 19 pb. Por lo tanto, aunque la transposasa puede añadir secuencias adaptadoras diferentes en los extremos 5' y 3' de la secuencia objetivo mediante la inserción de dos secuencias adaptadoras completamente diferentes, los adaptadores deben contener una secuencia específica de Me, lo que da como resultado que ambos extremos del fragmento interrumpido tendrán una secuencia Me simétricamente, y debido al efecto especial de la transposasa, estará presente una brecha por ausencia de 9 bases nucleotídicas entre la secuencia objetivo (o el fragmento interrumpido) y la secuencia Me. Las secuencias Me idénticas en ambos extremos de la secuencia objetivo tendrán un impacto en las aplicaciones tecnológicas posteriores, tal como un impacto en la técnica de secuenciación de segunda generación basada en el método de ligación, donde las secuencias Me en ambos lados de la misma cadena son secuencias complementarias, por lo que la hibridación interna de la molécula monocatenaria generará y dañará la unión de los cebadores de anclaje.

55 Existe una solicitud de patente relacionada (publicación de solicitud núm.: CN 102703426 A, presentada el 3 de octubre de 2012) que propone una solución técnica, en la que se realiza una digestión con endonucleasas a las secuencias interrumpidas para eliminar la secuencia de 9nt y la secuencia Me. Sin embargo, este método solo usa la ventaja de la interrupción por transposasa para aleatorizar las secuencias de ácidos nucleicos, pero presenta la deficiencia de la necesidad de añadir un adaptador de continuación por separado, lo cual es engorroso y no es adecuado para aplicaciones de mayor rendimiento.

60 Hasta ahora, ninguna patente u otra publicación ha descrito un método de experimento de biología molecular para interrumpir rápidamente las secuencias objetivo mediante el uso de tecnología de transposasa y modificar la secuencia interrumpida con dos secuencias completamente diferentes.

65 Resumen de la invención

En la presente descripción se proporciona un método y un reactivo para romper un ácido nucleico y añadir un adaptador por medio de una transposasa, en el que se introducen otras secuencias diferentes a la secuencia de identificación de transposasa en el producto de ácido nucleico interrumpido por la transposasa, de modo que se ligan adaptadores diferentes a ambos extremos del ácido nucleico interrumpido, por lo que la aplicación del producto interrumpido no está limitada por la presencia de la secuencia de identificación de transposasa en ambos extremos.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para romper un ácido nucleico y añadir un adaptador por medio de una transposasa, en donde el método comprende las siguientes etapas:

interrumpir aleatoriamente un ácido nucleico mediante el uso de un complejo de inserción de transposasa, en donde el complejo de inserción de transposasa comprende una transposasa y un primer adaptador que comprende una secuencia de identificación de transposasa, y ambos extremos del ácido nucleico interrumpido se ligan por separado al primer adaptador para formar una brecha en cada extremo;
 eliminar la influencia de la transposasa en el sistema en una reacción de continuación por medio de purificación o tratamiento con un reactivo químico;
 ligar un segundo adaptador en la brecha mediante el uso de una ligasa, en donde la secuencia del segundo adaptador es diferente a la del primer adaptador; y
 realizar una reacción de PCR mediante el uso de cebadores dirigidos al primer adaptador y al segundo adaptador respectivamente, para obtener un producto cuyos dos extremos están ligados respectivamente a secuencias adaptadoras diferentes.

Como una modalidad preferida de la presente descripción, para evitar la autoligación o la interligación de los adaptadores, el primer adaptador tiene una modificación para evitar la autoligación o una modificación para ligar con el segundo adaptador.

Como una modalidad preferida de la presente descripción, la modificación del primer adaptador comprende cualquiera de las siguientes o una combinación de las mismas:

- (a) la modificación didesoxi de la base 3' terminal del primer adaptador;
- (b) introducción de un dUTP en una cadena del primer adaptador para la escisión enzimática posterior de los adaptadores en exceso;
- (c) introducción de un par de bases en el exterior de la secuencia de identificación de transposasa del primer adaptador, en donde está la modificación didesoxi de la base 3' terminal; y
- (d) el primer adaptador que consiste en una secuencia completa, internamente complementaria para formar una secuencia bicatenaria reticulada por enlace fosfodiéster 3'-5'.

Cabe señalar que cualquier modificación de (a) a (d) puede usarse sola o en combinación de dos o más modificaciones, y en particular, la modificación (a) puede llevarse a cabo en combinación con las modificaciones (b), (c) o (d) por separado, para lograr un mejor efecto de prevención de la autoligación o la interligación de los adaptadores.

Como una modalidad preferida de la presente invención, la modificación del primer adaptador es la modificación didesoxi de la base 3' terminal del primer adaptador.

Como una modalidad preferida de la presente invención, para evitar la autoligación del adaptador, el segundo adaptador tiene una modificación que evita la autoligación.

Como una modalidad preferida de la presente invención, la modificación en el segundo adaptador es una modificación didesoxi de la base 3' terminal.

En la presente invención, el término "autoligación" se refiere a la ligación entre diferentes moléculas del mismo adaptador, tal como la ligación entre diferentes moléculas del primer adaptador o la ligación entre las diferentes moléculas del segundo adaptador; el término "interligación" se refiere a la ligación entre moléculas de diferentes tipos de adaptadores, tal como la ligación entre las moléculas del primer adaptador y las moléculas del segundo adaptador.

Como una modalidad preferida de la presente invención, para facilitar la adquisición de moléculas monocatenarias después de las reacciones de PCR para experimentos posteriores de manipulación de moléculas monocatenarias, uno de los cebadores usados en la reacción de PCR es un cebador marcado con biotina terminal para obtener moléculas monocatenarias por reacción de afinidad entre biotina y estreptavidina. Específicamente, después de la reacción de PCR, la molécula monocatenaria con una biotina en el extremo se separa por unión a una estreptavidina en la superficie de la esfera magnética.

Como una modalidad preferida de la presente invención, la purificación es purificación con esferas magnéticas o una columna. La purificación con esferas magnéticas o una columna puede eliminar completamente la transposasa en el sistema. En una modalidad de la presente descripción, se usaron esferas Ampure XP para la purificación con esferas

magnéticas y se realizó una purificación en columna mediante el uso de una columna de purificación de PCR de QIAGEN. No hay duda de que en la presente invención puede usarse cualquier producto similar para la purificación con esferas magnéticas o la purificación en columna.

5 Como una modalidad preferida de la presente invención, el tratamiento con reactivo químico es un tratamiento para disociar la transposasa de una secuencia objetivo por degeneración o digestión de la transposasa. Dado que en cuanto a su forma química la transposasa es una proteína, esta puede disociarse de la secuencia objetivo mediante el uso de un medio de desnaturalización o de digestión correspondiente, aunque la transposasa después de este tratamiento todavía puede estar presente en el sistema, pero ha perdido su actividad biológica, por lo tanto, las reacciones de
10 continuación no se afectarán negativamente.

Como una modalidad preferida de la presente invención, el reactivo químico comprende un primer reactivo y un segundo reactivo; en donde el primer reactivo comprende uno o más miembros del grupo que consiste en una solución de proteasa, una solución de SDS y un tampón NT para romper el efecto de adsorción de la transposasa y la secuencia objetivo del ácido nucleico; el segundo reactivo comprende una solución de Tritón-X100 para debilitar la influencia del primer reactivo en las reacciones enzimáticas posteriores.

En general, el primer reactivo se usa primero para el tratamiento seguido del segundo reactivo. El primer reactivo se usa para tratar el producto de reacción del ácido nucleico después de la interrupción por la transposasa para romper el efecto de adsorción de la transposasa y la secuencia objetivo del ácido nucleico, en lugar de las etapas de purificación con esferas magnéticas o purificación en columna que tradicionalmente son complejas y costosas. Y luego, el segundo reactivo se usa para el tratamiento para debilitar la influencia del primer reactivo en las reacciones enzimáticas posteriores, lo que garantiza que la amplificación por PCR posterior se desarrolle sin problemas.

25 Cabe señalar que el primer reactivo puede ser uno o más miembros de las soluciones anteriores, en donde más de las soluciones anteriores pueden ser dos o tres soluciones anteriores, tales como la solución de proteasa y la solución de SDS, la solución de SDS y el tampón NT, la solución de proteasa y el tampón NT, la solución de proteasa, la solución de SDS y el tampón NT, en donde el tampón NT puede ser el tampón NT en la serie S5 del kit Truprep.

30 Como una modalidad preferida de la presente invención, se añade además ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para el tratamiento después del tratamiento con el primer reactivo, si el primer reactivo comprende una solución de proteasa. El EDTA inhibe la actividad de las proteasas y, por tanto, evita que las proteasas degraden las enzimas en reacciones de PCR posteriores.

35 Como una modalidad preferida de la presente invención, el segundo reactivo comprende una solución de Tritón-X100. El Tritón-X100, cuyo nombre químico es octilfenil polioxiétilen éter, como tensioactivo no iónico, en la función de la presente invención debilita la influencia del primer reactivo en las reacciones enzimáticas posteriores.

40 Como una modalidad preferida de la presente invención, el segundo reactivo comprende además una solución de Tween-20 si el primer reactivo comprende una solución de SDS. La adición de Tween-20 podría debilitar además la influencia del SDS en la reacción enzimática posterior y mejorar el efecto de la PCR. Cabe señalar que el Tween-20 puede usarse como componente del segundo reactivo en forma de una mezcla con Tritón-X100; también puede proporcionarse por separado en forma de separación del Tritón-X100, en cuyo caso el segundo reactivo se refiere a la solución de Tritón-X100 y la solución de Tween-20.

45 Debe entenderse que el primer reactivo y el segundo reactivo en la presente invención no pretenden limitarse a un solo objeto o a una combinación de una pluralidad de objetos. Además, en la presente invención, conceptos tales como "primero" y "segundo", que se usan, en cualquier caso, no deben interpretarse con el significado de orden o técnica, sino que su función en la presente invención es distinguirse de otros objetos.

50 En la presente invención, los expertos en la técnica pueden determinar empíricamente la concentración de trabajo del primer reactivo y el segundo reactivo. En general, en el primer reactivo, la concentración de trabajo de la proteasa es preferentemente de 50 a 5000 mAU/ml, con mayor preferencia de 75 a 3750 mAU/ml, con la máxima preferencia de 1500 mAU/ml; la concentración de trabajo del EDTA es preferentemente de 1 a 50 mmol/L, con mayor preferencia 14 mmol/L; la concentración de trabajo del SDS es preferentemente de 0,01 % a 1,5 % (en volumen), con mayor preferencia 1 % (en volumen); la concentración final de tampón NT puede usarse de acuerdo con 1×. En el segundo reactivo, la concentración de trabajo de Tritón-X100 es preferentemente de 0,1 % a 2 % (en volumen), con mayor preferencia 1 % (en volumen); la concentración de trabajo de Tween-20 es preferentemente de 0,1 % a 2 % (en volumen), con mayor preferencia de 0,5 % (en volumen).

60 En la presente invención, la secuencia del segundo adaptador no está limitada y puede ser cualquier secuencia siempre que sea diferente a la secuencia del primer adaptador.

65 Como una modalidad preferida de la presente invención, el reactivo comprende además un segundo componente adaptador para su ligación en la brecha formada por la ligación del primer adaptador a ambos extremos del ácido nucleico interrumpido.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un reactivo para romper un ácido nucleico y añadir un adaptador por medio de una transposasa, en donde el reactivo comprende los siguientes componentes:

- 5 una transposasa y un primer adaptador que comprende una secuencia de identificación de transposasa para formar un complejo de inserción de transposasa para interrumpir aleatoriamente un ácido nucleico, de modo que ambos extremos del ácido nucleico interrumpido se ligan por separado al primer adaptador para formar una brecha en cada extremo;
- 10 un segundo adaptador y un componente ligasa para ligar el segundo adaptador en la brecha; y cebadores dirigidos al primer adaptador y al segundo adaptador respectivamente para obtener, mediante la realización de una reacción de PCR, un producto cuyos dos extremos están ligados respectivamente a secuencias adaptadoras diferentes.

15 Como una modalidad preferida de la presente invención, el primer adaptador tiene una modificación para evitar la autoligación o una modificación para ligar con el segundo adaptador.

Como una modalidad preferida de la presente descripción, la modificación del primer adaptador comprende cualquiera de las siguientes o una combinación de las mismas:

- 20 (a) la modificación didesoxi de la base 3' terminal del primer adaptador;
- (b) introducción de un dUTP en una cadena del primer adaptador para la escisión enzimática posterior de los adaptadores en exceso;
- (c) introducción de un par de bases en el exterior de la secuencia de identificación de transposasa del primer adaptador, en donde está la modificación didesoxi de la base 3' terminal; y
- 25 (d) el primer adaptador que consiste en una secuencia completa, internamente complementaria para formar una secuencia bicatenaria reticulada por enlace fosfodiéster 3'-5'.

30 Como una modalidad preferida de la presente invención, el segundo adaptador tiene una modificación que evita la autoligación; la modificación en el segundo adaptador es una modificación didesoxi de la base 3' terminal.

Como una modalidad preferida de la presente invención, uno de los cebadores usados en la reacción de PCR es un cebador marcado con biotina terminal para obtener moléculas monocatenarias mediante la reacción de afinidad entre biotina y estreptavidina.

35 El método de la presente invención modifica la secuencia mediante la ligación de un segundo adaptador en ambos lados del producto interrumpido por una transposasa para lograr una secuencia específica diferente en ambos lados del producto interrumpido final o del producto de PCR, por lo tanto, la aplicación del producto interrumpido no está limitada por la presencia de la secuencia de identificación de transposasa (Me de 19 pb) en ambos extremos y la aplicación es más flexible, tal como la ciclación, la digestión o la ligación molecular.

40 Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 es un diagrama de flujo esquemático de una solución técnica en la que una transposasa interrumpe un ácido nucleico y liga un adaptador de brecha (es decir, el adaptador núm. 2) en la presente invención;

La Figura 2 es el resultado de la electroforesis en gel del producto de PCR después de la ligación de un adaptador de brecha (es decir, el adaptador núm. 2) en el Ejemplo 1 de la presente invención, en donde el carril 1 es el producto de hibridación a 60 °C después de la interrupción por el adaptador simple 2 y después de la ligación del adaptador de brecha; el carril 2 es el producto de hibridación a 55 °C después de la interrupción por el adaptador simple 2 y después de la ligación del adaptador de brecha; el carril 3 es el producto de hibridación a 60 °C después de la interrupción por el adaptador simple 3 y después de la ligación del adaptador de brecha; el carril 4 es el producto de hibridación a 55 °C después de la interrupción por el adaptador simple 3 y después de la ligación del adaptador de brecha; el carril 5 es el producto de hibridación a 60 °C después de la interrupción por el adaptador simple 1 y después de la ligación del adaptador de brecha; el carril 6 es el producto de hibridación a 55 °C después de la interrupción por el adaptador simple 1 y después de la ligación del adaptador de brecha; el carril 7 es el producto de hibridación a 60 °C después de la interrupción por adaptadores dobles y después de la PCR directa; el carril 8 es el producto de hibridación a 55 °C después de la interrupción por adaptadores dobles y después de la PCR directa; M1 es el marcador de ADN DL2000; M2 es el marcador de ADN de 50 pb; N es el control negativo.

50 La Figura 3 es un diagrama de calidad de bases mediante la secuenciación del método de ligación del Ejemplo 1 de la presente invención;

55 La Figura 4 es el resultado de la electroforesis en gel del producto de PCR después de la interrupción de un ácido nucleico por el complejo de transposasa de adaptador simple con el adaptador núm. 1 y después de la introducción del adaptador núm. 2 en el Ejemplo 1 de la presente invención, en donde D2000 es el carril del marcador de peso de ADN; el carril 1 es el resultado después del tratamiento con 2 µl de proteasa + Tritón-X100 al 1 %; el carril 2 es el resultado después del tratamiento con tampón NT + Tritón-X100 al 1 %; el carril 3 es el resultado después del tratamiento con SDS al 1 % + Tritón-X100 al 1 % + Tween-20 al 0,5 %; el carril 4 es el resultado después del

60

65

tratamiento con 2 μ l de proteasa + EDTA 14 mM + Tritón-X100 al 1 %; el carril 5 es el resultado después del tratamiento con PBI 1x, esferas Ampure XP 1,3x; el carril 6 es el resultado de un control negativo (sin plantilla).

Descripción detallada de la invención

La invención se describirá ahora con más detalle mediante ejemplos específicos. A menos que se especifique de otro modo, las técnicas usadas en los ejemplos a continuación son técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica; los instrumentos y reactivos usados son accesibles para los expertos en la técnica a través de accesos públicos tales como accesos comerciales, etcétera.

Los términos usados en la presente invención se exponen de la siguiente manera: el primer adaptador se denomina adaptador núm. 1 en una modalidad específica; el segundo adaptador se denomina adaptador núm. 2 o adaptador de brecha en una modalidad específica; el primer reactivo se denomina reactivo núm. 1 en una modalidad específica; y el segundo reactivo se denomina reactivo núm. 2 en una modalidad específica.

Con referencia a la Figura 1, el flujo de operación del método de la presente invención comprende principalmente: (1) un adaptador núm. 1 donde una secuencia de modificación específica insertada por medio de una transposasa se usa para interrumpir aleatoriamente secuencias de ácidos nucleicos, tales como secuencias genómicas, secuencias de amplificación del genoma completo o secuencias de productos de PCR, etcétera, en donde ambos extremos del ADN interrumpido se ligan al primer adaptador y forman una brecha de delección de 9 bases nucleotídicas; (2) eliminar la influencia de la transposasa en el sistema en una reacción de continuación por medio de purificación o tratamiento con reactivo químico; (3) introducir un adaptador núm. 2 por medio de la ligación del adaptador núm. 2 en la brecha de delección de 9 bases nucleotídicas, para modificar la secuencia de bases del adaptador adyacente a la secuencia objetivo fragmentada, de modo que las secuencias en ambos lados de la secuencia objetivo sean completamente diferentes, en donde en una permanece la secuencia del adaptador núm. 1 que contiene la secuencia de identificación de transposasa, mientras que la otra es un segundo adaptador diseñado de forma completamente arbitraria.

En la presente descripción, se usó un kit de transposasa de producción nacional (serie S50 del kit Truprep de Nanjing Nuoweizan Ltd.) para llevar a cabo el siguiente experimento. El kit contiene dos dosis, respectivamente, de 5 ng de ADN genómico y 50 ng de ADN genómico.

En la presente descripción se diseñó una variedad de secuencias adaptadoras (el adaptador núm. 1) para la inserción, y una transposasa y dichas secuencias adaptadoras para la inserción se usaron para preparar el complejo de transposasa.

Ejemplo 1

En este ejemplo, primeramente se interrumpieron 5 ng o 50 ng de ADN genómico de alta calidad con el complejo de inserción de transposasa; los adaptadores núm. 1 libres no insertados se eliminaron después de la purificación con esferas magnéticas o la purificación en columna; luego se ligó, de acuerdo con la invención, un adaptador núm. 2 (un adaptador de brecha) y los adaptadores núm. 2 libres se eliminaron por purificación, y así se construyó una secuencia genómica lineal con secuencias adaptadoras diferentes en ambos extremos; se realizó una amplificación por PCR mediante el uso de cebadores de PCR dirigidos respectivamente al adaptador núm. 1 y al adaptador núm. 2, lo que aumentó la cantidad de producto de PCR con secuencias adaptadoras diferentes en ambos extremos.

Una aplicación del producto de PCR de este ejemplo es mediante el marcaje de los cebadores de PCR de una manera marcada con biotina, y se obtiene una molécula monocatenaria de una secuencia particular, y se prepara una molécula cíclica monocatenaria mediante una ciclación monocatenaria o mediante una ciclación con una secuencia de ácido nucleico corta como una secuencia mediada por un puente. La molécula cíclica monocatenaria formada puede usarse para la preparación de nanoesferas de ADN sólidas y densas.

Se diseñaron y fabricaron múltiples pares de secuencias cebadoras (secuencia A y secuencia B) con una secuencia de identificación de transposasa de 19 pb, para la preparación de un adaptador simple (el adaptador núm. 1) para la inserción y se evaluaron tres adaptadores simples diferentes (es decir, secuencia del adaptador simple 1, secuencia del adaptador simple 2 y secuencia del adaptador simple) y una secuencia de adaptador doble estándar (secuencia A + secuencia B; secuencia A + secuencia C) en el presente ejemplo.

En donde se introduce un dUTP en una cadena (cadena A) de la secuencia del adaptador simple 1 para la digestión posterior de los adaptadores en exceso; se introduce un par de bases en el exterior de la secuencia de identificación de transposasa de 19 pb de la secuencia del adaptador simple 2, en donde la base del extremo 3' es una base modificada con didesoxi; la secuencia bicatenaria completa de la secuencia del adaptador simple 3 consiste en una secuencia completa, que es internamente complementaria para formar una secuencia bicatenaria reticulada por un enlace 3'-5' fosfodiéster. Además, los modos de modificación de los tres tipos de adaptadores mencionados anteriormente tienen al menos una cadena que contiene una modificación didesoxi en el extremo 3', lo que ayuda a evitar la autoligación del adaptador núm. 1 y su interligación con el adaptador núm. 2. Cada una de las secuencias del primer adaptador se muestra a continuación:

ES 2 821 434 T3

Secuencia A del adaptador simple 1:
 CTGTCUCTTAUACACATC **ddT** (SEQ ID NO: 1);
 Secuencia B del adaptador simple 1:
 GCTTCGACTGGAGACAGATGTGTATAAGAGACAG (SEQ ID NO: 2);
 5 Secuencia A del adaptador simple 2:
GCTGTCTCTTATACACATC **ddT** (SEQ ID NO: 3);
 Secuencia B del adaptador simple 2:
 GCTTCGACTGGAGACAGATGTGTATAAGAGACAG **ddC** (SEQ ID NO: 4);
 10 Secuencia del adaptador simple 3:

GCTTCGACTGGAGACAGATGTGTATAAGAGACAGCTGTCTCTTATAC
ACATC ddT (SEQ ID NO: 5);

15 Secuencia A de adaptadores dobles:
 CTGTCTCTTATACACATCT (SEQ ID NO: 6);
 Secuencia B de adaptadores dobles:
 TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG (SEQ ID NO: 7);
 20 Secuencia C de adaptadores dobles:
 GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG (SEQ ID NO: 8).

2. Cada par de secuencias de adaptador simple se diluyó a 100 µM, se mezcló completamente y se centrifugó, se hibridó para formar el adaptador núm. 1 (se almacenó a -20 °C) en un instrumento de PCR de acuerdo con el siguiente procedimiento (Tabla 1), para la preparación del complejo de inserción. Las secuencias A, B y C de los adaptadores dobles se diluyeron a 100 µM, se combinó secuencia A + secuencia B, se combinó secuencia A + secuencia C, se mezclaron completamente y se centrifugaron, se hibridaron para formar el adaptador núm. 1 (se almacenó a -20 °C) en un instrumento de PCR de acuerdo con el siguiente procedimiento (Tabla 1), para la preparación del complejo de inserción.

Tabla 1

Temperatura	Tiempo
75 °C	15 min
60 °C	10 min
50 °C	10 min
40 °C	10 min
25 °C	30 min
Tapa caliente a 105 °C	

3. El adaptador núm. 1 y la transposasa se insertaron en un complejo de inserción de transposasa de acuerdo con el siguiente sistema (Tabla 2), después de golpear suavemente 20 veces e incubar 1 hora a 30 °C, se completó la inserción del complejo. El complejo se almacenó a -20 °C.

Tabla 2

Componente	Contenido
Transposasa	85 µl
Adaptador núm. 1	30 µl
Tampón de acoplamiento	85 µl
Total	200 µl

4. Se mezclaron 50 ng de genoma de alta calidad y complejo de transposasa de acuerdo con el siguiente sistema (Tabla 3), después de mezclar suavemente 20 veces e incubar durante 10 minutos a 55 °C, y luego enfriar a 4 °C, se completa la interrupción del genoma.

Tabla 3

Componente	Contenido
Agua	5 µl
tampón de interrupción 5×	2 µl
ADNg (50 ng/µl)	1 µl
Complejo de transposasa	2 µl
Total	10 µl

5. La purificación se llevó a cabo de acuerdo con los dos métodos siguientes. Método 1: Se añadió 1 volumen de PBI (kit de purificación de PCR de Qiagen) y se mezcló uniformemente y se purificó con esferas Ampure XP 1,3x (operación automatizada); Método 2: Purificación con columna de PCR de QIAGEN. Después de la purificación, el producto se disolvió con agua pura.

6. En cuanto al adaptador simple 1, después de la interrupción, se añadió la enzima USER para digerirlo, y luego se llevó a cabo una purificación similar a las etapas anteriores, y el sistema de reacción fue el siguiente (Tabla 4):

Tabla 4

Componente	Contenido
ADN	10 µl
Tampón 10×	2 µl
Enzima USER	1 µl
Agua	7 µl
Total	20 µl

7. El producto después de la purificación se somete a la ligación de un adaptador de brecha (es decir, el adaptador núm. 2) de acuerdo con el siguiente sistema (Tabla 5), la ligación se completó después de la incubación durante 60 minutos a 25 °C.

Tabla 5

Componente	Contenido
Agua	8 µl
tampón de ligación 3×	20 µl
Adaptador núm. 2 (5 µM)	10 µl
Ligasa	2 µl
ADN	20 µl
Total	30 µl

Nota: Las secuencias del adaptador núm. 2 son las siguientes:
 Secuencia A del adaptador núm. 2:
 p AAGTCGGAGGCCAAGCGGTCGT ddC (SEQ ID NO: 9);
 Secuencia B del adaptador núm. 2:
 TTGGCCTCCGACT ddT (SEQ ID NO: 10); en donde p representa una modificación de fosforilación 5' terminal y dd representa una modificación didesoxi del extremo 3'.

8. En cuanto al producto, después de la ligación la purificación se llevó a cabo de acuerdo con los dos métodos siguientes. Método 1: Se añadió 1 volumen de PBI (kit de purificación de PCR de Qiagen) y se mezcló uniformemente y se purificó con esferas Ampure XP 1,3x (operación automatizada); Método 2: Purificación con columna de PCR de QIAGEN. Después de la purificación, el producto se disolvió con agua pura.

9. La amplificación por PCR se llevó a cabo de acuerdo con el sistema de reacción de PCR (Tabla 6) y las condiciones de reacción (Tabla 7) siguientes.

Tabla 6

	Componente	Contenido
5	Producto de ADN después de la purificación	30 µl
	Tampón de PCR 5×	10 µl
	dNTP 10 mM	1 µl
10	Cebador 1	2 µl
	Cebador 2	2 µl
	Enzima de PCR	1 µl
	Agua pura	4 µl
15	Total	50 µl
20	Nota: los cebadores de PCR son los siguientes: Cebador 1 del adaptador simple: AGACAAGCTCGAGCTCGAGCGATCGGGCTTCGACTGGAGAC (SEQ ID NO: 11); Cebador 2 del adaptador simple: TCCTAAGACCGCTTGGCCTCCGACT (SEQ ID NO: 12); Cebador 1 de adaptadores dobles: AATGATACGGCGACCACCGA (SEQ ID NO: 13); Cebador 2 de adaptadores dobles: CAAGCAGAAGACGGCATAACGA (SEQ ID NO: 14).	
25		

Tabla 7

	Temperatura	Tiempo	Ciclo
30	72 °C	3 min	1 Ciclo
	98 °C	30 s	1 Ciclo
35	98 °C	10 s	15 Ciclos
	60 °C/55 °C	30 s	
	72 °C	3 min	
40	72 °C	5 min	1 Ciclo
	4 °C	∞	-

10. Los resultados de la prueba del producto de PCR después de la ligación del adaptador de brecha (adaptador núm. 2) se muestran en la Figura 2 y los resultados de la determinación de la concentración del producto de PCR son los siguientes (Tabla 8):

Tabla 8

Adaptador	Adaptador simple-2	Adaptador simple-2	Adaptador simple-3	Adaptador simple-3	Adaptador simple-1	Adaptador simple-1	Control negativo	Adaptadores dobles	Adaptadores dobles
Hibridación	60 °C	55 °C	60 °C	55 °C	60 °C	55 °C	-	60 °C	55 °C
Concentración del producto (ng/µl)	11.8	13.8	9.6	10.1	8.24	10.3	1.64	29.8	25.8

Los resultados de la PCR muestran que el método de la presente invención ha introducido con éxito el adaptador de brecha.

11. Después de la separación monocatenaria del producto de PCR, la banda objetivo se somete a una ciclación monocatenaria, de acuerdo con los medios comunes de secuenciación actuales, lo que da como resultado moléculas de ADN circular monocatenario para la preparación de nanoesferas de ADN mediante la replicación de anillo rodante

en una plataforma de secuenciación del genoma completo y para la secuenciación por ligación. La operación de separación y ciclación monocatenaria es la siguiente:

(1) El producto de PCR se sometió a desnaturalización térmica a 95 °C e inmediatamente después a un baño de hielo durante 5 min;

5 (2) 3 pmol de moléculas monocatenarias del producto de PCR que se desnaturalizaron se sometieron a ciclación monocatenaria de acuerdo con el siguiente sistema de reacción (Tabla 9);

Tabla 9

10	Componente	Contenido
	Secuencias mediadoras (20 µM)	20 µl
	Agua pura	15 8,3 µl
15	tampón de ligación 10×	35 µl
	ATP 100 mM	3,5 µl
	Ligasa	1,2 µl
20	Producto de PCR después de la desnaturalización	112 µl
	Total	350 µl
25	Nota: Las secuencias mediadoras son las siguientes: Secuencia mediadora para el adaptador simple: TCGAGCTTGTCTTCCTAAGACCGC (SEQ ID NO: 15); Secuencia mediadora para adaptadores dobles: CGCCGTATCATTCAAGCAGAAGAC (SEQ ID NO: 16).	

30 (3) Se digiere la molécula monocatenaria sin ciclación, se configura un sistema de reacción de acuerdo con el siguiente sistema (Tabla 10), después de mezclar y centrifugar brevemente, se añade 20 µl al sistema de reacción anterior, con incubación durante 30 minutos a 37 °C, seguido de purificación con esferas Ampure XP 1,8x para preparar una molécula cíclica monocatenaria para la secuenciación.

Tabla 10

35	Componente	Contenido
	tampón de ligación 10×	3,7 µl
	Exonucleasa I 20 U/µl	11,1 µl
40	Exonucleasa III 100 U/µl	5,2 µl
	Total	20 µl

45 12. La secuenciación puede llevarse a cabo desde los extremos 5' y 3', y el fragmento objetivo con secuencias diferentes en ambos extremos tiene una secuencia de identificación de transposasa de 19 pb en un solo extremo, para evitar así la hibridación específica de la secuencia de identificación de transposasa de 19 pb en ambos extremos y la competencia con los adaptadores de secuenciación, y así mejorar en gran medida la calidad de la secuenciación, los resultados se muestran en la Figura 3. Los datos mostrados en la Figura 3 están en su mayoría entre 80 y 90, generalmente por encima de 75, lo cual es aceptable, mientras que los datos de los resultados de secuenciación convencional con la secuencia de identificación de transposasa de 19 pb en ambos extremos generalmente no son tan altos, incluso entre 30 y 40, lo que indica que la sonda de secuenciación complementaria a la secuencia de 19 pb puede aparearse bien con la plantilla de secuenciación, es decir, para resolver el efecto de las dos secuencias complementarias inversas de 19 pb sobre la secuenciación.

55 Ejemplo 2

60 En este ejemplo, primeramente, se interrumpieron 50 ng de ADN genómico de alta calidad con un complejo de inserción de transposasa, seguido de tratamiento con proteasa, SDS, NT o una composición de proteasa y EDTA para eliminar la proteína transposasa unida al ADN; y luego, después de la ligación de un adaptador de brecha, se amplificó directamente mediante el uso de cebadores de PCR, con adición de una concentración determinada de Tritón X-100 al sistema de reacción de PCR.

65 1. Se diseñó y preparó un par de secuencias cebadoras con una secuencia de identificación de transposasa de 19 pb, secuencia A y secuencia B, para la preparación del adaptador núm. 1 en forma de adaptador simple:

Secuencia A del adaptador núm. 1 en forma de adaptador simple:

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG (SEQ ID NO: 17);
 Secuencia B del adaptador núm. 1 en forma de adaptador simple:
 CTGTCTCTTATACACATC ddT (SEQ ID NO: 18, dd representa una modificación didesoxi).

5 2. La secuencia A y la secuencia B se diluyeron a 100 μ M, se mezclaron completamente y se centrifugaron, se hibridaron para formar el adaptador núm. 1 (se almacenó a -20 °C) en un instrumento de PCR de acuerdo con el siguiente procedimiento (Tabla 11), para la preparación del complejo de inserción.

Tabla 11

10

Temperatura	Tiempo
75 °C	15 min
60 °C	10 min
50 °C	10 min
40 °C	10 min
25 °C	30 min
Tapa caliente a 105 °C	

15

20

25

3. El adaptador núm. 1 y la transposasa se insertaron en un complejo de inserción de transposasa de acuerdo con el siguiente sistema (Tabla 12), después de golpear suavemente 20 veces e incubar 1 hora a 30 °C, se completó la inserción del complejo. El complejo se almacenó a -20 °C.

Tabla 12

30

Componente	Contenido
Transposasa	85 μ l
Adaptador núm. 1	30 μ l
Tampón de acoplamiento	85 μ l
Total	200 μ l

35

40

4. Se mezclaron 50 ng de genoma de alta calidad y complejo de transposasa de acuerdo con el siguiente sistema (Tabla 13), después de mezclar suavemente 20 veces e incubar durante 10 minutos a 55 °C, y luego enfriar a 4 °C, se completa la interrupción del genoma.

Tabla 13

45

Componente	Contenido
Agua	5 μ l
tampón de interrupción 5 \times	2 μ l
ADNg (50 ng/ μ l)	1 μ l
Complejo de transposasa	2 μ l
Total	10 μ l

50

55

5. Los métodos de procesamiento de muestras después de la interrupción comprenden las siguientes opciones. Método 1: Se añadió 0,1-5 μ l de proteasa (750 mAU/ml), en este ejemplo se prefirió 2 μ l de proteasa, y al mismo tiempo se evaluó 0,1 μ l de proteasa y 5 μ l de proteasa, respectivamente. Método 2: adición de la concentración final de tampón comercial NT 1 \times (un reactivo similar en el kit Truprep de la serie S5). Método 3: adición de 0,01 % a 1,5 % (en volumen) de SDS, preferentemente 1 % (en volumen) de SDS en este ejemplo, y las concentraciones de 0,01 % (en volumen) y 1,5 % (en volumen) se evaluaron por separado. Método 4: Se añadió 0,1-5 μ l de proteasa (750 mAU/ml) y luego se añadió EDTA a una concentración final de 1-50 mM. Este ejemplo prefirió 2 μ l de proteasa y una concentración final de EDTA 14 mM, y al mismo tiempo se evaluó 0,1 μ l de proteasa más EDTA 1 mM y 5 μ l de proteasa más EDTA 50 mM. Método 5: adición de 1 volumen de PBI (un reactivo comercial en el kit de purificación de PCR de Qiagen), después de mezclar uniformemente, purificar con esferas Ampure XP 1,3x y disolver con agua pura.

60

6. En el producto después del tratamiento anterior, se añadió 0,1 %-2 % (en volumen) de Tritón-X 100, preferentemente 1 % (en volumen) en este ejemplo, mientras se usó 0,1 % (en volumen) y 2 % (en volumen) de Tritón-X100 para su evaluación.

5 7. El producto tratado con el Tritón-X100 anterior se ligó a un adaptador de brecha (el adaptador núm. 2) de acuerdo con el siguiente sistema (Tabla 14) a 25 °C durante 60 minutos, se completó la ligación del adaptador.

Tabla 14

Componente	Contenido
10 Agua	8 µl
tampón de ligación 3×	20 µl
adaptador (5 µM)	10 µl
15 Ligasa	2 µl
ADN	20 µl
Total	30 µl
20 Nota: Secuencia A del adaptador núm. 2: 5'-pAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCGT ddC-3' (SEQ ID NO: 9); Secuencia B del adaptador núm. 2: 5'-TTGGCCTCCGACT ddT-3' (SEQ ID NO: 10)(p representa modificación de fosforilación, dd representa modificación didesoxi).	

25 8. La amplificación por PCR se llevó a cabo de acuerdo con el sistema de reacción de PCR (Tabla 15) y las condiciones de reacción (Tabla 16) siguientes. Para el grupo experimental con adición de SDS, se añadió una concentración específica de Tween-20 al sistema de PCR para aumentar parcialmente la eficiencia de la PCR. La concentración de trabajo de Tween-20 pudo ajustarse a concentraciones diferentes, tales como 0,1 % -2 % (en volumen), preferentemente 0,5 % (en volumen) en este ejemplo, mientras se evaluaron las concentraciones de trabajo de 0,1 %
 30 (en volumen) y 2 % (en volumen).

Tabla 15

Componente	Contenido
Muestras de ADN procesadas	30 µl
Tampón de PCR 5x	10 µl
dNTP 10 mM	1 µl
Cebador 1	2 µl
Cebador 2	2 µl
Enzima de PCR (ADN polimerasa)	1 µl
Agua pura	4 µl
Total	50 µl

Nota:
 Cebador 1 del adaptador núm. 1 en forma de adaptador simple:
AGACAAGCTCGAGCTCGAGCGATCGGGATCTACACGACTCACTGATC
GTCGGCAGCGTC (SEQ ID NO: 19);
 Cebador 2 del adaptador núm. 1 en forma de adaptador simple:
 TCCTAAGACCGCTTGGCCTCCGACT (SEQ ID NO: 20).

Tabla 16

Temperatura	Tiempo	Ciclo
72 °C	3 min	1 Ciclo
98 °C	30 s	1 Ciclo
98 °C	10 s	15 Ciclos
60 °C	30 s	
72 °C	3 min	
72 °C	5 min	1 Ciclo
4 °C	∞	-

9. En la Figura 4 se muestra el resultado de la detección del producto de PCR después de la interrupción por el complejo de inserción con adaptador simple y la ligación del adaptador de brecha, y en la Tabla 17 se muestran los resultados de la determinación de la concentración del producto de PCR.

Tabla 17

Grupo	Método de procesamiento después de la interrupción	Concentración del producto de PCR (ng/μl)	Observaciones (Figura 4)
1	2 μl de proteasa + Tritón-X100 al 1 %	11.4	Carril 1
2	Tampón NT + Tritón-X100 al 1 %	13	Carril 2
3	SDS al 1 % + Tritón-X100 al 1 % + Tween-20 al 0,5 %	12.4	Carril 3
4	2 μl de proteasa + EDTA 14 mM + Tritón-X100 al 1 %	12	Carril 4
5	PBI 1×, esferas Ampure XP 1,3×	13.5	Carril 5
6	0,1 μl de proteasa + EDTA 1 mM + Tritón-X 100 al 0,1 %	6.2	-
7	5 μl de proteasa + 50 mM EDTA + Tritón-X100 al 2 %	10.3	-
8	SDS al 0,01 % + Tritón-X100 al 0,1 % + Tween-20 al 0,1 %	5.3	-
9	SDS al 1,5 % + Tritón-X100 al 2 % + Tween-20 al 2 %	9.1	-
10	0,1 μl de proteasa + Tritón-X100 al 0,1 %	6	-
11	5 μl de proteasa + Tritón-X100 al 2 %	10.1	-

Listado de secuencias

<110> BGI SHENZHEN CO., LIMITADA

<120> método para romper un ácido nucleico y añadir un adaptador por medio de Transposasa y reactivo

<130> P49118EP-PCT

<140> EP14903871.3

<141> 2014-10-14

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia A del adaptador simple 1

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (19)..(19)
 <223> modificación didesoxi, modificación didesoxi del extremo 3'

15 <400> 1
 ctgtcuctta uacacatct 19

<210> 2
 <211> 34
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia B del adaptador simple 1

25 <400> 2
 gcttcgactg gagacagatg tgtataagag acag 34

30 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia A del adaptador simple 2

<220>
 <221> base_modificada
 40 <222> (20)..(20)
 <223> modificación didesoxi

<400> 3
 45 gctgtctctt atacacatct 20

<210> 4
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia B del adaptador simple 2

<220>
 <221> base_modificada
 55 <222> (35)..(35)
 <223> modificación didesoxi, modificación didesoxi del extremo 3'

<400> 4
 60 gcttcgactg gagacagatg tgtataagag acagc 35

<210> 5
 <211> 53
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del adaptador simple 3

<220>
 5 <221> base_modificada
 <222> (53)..(53)
 <223> modificación didesoxi, modificación didesoxi del extremo 3'

<400> 5
 10 gcttcgactg gagacagatg tgtataagag acagctgtct cttatacaca tct 53

<210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia A de adaptadores dobles

<400> 6
 20 ctgtctctta tacacatct 19

<210> 7
 <211> 33
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia B de adaptadores dobles

<400> 7
 30 tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga cag 33

<210> 8
 <211> 34
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 40 <223> Secuencia C de adaptadores dobles

<400> 8
 gtctcgtggg ctccgagatg tgtataagag acag 34

<210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> Secuencia A del adaptador núm. 2

<220>
 <221> base_modificada
 55 <222> (1)..(1)
 <223> modificación de fosforilación, modificación de fosforilación del extremo 5'

<220>
 <221> base_modificada
 60 <222> (23)..(23)
 <223> modificación didesoxi, modificación didesoxi del extremo 3'

<400> 9
 65 aagtcggagg ccaagcggtc gtc 23

<210> 10

<211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia B del adaptador núm. 2

<220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (14)..(14)
 <223> modificación didesoxi, modificación didesoxi del extremo 3'

<400> 10
 ttggcctccg actt 14
 15

<210> 11
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador 1 del adaptador simple

<400> 11
 25 agacaagctc gagctcgagc gatcgggctt cgactggaga c 41

<210> 12
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador 2 del adaptador simple

35 <400> 12
 tcctaagacc gcttgacctc cgact 25

<210> 13
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador 1 de adaptadores dobles

45 <400> 13
 aatgatacgg cgaccaccga 20

<210> 14
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Cebador 2 de adaptadores dobles

<400> 14
 caagcagaag acggcatacg a 21

60 <210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Secuencia mediadora para el adaptador simple

<400> 15
 tcgagctgt cttctaaga ccgc 24

5 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia mediadora para adaptadores dobles

<400> 16
 cgccgtatca ttcaagcaga agac 24

15 <210> 17
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia A del adaptador núm. 1 en forma de adaptador simple

<400> 17
 25 tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga cag 33

<210> 18
 <211> 19
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia B del adaptador núm. 1 en forma de adaptador simple

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (19)..(19)
 <223> modificación didesoxi, modificación didesoxi del extremo 3'

<400> 18
 40 ctgtctctta tacacatct 19

<210> 19
 <211> 59
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador 1 del adaptador núm. 1 en forma de adaptador simple

50 <400> 19
 agacaagctc gagctcgagc gatcgggatc tacacgactc actgatcgtc ggcagcgtc 59

<210> 20
 55 <211> 25
 <212> ADN
 <220>
 <223> Cebador 2 del adaptador núm. 1 en forma de adaptador simple

60 <400> 20
 tcctaagacc gcttggcctc cgact 25

REIVINDICACIONES

1. Un método para romper un ácido nucleico y añadir un adaptador por medio de una transposasa, que comprende las siguientes etapas:

5 interrumpir aleatoriamente un ácido nucleico mediante el uso de un complejo de inserción de transposasa, en donde el complejo de inserción de transposasa comprende una transposasa y un primer adaptador que comprende una secuencia de identificación de transposasa, y ambos extremos del ácido nucleico interrumpido se ligan por separado al primer adaptador para formar una brecha en cada extremo, en donde

10 el primer adaptador es un adaptador bicatenario;
 eliminar la transposasa en el sistema por medio de purificación, o disociación de la transposasa de una secuencia objetivo por desnaturalización o digestión de la transposasa por medio de tratamiento con reactivo químico;

15 ligar a un segundo adaptador en la brecha mediante el uso de una ligasa, en donde la secuencia del segundo adaptador es diferente a la del primer adaptador, en donde el segundo adaptador tiene una modificación que evita la autoligación, y la modificación en el segundo adaptador es una modificación didesoxi de la base 3' terminal, en donde el segundo adaptador es un adaptador bicatenario; y

20 realizar una reacción de PCR mediante el uso de cebadores dirigidos al primer adaptador y al segundo adaptador respectivamente, para obtener un producto cuyos dos extremos están ligados respectivamente a secuencias adaptadoras diferentes;
 en donde el primer adaptador tiene una modificación para evitar la autoligación y la interligación con el segundo adaptador, en donde la modificación del primer adaptador es una modificación didesoxi de la base 3' terminal.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en donde la modificación del primer adaptador también comprende cualquiera de las siguientes o una combinación de las mismas:

(a) introducción de un dUTP en una cadena del primer adaptador para la escisión enzimática posterior de los adaptadores en exceso; y

30 (b) introducción de un par de bases en el exterior de la secuencia de identificación de transposasa del primer adaptador.
3. El método de la reivindicación 1, en donde uno de los cebadores usados en la reacción de PCR es un cebador marcado con biotina terminal.

35
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la purificación es purificación con esferas magnéticas o una columna.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el reactivo químico comprende un primer reactivo y un segundo reactivo; en donde el primer reactivo comprende uno o más miembros del grupo que consiste en una solución de proteasa y una solución de SDS para romper el efecto de adsorción de la transposasa y la secuencia objetivo del ácido nucleico; y el segundo reactivo comprende una solución de Tritón-X100 para debilitar la influencia del primer reactivo en las reacciones enzimáticas posteriores.

40
6. El método de la reivindicación 5, en donde el primer reactivo comprende además un reactivo adicional que contiene EDTA.

45
7. El método de la reivindicación 6, en donde el segundo reactivo comprende además una solución de Tween-20.

Genoma, producto de amplificación del genoma completo o producto de PCR

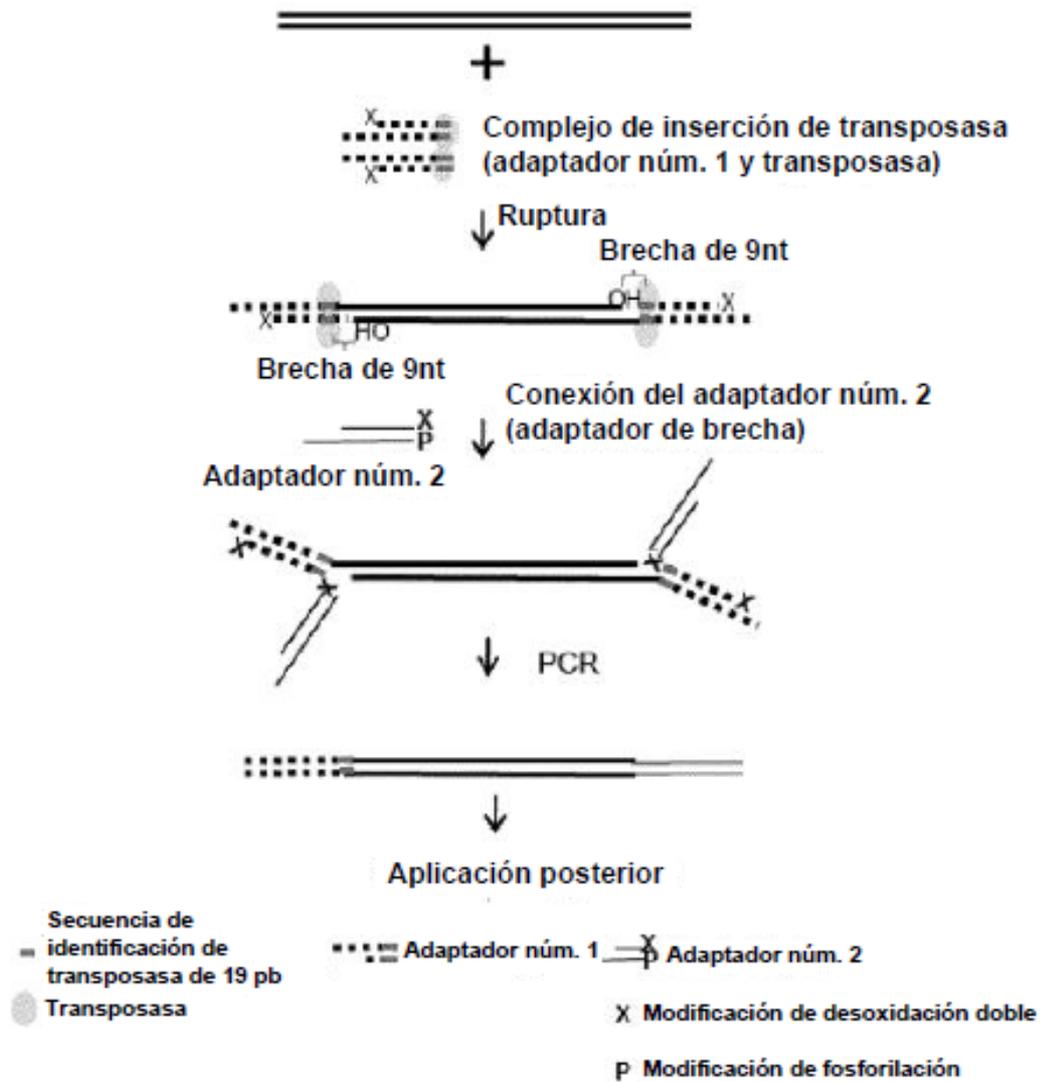


Figura 1

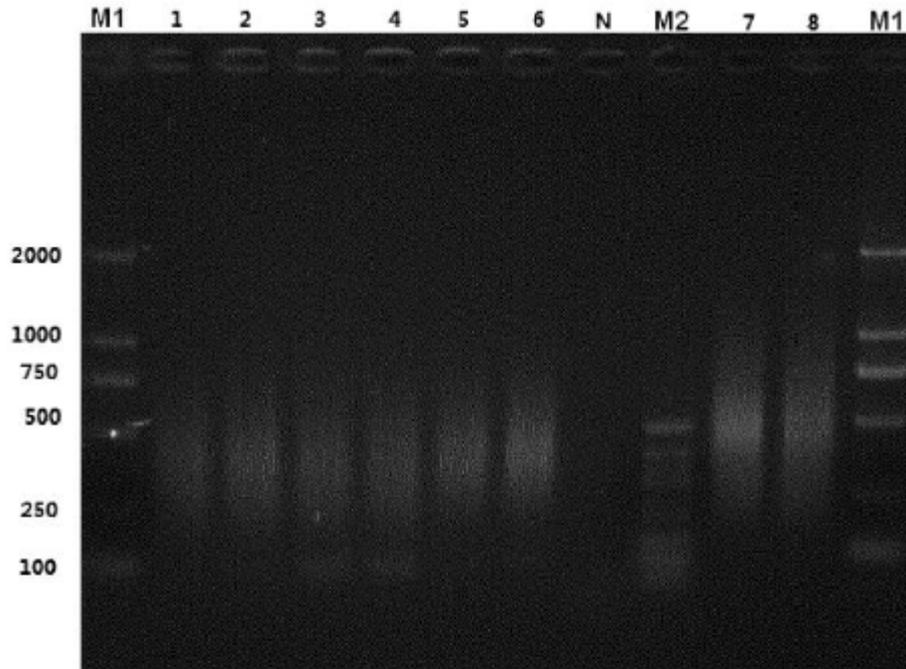


Figura 2

Muestra	Código de ident.	Carril (1)	ciclo del proceso											
			20	21	24	25	26	27	28	64	65	66	67	68
2	GS73029-FS3	1	78	82	80	83	83	84	84	84	87	90	90	87
		2	84	89	87	90	90	91	91	89	93	94	94	95
		3	83	89	87	90	91	91	91	89	94	94	95	95
		4	86	89	87	90	91	92	91	90	94	94	95	95

Figura 3

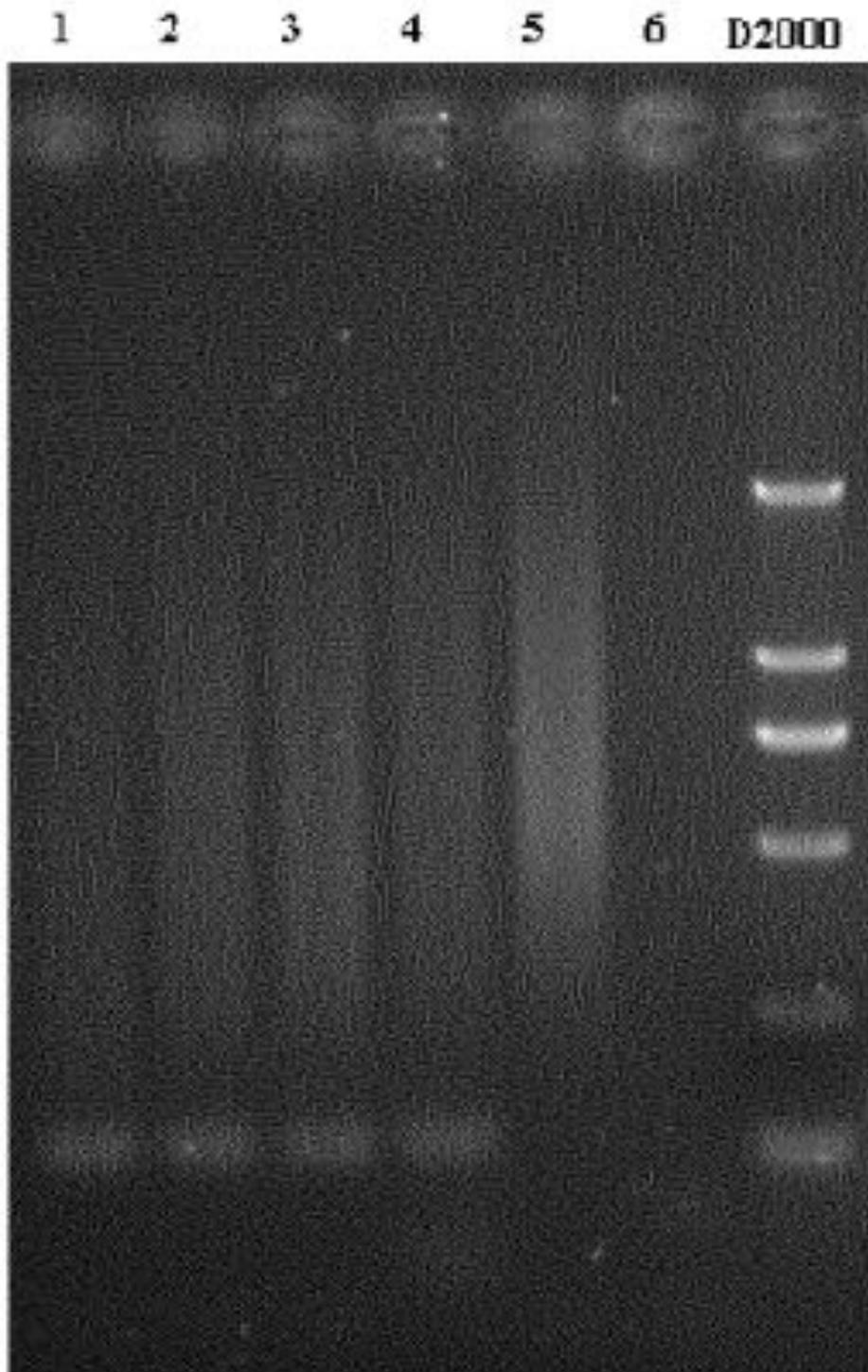


Figura 4