

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 411**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/66 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C40B 40/08 (2006.01)

C40B 50/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2011** **PCT/US2011/027753**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011** **WO11112718**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2011** **E 11754012 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017** **EP 2545183**

54 Título: **Producción de ácido nucleico circular monocatenario**

30 Prioridad:

09.03.2011 US 201113044221

10.03.2010 US 312332 P

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

25.07.2017

73 Titular/es:

IBIS BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
2251 Faraday Avenue Suite 150
Carlsbad, CA 92008, US

72 Inventor/es:

ESHOO, MARK W. y
PICURI, JOHN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 626 411 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).

Producción de ácido nucleico circular monocatenario**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de análisis de ácidos nucleicos y, más particularmente, a métodos para producir ácido nucleico circular monocatenario para mejorar la eficacia de las tecnologías de amplificación y secuenciación.

10

Antecedentes de la invención

Se ha descubierto que el ADN circular monocatenario es útil en muchas áreas diferentes de la biotecnología. Un uso importante es como sustrato para la replicación del ADN en círculo rodante. En este procedimiento, se mezcla un círculo monocatenario de ADN con una cadena corta de ADN de cebador complementario de cadena simple y se permite que las dos cadenas separadas se hibriden. Después de la adición de una ADN polimerasa, tal como el fragmento Klenow, la enzima utiliza como molde el círculo intacto y, después, se replica desde el extremo 5' de la cadena del cebador. Una vez que la enzima ha pasado alrededor del molde circular, se encuentra con el extremo 5' del cebador, que, a continuación, se desplaza desde la cadena del molde de modo que la enzima continúa moviéndose alrededor del molde circular mientras se genera que una sola cadena de ADN larga sin fragmentar. Tal cadena sencilla se ha denominado ADN concatenado monocatenario. Los productos circulares monocatenarios son ideales para su uso como sustrato en tales procesos. En última instancia, tales productos pueden producir en ADN concatenado monocatenario que tiene numerosos segmentos secuenciales diferentes que pueden actuar como sondas, sitios de detección o sitios de restricción para su procesamiento adicional.

25

Las bibliotecas de ADN circular monocatenario son también útiles para los métodos rápidos de secuenciación de ADN. Las tecnologías de secuenciación de ADN de molécula única en tiempo real (SMRT) tienen la capacidad de resecuenciar un único segmento de ADN bicatenario repetidamente usando una molécula de ADN circular monocatenario como molde. La pirosecuenciación es otro método de secuenciación rápida que se beneficiaría del uso de bibliotecas de ADN circular monocatenario (en, por ejemplo, la publicación PCT WO2009120372 se describen métodos SMRT y de pirosecuenciación).

30

El documento WO 2009/120372 muestra composiciones y métodos para la secuenciación de ácidos nucleicos que implican construcciones de molde que comprenden porciones bicatenarias en construcciones parcial o completamente contiguas, para proporcionar una determinación de secuencia redundante a través de la secuenciación de una o ambas secuencias sentido y antisentido.

35

El documento WO 2010/048605 enseña métodos, composiciones y kits para generar fragmentos de ADN marcados en 5' y 3' que comprenden el uso de una transposasa y un extremo de transposón para generar fragmentación extensiva y marcaje en 5' del ADN diana bicatenario *in vitro*.

40

Syed et al. (Nature Methods, October 2009, página i) describen un método basado en transposón para preparar bibliotecas fragmentadas y marcadas para secuenciación de próxima generación.

Bhasin et al. (Journal of Biological Chemistry, diciembre de 1999, 274:52, páginas 37021–37029) demuestra que las etapas químicas iniciales en la transposición de Tn5 dan como resultado una escisión de extremos romos del transposón a partir del ADN donante a través de un intermedio de horquilla.

45

La presente invención se refiere a métodos para producir ácido nucleico circular monocatenario.

50

Sumario de la invención

Un objeto de la invención es proporcionar un método rápido y sin sesgar para generar ácidos nucleicos circulares monocatenarios para su uso como moldes en aplicaciones tales como la secuenciación de ácidos nucleicos y la amplificación en círculo rodante de ácidos nucleicos.

55

Un objeto adicional de la invención es proporcionar un método para generar moléculas de ácido nucleico circular monocatenario usando procedimientos simplificados que sean susceptibles de adaptación dentro de dispositivos microfluidos.

60

La invención proporciona un método para generar ácido nucleico circular monocatenario a partir de una muestra del ácido nucleico diana, comprendiendo dicho método: (a) formar un complejo que comprende una transposasa y una pluralidad de polinucleótidos en horquilla, teniendo cada uno de dichos polinucleótidos en horquilla una región dúplex que comprende una secuencia de reconocimiento de la transposasa; (b) mezclar dicho complejo con dicho ácido nucleico diana, fragmentando de este modo dicho ácido nucleico diana y ligando dichos polinucleótidos en horquilla a dicho ácido nucleico diana, para formar fragmentos de ácido nucleico unidos en horquilla, teniendo cada

65

fragmento de ácido nucleico unido en horquilla una región del fragmento del ácido nucleico diana dúplex y un hueco del segmento de la base nucleotídica y su correspondiente polinucleótido en horquilla; (c) poner en contacto dichos fragmentos unidos a la horquilla con una ligasa, ligando de este modo las regiones del fragmento de ácido nucleico diana dúplex de dichos fragmentos unidos en horquilla para formar un ácido nucleico circular monocatenario que comprende un par de bucles opuestos y una región dúplex intermedia, comprendiendo dicha región dúplex un par de huecos del segmento de la base; y (d) poner en contacto dicho ácido nucleico circular monocatenario único de la etapa (c) con una polimerasa y nucleótidos trifosfatos, rellenando de este modo dichos huecos en el segmento de la base nucleotídica.

- 10 La invención también proporciona un método para preparar una biblioteca de ácido nucleico circular monocatenario que representa un genoma de un virus u organismo, comprendiendo dicho método: (a) formar un complejo que comprende una transposasa y una pluralidad de polinucleótidos en horquilla, teniendo cada uno de dichos polinucleótidos en horquilla una región dúplex que comprende una secuencia de reconocimiento de la transposasa; (b) mezclar dicho complejo con el ácido nucleico que representa dicho genoma, fragmentando de este modo dicho ácido nucleico y ligando dichos polinucleótidos en horquilla a dicho ácido nucleico, para formar fragmentos de ácido nucleico unidos en horquilla, teniendo cada fragmento de ácido nucleico unido en horquilla una región del fragmento del ácido nucleico diana dúplex y un hueco del segmento de la base nucleotídica y su correspondiente polinucleótido en horquilla; (c) poner en contacto dichos fragmentos unidos a la horquilla con una ligasa, ligando de este modo las regiones del fragmento de ácido nucleico diana dúplex de dichos fragmentos unidos en horquilla para formar un ácido nucleico circular monocatenario que comprende un par de bucles opuestos y una región dúplex intermedia, comprendiendo dicha región dúplex un par de huecos del segmento de la base; y (d) poner en contacto dicho ácido nucleico circular monocatenario único de la etapa (c) con una polimerasa y nucleótidos trifosfatos, rellenando de este modo dichos huecos en el segmento de la base nucleotídica.
- 25 Los métodos divulgados en el presente documento emplean polinucleótidos en horquilla y una transposasa para fragmentar segmentos de ácido nucleico y ligar los polinucleótidos en horquilla a los fragmentos. A continuación, se utiliza una polimerasa para rellenar los huecos del segmento de la base nucleotídica formados por el proceso de fragmentación. Estos métodos eliminan la necesidad de fragmentar el ácido nucleico genómico y esperar por las reacciones de unión lenta. Las reacciones de integración aleatoria de ácidos nucleicos catalizadas por ciertas transposasas proporcionan una generación no sesgada de fragmentos.

En el presente documento se divulga un método para generar ácido nucleico circular monocatenario a partir de una muestra de ácido nucleico diana. Se forma un complejo que comprende una transposasa y una pluralidad de polinucleótidos en horquilla con cada uno de los polinucleótidos en horquilla que tienen una región dúplex que comprende una secuencia de reconocimiento para la transposasa. El complejo se mezcla con el ácido nucleico diana, fragmentando de este modo el ácido nucleico diana y ligando los polinucleótidos en horquilla al ácido nucleico diana para formar fragmentos de ácido nucleico unidos en horquilla, teniendo cada uno un hueco del segmento de la base nucleotídica entre cada fragmento y su correspondiente polinucleótido en horquilla. Los fragmentos unidos en horquilla se ponen en contacto con una ligasa, ligando de este modo los fragmentos unidos en horquilla conjuntamente para formar un ácido nucleico circular monocatenario que comprende un par de bucles opuestos y una región dúplex intermedia que comprende un par de huecos del segmento de la base nucleotídica. A continuación, el ácido nucleico circular monocatenario simple se pone en contacto con una polimerasa y nucleótidos trifosfatos, llenando de este modo los huecos del segmento de la base nucleotídica.

45 En otro aspecto, se divulga un método para preparar una biblioteca de ácido nucleico circular monocatenario que representa un genoma de un virus u organismo. Se forma un complejo que comprende una transposasa y una pluralidad de polinucleótidos en horquilla, teniendo cada uno una región dúplex que comprende una secuencia de reconocimiento de la transposasa. El complejo se mezcla con el ácido nucleico que representa el genoma, fragmentando de este modo el ácido nucleico y ligando los polinucleótidos en horquilla al ácido nucleico para formar fragmentos de ácido nucleico unidos en horquilla, teniendo cada uno un hueco del segmento de la base nucleotídica entre cada fragmento y su correspondiente polinucleótido en horquilla. Los fragmentos unidos en horquilla se ponen en contacto con una ligasa, ligando de este modo los fragmentos unidos en horquilla conjuntamente para formar un ácido nucleico circular monocatenario que comprende un par de bucles opuestos y una región dúplex intermedia que comprende un par de huecos del segmento de la base nucleotídica. El ácido nucleico circular monocatenario simple se pone en contacto con una polimerasa y nucleótidos trifosfatos, llenando de este modo los huecos del segmento de la base nucleotídica.

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un kit para la preparación de ADN circular monocatenario. El kit comprende un polinucleótido en horquilla que comprende una secuencia de reconocimiento de la transposasa, una transposasa, una polimerasa y una ligasa.

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un sistema para generar ácido nucleico circular monocatenario a partir de un ácido nucleico diana. El sistema comprende una primera cámara de reacción provista de un primer conjunto de componentes de tampón de reacción configurado para la formación de un complejo entre una transposasa y una pluralidad de polinucleótidos en horquilla, teniendo cada uno de los polinucleótidos en horquilla una región dúplex que comprende una secuencia de reconocimiento de la transposasa. El sistema

comprende una segunda cámara de reacción provista de un segundo conjunto de componentes de tampón de reacción configurado para fragmentar el ácido nucleico y ligar los polinucleótidos en horquilla al ácido nucleico, para formar fragmentos de ácido nucleico unidos en horquilla, teniendo cada uno un hueco del segmento de la base nucleotídica entre cada fragmento y su correspondiente polinucleótido en horquilla. El sistema comprende además una tercera cámara de reacción provista de un tercer conjunto de componentes de tampón que es compatible con la ligasa, la polimerasa y los nucleótidos trifosfatos. El sistema comprende además un manipulador de líquido configurado para transferir alícuotas de soluciones desde la primera cámara de reacción a la segunda cámara de reacción y desde la segunda cámara de reacción a la tercera cámara de reacción.

En algunas realizaciones del sistema, se proporciona un módulo de purificación para purificar el ácido nucleico circular monocatenario. El módulo de purificación está en comunicación de manipulación de líquido con la tercera cámara.

En algunas realizaciones, el sistema se proporciona dentro de un chip microfluídico.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen además la etapa de calentar el ácido nucleico circular monocatenario para desnaturalizar la región dúplex intermedia. Otras etapas del método pueden incluir además la mezcla de los fragmentos unidos en horquilla con una quinasa antes o durante la etapa de llenado en los huecos del segmento de la base nucleotídica para fosforilar cualquier extremo 5' no fosforilado.

En ciertas realizaciones de los métodos y kits, la transposasa es transposasa MuA o transposasa Tn5. En realizaciones en las que la transposasa es transposasa Tn5, la secuencia de reconocimiento de la transposasa empleada puede ser la secuencia del extremo mosaico de 19 pares de bases del transposón Tn5. En otras realizaciones en las que la transposasa es transposasa MuA, la secuencia de reconocimiento de la transposasa utilizada puede ser la región R1 y / o R2 del transposón MuA.

En algunas realizaciones, la transposasa cataliza la integración aleatoria del polinucleótido en horquilla en el ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, la polimerasa carece de actividad exonucleasa 5'-3' y / o de actividad de desplazamiento de cadena.

En algunas realizaciones, la polimerasa es polimerasa de T4 o polimerasa de T7 y la ligasa es ligasa de T4 o ligasa de *E. coli*.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos en horquilla comprenden marcadores de secuenciación.

En ciertas realizaciones de los kits divulgados en el presente documento, se proporcionan instrucciones para llevar a cabo una serie de reacciones para producir ácido nucleico circular monocatenario. El kit puede usarse para producir una biblioteca de ácidos nucleicos circulares monocatenarios.

El ácido nucleico circular monocatenario producido de acuerdo con el método descrito en el presente documento se puede usar como molde para la amplificación o la secuenciación.

La biblioteca de ácidos nucleicos circulares monocatenarios producidos de acuerdo con el método descrito en el presente documento también se puede usar como molde para la amplificación o la secuenciación.

Breve descripción de los dibujos

El sumario anterior y la descripción detallada se entienden mejor cuando se leen conjuntamente con los dibujos adjuntos que se incluyen a modo de ejemplo y no a modo de limitación.

La figura 1 es una representación esquemática del proceso de obtención de ácido nucleico circular monocatenario de acuerdo con una realización.

La figura 2 es una representación de un sistema para producir ADN circular monocatenario de acuerdo con una realización.

Descripción detallada de realizaciones

I. General

La próxima generación de tecnologías de secuenciación rápida de ácidos nucleicos, tal como la secuenciación en tiempo real de una sola molécula, tienen la capacidad de resecuenciar un solo segmento de ADN bicatenario repetidamente usando una molécula de ADN circular monocatenario como molde (véase, por ejemplo, el documento WO2009120372, Caruccio et al., Nextera™ Technology for NGS DNA Library Preparation: Simultaneous Fragmentation and Tagging by In Vitro Transposition Epicentre Forum 2009, 16–3, 4–6). En la actualidad, las

bibliotecas de ADN que comprenden ADN circular monocatenario se producen usando métodos físicos para la fragmentación de ADN, tales como ultrasonidos, nebulización, entre otros. A esta etapa le sigue la selección de fragmentos de longitud apropiada y la realización del procesamiento enzimático para preparar la muestra para la secuenciación. Estos métodos físicos requieren grandes cantidades de ADN, del orden de cantidades de microgramos, y generalmente son ineficientes.

Se necesitan métodos para mejorar el proceso para preparar ácidos nucleicos circulares monocatenarios y bibliotecas de los mismos con el fin de acelerar el trabajo de procesamiento "preliminar" requerido para aprovechar las tecnologías de secuenciación rápida.

Los transposones se encuentran en todos los reinos biológicos y algunos realizan funciones especializadas. Por ejemplo, el genoma del bacteriófago Mu incluye un transposón que utiliza la transposición tanto para integrarse en el ADN de una nueva célula huésped como para replicarse antes de la lisis. Al igual que la mayoría de los reordenamientos del ADN, la transposición es un proceso complejo, de varias etapas que requiere numerosos elementos de secuencia de ADN. Los estudios del bacteriófago Mu han sido fundamentales para nuestra comprensión de los mecanismos fundamentales y las complejidades de la transposición del ADN.

El fago Mu codifica la transposasa MuA que transfiere el genoma de Mu de una localización de ADN (el donante de la transposición) a una nueva localización (el objetivo de la transposición). Durante la transposición, la transposasa realiza dos reacciones principales: la escisión del ADN y la transferencia de cadena del ADN. Durante la escisión, el ADN donante se corta dos veces, una vez en cada extremo 3' del genoma Mu. Durante la transferencia de la cadena, los extremos del transposón escindidos se insertan en los sitios vecinos en las dos cadenas diana.

Se necesita poca o ninguna información de la secuencia específica sobre el ADN diana, pero el ADN de Mu proporciona muchas señales de la secuencia para la transposición. Por ejemplo, los dos últimos nucleótidos en cualquiera de los extremos 3' del ADN de Mu, los sitios de escisión, tienen la secuencia 5'-CA. Asimismo, cerca de cada extremo del ADN de Mu hay tres sitios de reconocimiento, distintos de los sitios de escisión, que comparten una secuencia consenso de 22 pares de bases. Los sitios de reconocimiento se denominan R1, R2 y R3 en el extremo derecho y L1, L2 y L3 en el extremo izquierdo (figura 1). Los sitios de reconocimiento están unidos específicamente por el dominio N-terminal de MuA, mientras que los sitios de escisión deben acoplarse al sitio activo de la proteína, contenido en una región diferente de la proteína. Tanto las secuencias de reconocimiento como las secuencias de escisión de 5'-CA son necesarias para la transposición (Goldhaber-Gordon et al., J. Biol. Chem. 2002, 277, 7694-7702).

Otro ejemplo de una transposasa es la transposasa Tn5, que se ha adaptado como reactivo de biología molecular (transposasa EZ-Tn5™) de Epicentre Biotechnologies Inc. (<http://www.epibio.com>). Las aplicaciones de este reactivo incluyen la inserción *in vivo* de un transposón EZ-Tn5 en el ADN clonado en vectores, tales como plásmidos, fosmidos, cósmidos o BAC, así como en la inserción *in vitro* en ADN lineal. El reactivo también se puede usar para la preparación de transposomas EZ-Tn5 para la transposición *in vivo* después de la electroporación en células vivas.

El reactivo de transposasa EZ-Tn5™ es una forma hiperactiva de la transposasa Tn5. La enzima de una sola subunidad altamente purificada puede usarse para insertar aleatoriamente (transponer o "saltar") cualquier transposón EZ-Tn5 en cualquier ADN diana *in vitro* con una eficacia de hasta 106 clones de inserción por reacción estándar. Cuando se incubó con un EZ-Tn5 Transposon™ en ausencia de Mg²⁺, se forma un complejo estable EZ-Tn5 Transposome™. El transposoma es tan estable que puede ser electroporado en células vivas. Una vez en la célula, el transposoma es activado por el Mg²⁺ intracelular y el componente de transposón EZ-Tn5 se inserta aleatoriamente en el ADN genómico del huésped.

Una reacción de transposición de EZ-Tn5 típica requiere cuatro componentes: (1) la transposasa EZ-Tn5 Transposase™; (2) un transposón EZ-Tn5; (3) un ADN diana; y (4) la presencia de Mg²⁺. La inserción altamente aleatoria de un transposón EZ-Tn5 en el ADN diana procede mediante un mecanismo de corte y pegado catalizado por la EZ-Tn5 Transposase™ y da como resultado una duplicación de 9 pb de la secuencia de ADN diana inmediatamente adyacente a ambos extremos del transposón.

II. Definiciones

Se entenderá también que la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir solo realizaciones particulares y no se desea que sea limitante. Además, a menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. Al describir y reivindicar la presente invención se usará la siguiente terminología y variantes gramaticales de acuerdo con las definiciones expuestas a continuación.

Un "polinucleótido en horquilla", como se usa en el presente documento, es un polinucleótido monocatenario que tiene dos regiones que son suficientemente complementarias como para hibridar entre sí. Preferiblemente, las dos regiones son completamente complementarias. Como se muestra en la figura 1A, un polinucleótido en horquilla está

compuesto por dos porciones: una región “tallo” y una región “tapa” o “bucle”. En la región “tallo”, las bases complementarias se aparean en un dúplex antiparalelo típico. Si las dos porciones complementarias del polinucleótido están separadas por bases que no forman una estructura complementaria, las bases forman un bucle monocatenario del extremo del tallo. Se dice que un polinucleótido monocatenario en el que las dos regiones complementarias comprenden toda la molécula es una “horquilla perfecta”. Una horquilla perfecta tiene una porción de “tapa” que generalmente tiene aproximadamente cuatro bases de longitud. Como se usa aquí, el término “bucle” también abarca una tapa a menos que se especifique lo contrario. El bucle puede contener de 3 a aproximadamente tres mil bases. También se incluye en la definición de polinucleótido en horquilla un polinucleótido circular que tiene dos regiones que son suficientemente complementarias que hibridan entre sí. En este caso hay una porción de bucle en ambos extremos de la porción de tallo bicatenaria.

Los nucleótidos en la porción de doble cadena de la horquilla generalmente superan en número a los nucleótidos en la porción de bucle. Por ejemplo, la porción bicatenaria de la horquilla puede comprender aproximadamente el 60 % o más de los nucleótidos. En algunas aplicaciones, la porción bicatenaria de la horquilla puede comprender más de aproximadamente el 90 % de los nucleótidos y, a veces, más del 99 % de los nucleótidos.

Un polinucleótido en horquilla que no es circular tiene un extremo 3' y un extremo 5'. La porción en el tallo de la horquilla con el extremo 3' se denomina “porción 3'”. La porción en el tallo de la horquilla con el extremo 5' se denomina “porción 5'”.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “transposasa” se refiere a una enzima que se une a los extremos de un transposón y cataliza el movimiento del transposón a otra parte del genoma mediante un mecanismo de corte y pegado o un mecanismo de transposición replicativo.

Como se usa en el presente documento, el término “transposón” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que puede moverse alrededor de diferentes posiciones dentro del genoma de una única célula en un proceso conocido como transposición. En el proceso, pueden causar mutaciones y cambiar la cantidad de ADN en el genoma. Los transposones también se han denominado genes saltadores y son ejemplos de elementos genéticos móviles. Existen varios elementos genéticos móviles y pueden agruparse en función de su mecanismo de transposición. Los elementos genéticos móviles de clase I, o retrotransposones, se copian a sí mismos transcribiéndolos primero a ARN, después se transcriben de forma inversa a ADN mediante la transcriptasa inversa y, a continuación, se insertan en otra posición en el genoma. Los elementos genéticos móviles de clase II se mueven directamente desde una posición a otra usando una transposasa para “cortar y pegar” dentro del genoma.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “ligasa” se refiere a una enzima que cataliza la unión de dos moléculas grandes formando un nuevo enlace químico, habitualmente acompañado de hidrólisis de un pequeño grupo químico colgante de una de las moléculas más grandes. Por ejemplo, la ADN ligasa es una enzima utilizada habitualmente en los laboratorios de biología molecular para unir fragmentos de ADN. Otros nombres habituales para las ligasas incluyen sintetasas, porque se utilizan para sintetizar moléculas nuevas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “polimerasa” se refiere a una enzima cuya función central está asociada con polímeros de ácidos nucleicos tales como ARN y ADN. La función primaria de una polimerasa es la polimerización de nuevo ADN o ARN contra un molde existente de ADN o ARN en los procesos de replicación y transcripción. En asociación con un grupo de otras enzimas y proteínas, usan nucleótidos libres (normalmente en forma de nucleótidos trifosfatos) en el disolvente y catalizan la síntesis de una secuencia polinucleotídica contra una cadena molde de nucleótidos usando interacciones de apareamiento de bases.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “procesividad” y “procesivo/a-2” se refieren a una medida del número promedio de nucleótidos añadidos por una enzima ADN polimerasa por asociación / disociación con el molde. Las ADN polimerasas asociadas con la replicación del ADN tienden a ser altamente procesivas, mientras que las asociadas con la reparación del ADN tienden a tener baja procesividad. Múltiples ADN polimerasas tienen funciones especializadas en el proceso de replicación del ADN. Por ejemplo, en *E coli*, que replica todo su genoma a partir de una sola horquilla de replicación, la ADN polimerasa Pol III es la enzima responsable principalmente de la replicación del ADN y forma un complejo de replicación con una procesividad extremadamente alta. La ADN Pol I relacionada tiene actividad de exonucleasa y sirve para degradar los cebadores de ARN usados para iniciar la síntesis de ADN. A continuación, la Pol I sintetiza los fragmentos cortos de ADN que hibridaron anteriormente con el fragmento de ARN. Por lo tanto, la Pol I es mucho menos procesiva que la Pol III porque su función principal en la replicación del ADN es crear muchas regiones de ADN cortas en lugar de unas pocas regiones muy largas.

Como se usa en el presente documento, el término “quinasa” se refiere a una enzima que transfiere grupos fosfato desde moléculas donantes de alta energía, tales como ATP, a sustratos específicos. El proceso se denomina fosforilación. Una alternativa al término “quinasa” es “fosfotransferasa”.

Como se usa en el presente documento, el término “exonucleasa” se refiere a una enzima que escinde los nucleótidos de uno en uno desde el extremo de una cadena polinucleotídica. Se produce una reacción de hidrólisis que rompe los enlaces fosfodiéster en los extremos 3' o 5'. Su pariente cercano es la endonucleasa, que escinde

enlaces fosfodiéster en el centro de una cadena polinucleotídica. El término relacionado “actividad exonucleasa” se refiere a la actividad catalítica de una exonucleasa.

Como se usa en el presente documento, el término “actividad de desplazamiento de cadena” se refiere a la capacidad de una enzima polimerasa para desplazar una cadena de un dúplex existente en el camino de síntesis de una nueva cadena. Por ejemplo, en la amplificación de desplazamiento múltiple, la reacción de amplificación se inicia cuando múltiples hexámeros del cebador se recolectan a el molde. Cuando la síntesis de ADN pasa al siguiente sitio de iniciación, la polimerasa desplaza la cadena que se sintetizó en ese sitio de iniciación y continúa su elongación de la cadena. Por ejemplo, la ADN polimerasa del fago bacteriano $\Phi 29$ es una enzima de polimerasa de alta procesividad con actividad de desplazamiento de cadena que puede producir ADN de 7 kb a 10 kb de longitud. La reacción puede llevarse a cabo en una condición de temperatura isotérmica moderada de 30 °C. Se ha utilizado activamente en la clonación libre de células, que es el método enzimático de amplificación del ADN *in vitro* sin necesidad de cultivo celular y extracción de ADN.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “microfluídica” se refiere a tecnologías que abordan el comportamiento, el control preciso y la manipulación de fluidos que están geométricamente restringidos a una escala submilimétrica. Es un campo multidisciplinario que mezcla ingeniería, física, química, microtecnología y biotecnología, con aplicaciones prácticas en el diseño de sistemas en los que se utilizarán tales pequeños volúmenes de fluidos.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “segmento”, “fragmento” y “porción”, cuando se usan en relación con polinucleótidos u oligonucleótidos de cualquier tipo, incluyendo los polinucleótidos en horquilla descritos en el presente documento, se refieren a una secuencia continua de residuos de nucleótidos, que forma una subpoblación de una secuencia más grande. Por ejemplo, si un ácido nucleico diana se somete a tratamiento con el complejo transposasa-polinucleótido en horquilla, los oligonucleótidos resultantes de tal tratamiento representarían segmentos o fragmentos del ácido nucleico diana de partida.

III. Descripción del proceso

Los polinucleótidos en horquilla usados como materiales de partida en los métodos descritos en el presente documento pueden prepararse sintéticamente, utilizando ya sea automatización o química convencional, por ejemplo uniendo una estructura de partida a perlas y añadiendo nucleótidos a la misma. Tales métodos son conocidos por los expertos en la técnica. Los oligonucleótidos en horquilla para su uso en la presente invención también pueden prepararse sintetizando segmentos o fragmentos de los mismos y luego uniendo dichos segmentos o fragmentos en estructuras más grandes que contienen secuencias de nucleótidos apropiadas para su uso en la presente invención. Tales segmentos o fragmentos también pueden ser de origen natural, derivados de microorganismos en la naturaleza o el resultado de la clonación de secuencias dentro de organismos seleccionados y utilizando vectores seleccionados para el proceso de clonación. Tales segmentos o fragmentos también pueden derivarse de vectores naturales, tales como plásmidos, virus o similares.

Los polinucleótidos en horquilla para su uso en la presente invención también pueden ser híbridos, o quimeras, que contienen algunos segmentos o secuencias que son de origen natural, así como segmentos o secuencias de origen completamente sintético. El hecho de que un segmento o secuencia dada se encuentre en la naturaleza no impide que se prepare sintéticamente en el laboratorio para su uso en la presente invención.

En la figura 1 se muestra una realización de ejemplo de un proceso de obtención de ácido nucleico circular monocatenario de un ácido nucleico bicatenario diana. Se selecciona un polinucleótido en horquilla **10**. El polinucleótido en horquilla contiene una secuencia de reconocimiento de transposasa (no mostrada). El polinucleótido en horquilla **10** se mezcla con una transposasa **12** para formar un complejo **14** que, en este caso, tiene dos polinucleótidos en horquilla **10'** y **10''** unidos a la transposasa **12**.

En la siguiente etapa del proceso (mostrado en la parte media de la figura 1), el complejo **14** se mezcla entonces con un ácido nucleico diana bicatenario **100** que, para mayor claridad en este ejemplo, se muestra con tres regiones; A-A' (lado izquierdo), B-B' (lado derecho) y C-C' (medio). El complejo **14** se une al ácido nucleico diana **100** y la acción enzimática de la transposasa **12** del complejo **14** escinde el ácido nucleico diana **100** dentro de la región C-C' para producir dos fragmentos de ácido nucleico **102'** y **102''**. El fragmento de ácido nucleico **102'** comprende la región dúplex A-A' unida al polinucleótido en horquilla **10'** por el hueco monocatenario E de la región C'. Asimismo, el fragmento de ácido nucleico **102''** comprende la región dúplex A-A' unida al polinucleótido en horquilla **10''** por el hueco monocatenario E' de la región C.

En la siguiente etapa del proceso (mostrado en la parte inferior de la figura 1), los dos fragmentos **102'** y **102''** se ligan entre sí mediante la adición de una enzima con actividad ligasa de forma que la región dúplex A-A' está unida a la región dúplex B-B'. Esto produce un ácido nucleico monocatenario intermedio **104** con dos bucles en horquilla y dos huecos E y E'. Los dos huecos E y E' se rellenan mediante la adición de una enzima polimerasa, formando de este modo un ácido nucleico circular monocatenario **106** que tiene una región dúplex y dos bucles opuestos. En ciertas realizaciones, es útil producir un círculo abierto mediante la fusión de la región dúplex usando métodos

conocidos, tal como desnaturalización por calor, por ejemplo.

IV. Descripción del sistema

5 En otra realización, en el presente documento se divulga un sistema para producir ácido nucleico circular monocatenario. El sistema puede proporcionarse a escala de laboratorio típica o a escala microfluídica, donde los componentes del sistema se proporcionan en un chip y bajo el control de un ordenador. El sistema está provisto de una pluralidad de cámaras de reacción donde se llevan a cabo diferentes etapas en el proceso. Se espera que la segregación de las etapas del proceso sea necesaria porque ciertos reactivos, tampones y aditivos necesarios para
10 ciertas etapas pueden ser incompatibles con otras etapas. Por ejemplo, se necesita Mg^{2+} para las reacciones de la polimerasa pero se piensa que interfiere con la formación de complejos estables de transposasa Tn5 con polinucleótidos en horquilla. Por lo tanto, una cámara separada para la formación del complejo puede ser ventajosa.

Un ejemplo de esta realización se muestra en la figura 2 donde se ve que el sistema **1000** incluye un manipulador de líquidos **1002** bajo control de un ordenador **1004**. El manipulador de líquidos está configurado para la transferencia de líquidos que contienen muestras de ácidos nucleicos, intermedios y productos obtenidos usando los métodos descritos anteriormente. El sistema **1000** incluye una primera cámara **1006** para contener componentes de tampón y reactivos necesarios para la formación de un complejo entre una transposasa y una pluralidad de polinucleótidos en horquilla. Estos componentes también pueden cargarse en la primera cámara **1006** mediante el manipulador de
20 líquidos **1002** siempre que el manipulador de líquidos **1002** esté en comunicación de manipulación de líquidos con soluciones madre de estos componentes (no mostrados). Si este es el caso, el ordenador **1004** puede configurarse para controlar la comunicación entre las soluciones madre y la primera cámara **1006** de manera que la composición de la solución utilizada para formar el complejo entre la transposasa y la pluralidad de polinucleótidos en horquilla puede modificarse. Esta comunicación con las soluciones madre también es posible para preparar condiciones de reacción apropiadas para la segunda cámara **1008** y la tercera cámara **1010**. También es ventajoso tener cada una de las cámaras **1006**, **1008** y **1010**, bajo control de temperatura individual (no mostrado).

El manipulador de líquidos **1002** está configurado para obtener una muestra S que comprende ácido nucleico diana y transferir la muestra S a la segunda cámara **1008**. El manipulador de líquidos está configurado también para
30 transferir una alícuota de la solución que contiene el complejo polinucleotídico en horquilla-transposasa a la segunda cámara **1008**. En algunas realizaciones, puede ser ventajoso proporcionar un módulo de purificación, tal como una columna de cromatografía de fase inversa (no mostrada) en el punto de salida de una o más de las cámaras de proceso **1006**, **1008**, **1010** para eliminar los aditivos tampón, las sales y los reactivos en el caso de que se descubra que estos componentes interfieren con la función de la siguiente cámara de proceso. Por ejemplo, si el tampón usado para formar el complejo en la primera cámara **1006** es incompatible con el proceso de fragmentación del ácido nucleico diana en la segunda cámara **1008** se puede proporcionar un módulo de purificación en la salida de la primera cámara **1006** donde el intercambio de tampón se puede llevar a cabo de acuerdo con métodos establecidos conocidos por los expertos en la materia.

40 Una vez que el ácido nucleico diana ha sido fragmentado por el complejo polinucleotídico en horquilla-transposasa, es transferido por el manipulador de líquidos **1002** a la tercera cámara **1010** que está provista de los reactivos y enzimas necesarios para ligar los fragmentos y rellenar los huecos del segmento de la base nucleotídica. El resultado final es la producción de ácido nucleico circular monocatenario que es útil para la amplificación en círculo rodante y métodos de secuenciación rápida.

En ciertas realizaciones, los polinucleótidos en horquilla se proporcionan con marcadores que son específicos para diversas tecnologías de plataforma de secuenciación. Cuando se someten a los métodos descritos anteriormente, estos polinucleótidos marcados en horquilla producen bibliotecas marcadas. Se han descrito ejemplos de dichos marcadores para producir bibliotecas compatibles con Nextera y Roche/454 para las plataformas de secuenciación rápida (Caruccio et al., Nextera™ Technology for NGS DNA Library Preparation: Simultaneous Fragmentation and
50 Tagging by In Vitro Transposition Epicentre Forum 2009, 16–3, 4–6).

En algunas realizaciones, se utiliza una biblioteca de ácido nucleico circular monocatenario que representa el genoma de un organismo o un virus como molde para obtener amplicones identificadores de bioagentes que
55 proporcionan composiciones de bases que proporcionan los medios para la identificación rápida del organismo o virus mediante espectrometría de masas de acuerdo con métodos descritos en patentes, solicitudes de patente y publicaciones científicas: los números de patente de Estados Unidos 7.108.974; 7.217.510; 7.226.739; 7.255.992; 7.312.036; 7.339.051; los números de publicación de patente 2003/0027135; 2003/0167133; 2003/0167134; 2003/0175695; 2003/0175696; 2003/0175697; 2003/0187588; 2003/0187593; 2003/0190605; 2003/0225529; 2003/0228571; 2004/0110169; 2004/0117129; 2004/0121309; 2004/0121310; 2004/0121311; 2004/0121312; 2004/0121313; 2004/0121314; 2004/0121315; 2004/0121329; 2004/0121335; 2004/0121340; 2004/0122598; 2004/0122857; 2004/0161770; 2004/0185438; 2004/0202997; 2004/0209260; 2004/0219517; 2004/0253583; 2004/0253619; 2005/0027459; 2005/0123952; 2005/0130196; 2005/0142581; 2005/0164215; 2005/0266397; 2005/0270191; 2006/0014154; 2006/0121520; 2006/0205040; 2006/0240412; 2006/0259249; 2006/0275749; 2006/0275788; 2007/0087336; 2007/0087337; 2007/0087338; 2007/0087339; 2007/0087340; 2007/0087341; 2007/0184434; 2007/0218467; 2007/0218467; 2007/0218489; 2007/0224614; 2007/0238116; 2007/0243544;

- 2007/0248969; WO2002/070664; WO2003/001976; WO2003/100035; WO2004/009849; WO2004/052175; WO2004/053076; WO2004/053141; WO2004/053164; WO2004/060278; WO2004/093644; WO 2004/101809; WO2004/111187; WO2005/023083; WO2005/023986; WO2005/024046; WO2005/033271; WO2005/036369; WO2005/086634; WO2005/089128; WO2005/091971; WO2005/092059; WO2005/094421; WO2005/098047; 5 WO2005/116263; WO2005/117270; WO2006/019784; WO2006/034294; WO2006/071241; WO2006/094238; WO2006/116127; WO2006/135400; WO2007/014045; WO2007/047778; WO2007/086904; WO2007/100397; WO2007/118222; Ecker et al., Ibis T5000: a universal biosensor approach for microbiology. Nat. Rev. Microbiol. 2008 Jun 3; Ecker et al., The Microbial Rosetta Stone Database: A compilation of global and emerging infectious microorganisms and bioterrorist threat agents. BMC Microbiology 2005, 5(1): 19; Ecker et al., The Ibis T5000 10 Universal Biosensor: An Automated Platform for Pathogen Identification and Strain Typing JALA, 2006, 6(11): 341–351; Ecker et al., The Microbial Rosetta Stone Database: A common structure for microbial biosecurity threat agents J. Forensic. Sci. 2005, 50(6): 1380–5; Ecker et al., Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry J. Clin. Microbiol. 2006, 44(8): 2921–32; Ecker et al., Rapid identification and strain-typing of respiratory pathogens for epidemic surveillance. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005, 102(22): 8012–7; Wortmann et al., Genotypic evolution of *Acinetobacter baumannii* strains in an outbreak associated with war trauma, Infect. Control Hosp. Epidemiol. 2008, 29(6):553–555; Hannis et al., High-resolution genotyping of *Campylobacter* species by use of PCR and high-throughput mass spectrometry J. Clin. Microbiol. 2008, 1220–5; Blyn et al., Rapid detection and molecular serotyping of adenovirus by use of PCR followed by electrospray ionization mass spectrometry J. Clin. Microbiol. 2008, 46(2): 644–51; Eshoo et al., Direct broad-range detection of alphaviruses in mosquito extracts Virology 2007, 368(2): 286–95; Sampath et al., Global surveillance of emerging Influenza virus genotypes by mass spectrometry. PLoS ONE, 2007, 2(5):e489; Sampath et al., Rapid identification of emerging infectious agents using PCR and electrospray ionization mass spectrometry. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007, 1102: 109–20; Hujer et al., Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center Antimicrob. Agents Chemother. 2006, 50(12): 4114–23; Hall et al., Base composition analysis of human mitochondrial DNA using electrospray ionization mass spectrometry: a novel tool for the identification and differentiation of humans Anal. Biochem. 2005, 344(1): 53–69.; Sampath et al., Rapid identification of emerging pathogens: coronavirus Emerg. Infect. Dis. 2005, 11(3):373–9.; Jiang Y., Hofstadler S. A. A highly efficient and automated method of purifying and desalting PCR products for analysis by electrospray ionization mass spectrometry 30 Anal. Biochem. 2003, 316: 50–57.; Jiang et al., Mitochondrial DNA mutation detection by electrospray mass spectrometry Clin. Chem. 2006, 53(2): 195–203.; Russell et al., Transmission dynamics and prospective environmental sampling of adenovirus in a military recruit setting. J. Infect. Dis. 2006, 194(7): 877–85.; Hofstadler et al., Detection of microbial agents using broad-range PCR with detection by mass spectrometry: The TIGER concept Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. 2006.; Hofstadler et al., Selective ion filtering by digital thresholding: A method to unwind complex ESI-mass spectra and eliminate signals from low molecular weight chemical noise 35 Anal. Chem. 2006, 78(2): 372–378.; Hofstadler et al., TIGER: The Universal Biosensor Int. J. Mass Spectrom. 2005, 242(1): 23–41.; Van Ert et al., Mass spectrometry provides accurate characterization of two genetic marker types in *Bacillus anthracis* Biotechniques, 2004, 37(4): 642–4, 646, 648.; Sampath et al., Forum on Microbial Threats: Learning from SARS: Preparing for the Next Disease Outbreak-Workshop Summary (ed. Knobler SE, Mahmoud A, Lemon S.) The National Academies Press, Washington, D.C. 2004, 181–185. 40

Aunque la presente invención se ha descrito con especificidad de acuerdo con algunas de sus realizaciones, los ejemplos siguientes solo sirven para ilustrar los compuestos de la invención y no se pretende que limiten la misma. Con el fin de que la invención divulgada en el presente documento se pueda entender con mayor eficiencia, se proporcionan los ejemplos siguientes. Debe entenderse que estos ejemplos son para fines ilustrativos únicamente y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención de ningún modo. 45

EJEMPLOS

50 **Ejemplo 1:** Optimización de polinucleótidos en horquilla para la formación del complejo de transposoma

Los polinucleótidos en horquilla de varias longitudes con longitudes de tallo variables, bucles de tallo, extremos romos y extremos escalonados se preparan utilizando métodos de síntesis de oligonucleótidos estándar conocidos por los expertos en la materia. Los polinucleótidos en horquilla contienen secuencias de reconocimiento de la 55 transposasa, tales como la secuencia de mosaico final de la transposasa Tn5 o las secuencias R1 y R2 de la transposasa MuA. Las posiciones de la secuencia de reconocimiento de la transposasa dentro de la región dúplex de los polinucleótidos en horquilla pueden variarse con el objetivo de optimizar el reconocimiento molecular de la secuencia por la transposasa. Los polinucleótidos en horquilla pueden prepararse también con marcadores de secuenciación específicos de la plataforma. En estos casos, se analizan los polinucleótidos marcados en horquilla 60 para asegurar que los marcadores no interfieran de forma apreciable con el proceso de formación del complejo.

La formación de complejos puede monitorizarse usando electroforesis en gel u otro método de ensayo de unión, tal como espectroscopia de resonancia de plasmón superficial, por ejemplo.

65 Al seleccionar las características apropiadas para los polinucleótidos en horquilla candidatos, puede ser ventajoso llevar a cabo estudios de modelación molecular para la unión de polinucleótidos en horquilla a la transposasa

seleccionada usando estructuras tridimensionales publicadas de los transposones y los polinucleótidos en horquilla recientemente diseñados. Dichos métodos de modelado molecular son conocidos para los expertos en la técnica.

Las condiciones del tampón se optimizan para mejorar el proceso de formación del complejo. Por ejemplo, reactivos o estabilizantes, tales como Mg^{2+} , por ejemplo, que se sabe que interfieren con el proceso de formación de complejos, se excluyen del tampón utilizado para la formación del complejo.

Ejemplo 2: Optimización de los tiempos de incubación - para obtener una distribución óptima de las longitudes de los fragmentos para aplicaciones individuales

Para el desarrollo de los métodos descritos en el presente documento, se selecciona un ácido nucleico diana estándar, por ejemplo, un único genoma de prueba viral, tal como el genoma de *H. influenzae*, que contiene 1,8 millones de pares de bases.

El complejo polinucleótido en horquilla-transposoma optimizado de acuerdo con el ejemplo 1 se incuba a continuación con el genoma de ensayo durante periodos de tiempo variables con el fin de preparar fragmentos de tamaños óptimos. Los tamaños óptimos elegidos pueden depender de la aplicación final del ácido nucleico circular monocatenario producido. La temperatura de incubación se controla cuidadosamente para controlar el nivel de actividad del complejo de transposoma.

Las condiciones que pueden ser apropiadas para la reacción de fragmentación se describieron para la transposasa MuA (Goldhaber-Gordon et al., J. Biol. Chem. 2002, 277, 7694-7702) y pueden adaptarse a la reacción de fragmentación como sigue. Las reacciones se llevan a cabo en un volumen de 25 μ l que contiene Tris-HCl 25 mM (pH 8 a temperatura ambiente), NaCl 140 mM, $MgCl_2$ 10 mM, ditiotretol 1 mM, 0,1 mg/ml de seroalbúmina bovina, 15 % de glicerol, 12 % de dimetilsulfóxido, 0,1 % de Triton, ATP 2 mM, 250 ng de ADN de ensayo y cantidades variables de fragmentos de ADN de Mu y MuA. La transposasa MuA se prepara mediante dilución de la reserva concentrada en NaCl 600 mM, HEPES-KOH 25 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol al 10 % y ditiotretol 1 mM. Las reacciones se incuban a 30 °C durante 20 - 60 minutos.

Ejemplo 3: Ensayo de fragmentos de ácido nucleico diana para la preparación de bibliotecas de ácido nucleico circular monocatenario

En este ejemplo, los fragmentos producidos en el ejemplo 2 se tratan con una ligasa, tal como ligasa de T4 o ligasa de *E coli* para ligar los fragmentos juntos como se indica esquemáticamente en la figura 1. Ventajosamente, el relleno de los huecos de los segmentos de la base nucleotídica se realiza también en el mismo recipiente de reacción mediante la adición de una polimerasa altamente procesiva que carece de actividad de desplazamiento de cadena y de actividad exonucleasa 5'-3', tal como la polimerasa de T4 o de T7. Se desarrollan condiciones de reacción que son favorables a la función adecuada de la polimerasa y la ligasa. Si se comprueba que el relleno de los huecos por la polimerasa es ineficiente, la falta de un extremo 5' fosforilado en el hueco del segmento de la base nucleotídica puede ser la causa de la ineficiencia. Se puede añadir una quinasa para asegurar que el hueco del segmento de la base nucleotídica está bordeado por un extremo 5' fosforilado para la función polimerasa apropiada.

El ácido nucleico circular monocatenario obtenido a partir de estas pruebas puede purificarse mediante métodos conocidos y analizarse mediante electroforesis en gel, espectrometría de masas o diversos métodos espectroscópicos conocidos por los expertos en la técnica. El ácido nucleico circular monocatenario también se puede analizar como molde para reacciones de amplificación, tales como la amplificación en círculo rodante o en métodos de secuenciación rápida de acuerdo con procedimientos establecidos conocidos por los expertos en la materia.

Varias modificaciones de la invención, además de las descritas en el presente documento, se pondrán de manifiesto para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior.

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar ácido nucleico circular monocatenario a partir de una muestra del ácido nucleico diana, comprendiendo dicho método:

- a) formar un complejo que comprende una transposasa y una pluralidad de polinucleótidos en horquilla, teniendo cada uno de dichos polinucleótidos en horquilla una región dúplex que comprende una secuencia de reconocimiento de la transposasa.
- b) mezclar dicho complejo con dicho ácido nucleico diana, fragmentando de este modo dicho ácido nucleico diana y ligando dichos polinucleótidos en horquilla a dicho ácido nucleico diana, para formar fragmentos de ácido nucleico unidos en horquilla, teniendo cada fragmento de ácido nucleico unido en horquilla una región del fragmento del ácido nucleico diana dúplex y un hueco del segmento de la base nucleotídica entre cada región del fragmento de ácido nucleico diana y su correspondiente polinucleótido en horquilla;
- c) poner en contacto dichos fragmentos unidos en horquilla con una ligasa, ligando de este modo las regiones del fragmento del ácido nucleico diana dúplex de dichos fragmentos unidos en horquilla para formar un ácido nucleico circular monocatenario que comprende un par de bucles opuestos y una región dúplex intermedia, comprendiendo dicha región dúplex un par de espacios de huecos del segmento de la base nucleotídica; y
- d) poner en contacto dicho ácido nucleico circular monocatenario simple de la etapa c) con una polimerasa y nucleótidos trifosfatos, llenando de este modo dichos huecos del segmento de la base nucleotídica.

2. Un método para preparar una biblioteca de ácido nucleico circular monocatenario que representa un genoma de un virus u organismo, comprendiendo dicho método:

- a) formar un complejo que comprende una transposasa y una pluralidad de polinucleótidos en horquilla, teniendo cada uno de dichos polinucleótidos en horquilla una región dúplex que comprende una secuencia de reconocimiento de la transposasa.
- b) mezclar dicho complejo con ácido nucleico que representa dicho genoma, fragmentando de este modo dicho ácido nucleico y ligando dichos polinucleótidos en horquilla a dicho ácido nucleico, para formar fragmentos de ácido nucleico unidos en horquilla, teniendo cada fragmento de ácido nucleico unido en horquilla una región del fragmento del ácido nucleico diana dúplex y un hueco del segmento de la base nucleotídica entre cada región del fragmento de ácido nucleico diana y su correspondiente polinucleótido en horquilla;
- c) poner en contacto dichos fragmentos unidos en horquilla con una ligasa, ligando de este modo las regiones del fragmento del ácido nucleico diana dúplex de dichos fragmentos unidos en horquilla para formar un ácido nucleico circular monocatenario que comprende un par de bucles opuestos y una región dúplex intermedia, comprendiendo dicha región dúplex un par de espacios de huecos del segmento de la base nucleotídica; y
- d) poner en contacto dicho ácido nucleico circular monocatenario simple de la etapa c) con una polimerasa y nucleótidos trifosfatos, llenando de este modo dichos huecos del segmento de la base nucleotídica.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, que además comprende:

- calentar dicho ácido nucleico circular monocatenario para desnaturalizar dicha región dúplex intermedia; y / o mezclar dichos fragmentos unidos en horquilla con una quinasa antes o durante la etapa d) para fosforilar cualquier extremo 5' no fosforilado antes de rellenar dichos huecos del segmento de base nucleotídica.

4. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha transposasa:

- cataliza la integración aleatoria de dicho polinucleótido en horquilla en dicho ácido nucleico diana; y / o es transposasa MuA o transposasa Tn5;
- es transposasa Tn5 y dicha secuencia de reconocimiento de la transposasa es la secuencia final de mosaico de 19 pares de bases del transposón Tn5;
- es transposasa MuA y dicha secuencia de reconocimiento de transposasa es la región R1 o R2 del transposón MuA.

5. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que:

- dicha polimerasa carece de actividad exonucleasa 5'–3';
- dicha polimerasa carece de actividad de desplazamiento de cadena; y / o
- dicha polimerasa es polimerasa de T4 polimerasa de T7;
- dicha ligasa es ligasa de T4; y / o
- dichos polinucleótidos en horquilla comprenden marcadores de secuenciación.

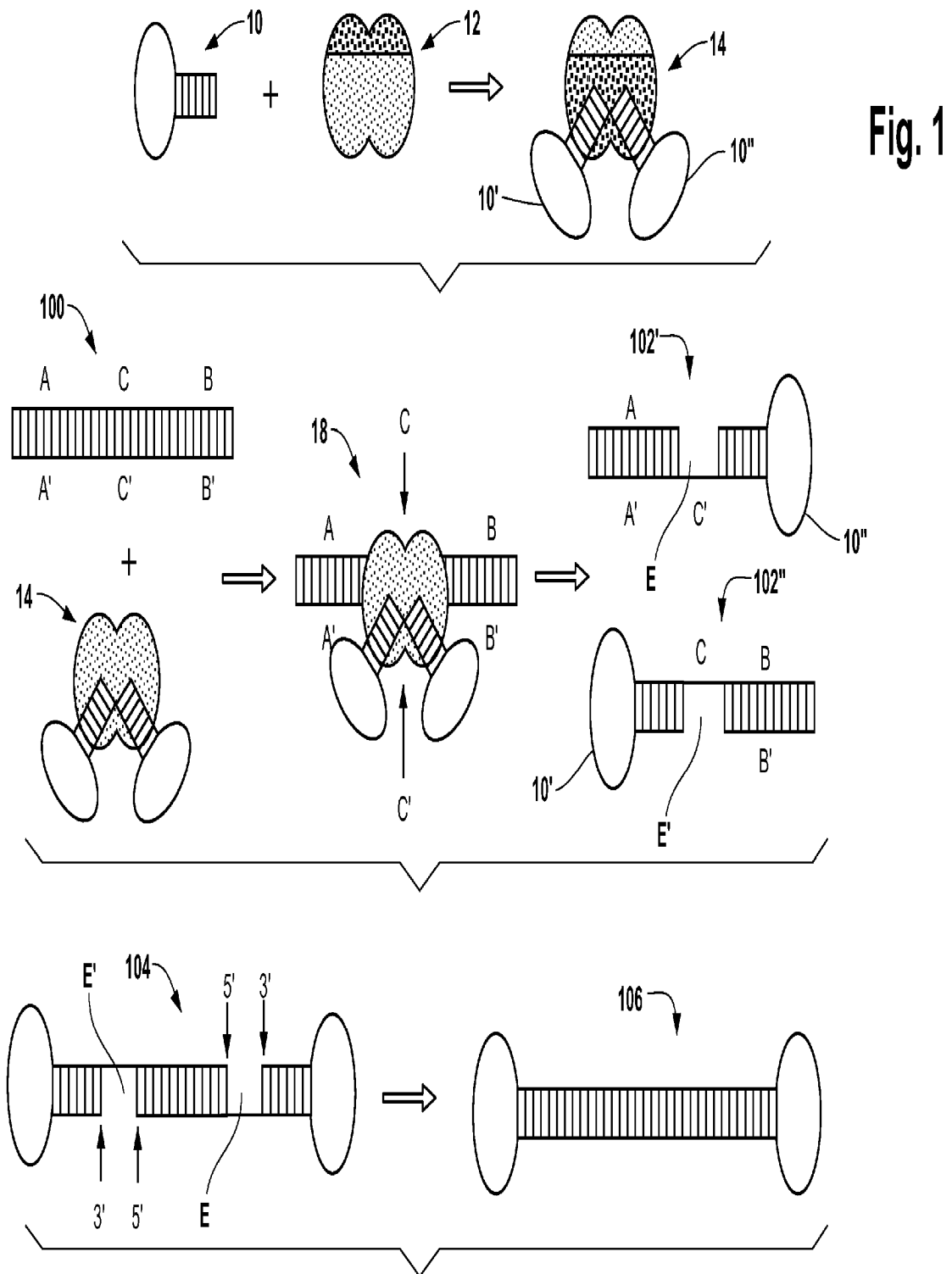


Fig. 2

