

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 149**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/10</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/11</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/66</b>	(2006.01)
<b>C40B 40/06</b>	(2006.01)
<b>C40B 50/06</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/68</b>	(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2014 PCT/CN2014/086418**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016 WO16037358**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2014 E 14901591 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3192869**

54 Título: **Oligonucleótido aislado y su uso en la secuenciación de ácidos nucleicos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.10.2019**

73 Titular/es:  
**MGI TECH CO., LTD. (100.0%)  
Main Building and Second Floor of No. 11  
Building, Beishan Industrial Zone, Yantian  
District  
Shenzhen, CN**

72 Inventor/es:  
**GENG, CHUNYU;  
BALLINGER, DENNIS G.;  
ZHANG, YANYAN;  
FU, SHUJIN;  
HE, LINGYU;  
ZHANG, WENWEI y  
JIANG, HUI**

74 Agente/Representante:  
**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 726 149 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**

Oligonucleótido aislado y su uso en la secuenciación de ácidos nucleicos

Campo técnico de la invención

5 La presente divulgación se refiere al campo de la biotecnología, específicamente a oligonucleótidos aislados y su uso en la secuenciación de ácidos nucleicos, más particularmente a un oligonucleótido aislado, un kit, un método para agregar adaptadores a los terminales de un fragmento de cadena doble, un método de construcción de una biblioteca para la secuenciación de un fragmento de ADN de cadena doble y un método para la secuenciación de ácidos nucleicos.

Antecedentes de la invención

10 La secuenciación de alto rendimiento se ha convertido en una tecnología fundamental en los campos de la biología molecular, la biotecnología y la ciencia médica. En los últimos años, se ha ido innovando gradualmente un método rápido, preciso y de bajo coste para determinar el nivel de expresión génica y la secuencia de nucleótidos. A medida que la tecnología de secuenciación de alto rendimiento de próxima generación basada en la secuenciación por síntesis ha ido madurando, varias compañías importantes de secuenciación han prestado atención al desarrollo de  
 15 un nuevo producto de secuenciación, acortado el proceso de la secuenciación y un menor coste de secuenciación. El producto de secuenciación disponible actualmente basado en la tecnología de secuenciación de próxima generación incluye la nueva secuenciación del genoma completo, la nueva secuenciación de transcriptomas completos y la secuenciación de microARN, etc. En particular, una tecnología de secuenciación y captura de una secuencia objetivo derivada de la tecnología de secuenciación de nueva generación y la tecnología de microarreglos  
 20 permite utilizar una gran cantidad de sondas de oligonucleótidos para combinar de forma complementaria con una región específica en un genoma, para enriquecer la región específica, que posteriormente es secuenciada por la tecnología de secuenciación de próxima generación, de tal manera que se logra la secuenciación del exoma del exón completo (WES) para los seres humanos. Dicha secuenciación del exoma del exón completo (WES) tiene ventajas obvias en comparación con la secuenciación del genoma completo debido al bajo volumen de análisis de  
 25 datos.

Sin embargo, todavía es necesario mejorar la tecnología relacionada para la secuenciación de secuencias de nucleótidos.

30 En la actualidad, Complete Genomics (a veces denominada "CG" en este contexto) ya posee un montaje de tecnología de secuenciación de próxima generación, que se ha desarrollado de forma independiente y se ha adaptado para la secuenciación del genoma completo humano. Un proceso para construir una biblioteca incluye principalmente los siguientes pasos: fragmentación del ADN genómico, ligadura del adaptador por primera vez, ciclización del ADN de cadena doble seguida de digestión, ligadura del adaptador por segunda vez y aislamiento del ADN de cadena sencilla seguido de la ciclación, cuyos dos pasos de ligadura del adaptador son muy importantes  
 35 para todo el proceso de construcción de la biblioteca. Después de la ligadura a un fragmento de ADN en dos terminales, el adaptador (una secuencia de ADN) se puede reconocer como un sitio de iniciación para la secuenciación, lo que permite a un instrumento leer la información de la secuencia después de eso.

40 Para asegurar que la información de secuenciación adquirida pueda analizarse fácilmente, se requiere ligar dos adaptadores diferentes en dos extremos (el extremo 5' y el extremo 3') de un fragmento de ADN. Posteriormente, además de lograr la ligadura con una dirección específica y evitar la interconexión entre los adaptadores, se utiliza un adaptador con extremos cohesivos. Sin embargo, es difícil evitar que los adaptadores con extremos cohesivos se interconecten. Complete Genomics construye la biblioteca para la secuenciación ligando el adaptador en dos extremos en varios pasos, que incluyen: ligadura del adaptador en un extremo de un fragmento de ADN; desnaturalización, hibridación y extensión; ligadura del adaptador en el otro extremo del fragmento de ADN; traducción de muescas, y reacción en cadena de la polimerasa. En consecuencia, el coste general de la  
 45 secuenciación es alto debido a los costosos reactivos requeridos para las extensiones múltiples, y la eficiencia de la secuenciación es baja debido a los múltiples pasos de purificación y recuperación entre los pasos individuales. Además, un protocolo de este tipo en el proceso actual disponible para construir la biblioteca requiere dos pasos de ligadura del adaptador.

50 El documento WO 2009/076238, a nombre de Complete Genomics, describe adicionalmente dicha ligadura del adaptador a fragmentos de ADN en el contexto de la construcción de bibliotecas para secuenciación. El documento WO2009/061840, también en nombre de Complete Genomics, se refiere a una manera de proporcionar adaptadores en una población de ADN objetivo circulares para secuenciación que emplea metilación específica de secuencia específica. El documento WO 97/46704 publicado anteriormente describe una secuenciación real mediante la ligadura del adaptador.

55 Resúmen

La presente divulgación proporciona en realizaciones un método para ligar diferentes adaptadores a un fragmento de ADN en dos terminales.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un oligonucleótido aislado que comprende una primera cadena y una segunda cadena, en la que un primer nucleótido terminal en el extremo 5' de la primera cadena tiene un grupo fosfato y un segundo nucleótido terminal en el extremo 3' de la primera cadena es didesoxinucleótido; y un tercer nucleótido terminal en el extremo 5' de la segunda cadena no tiene grupo fosfato, y un cuarto nucleótido terminal en el extremo 3' de la segunda cadena es un didesoxinucleótido, en el que la primera cadena es de una longitud más larga que aquella de la segunda cadena, y se forma una estructura de cadena doble entre la primera cadena y la segunda cadena; y un primer saliente está ubicado en el extremo 3' de la primera cadena y, opcionalmente, un segundo saliente está ubicado en el extremo 5' de la segunda cadena, el primer saliente es de una longitud más larga que la del segundo saliente, si está presente, la longitud del primer saliente es de aproximadamente 6 nt a 12 nt y la longitud del segundo saliente, si está presente, es de hasta 4 nt. Un oligonucleótido de este tipo no puede conectarse con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, tal oligonucleótido aislado se puede usar como un adaptador para la construcción de la biblioteca, ligando así diferentes adaptadores a un fragmento de ácido nucleico respectivamente en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de la ligadura, así como la reducción de costes económicos y de tiempo para la construcción de bibliotecas.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende un primer adaptador y un segundo adaptador, siendo cada uno un oligonucleótido aislado de la invención como se describió anteriormente, en el que el primer adaptador es diferente del segundo adaptador. Por consiguiente, un kit de este tipo se puede usar para proporcionar adaptadores para la construcción de bibliotecas, permitiendo así la ligadura de diferentes adaptadores a fragmentos de ácido nucleico respectivamente en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, lo que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de la ligadura, así como la reducción de costes económicos y de tiempo para la construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al kit, que no se describe con más detalle en el presente documento.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para agregar adaptadores, que comprenden un primer adaptador y un segundo adaptador, a un fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, cada uno de los cuales comprende extremos romos emparejados sin ningún grupo fosfato. El método comprende ligar el primer adaptador y el segundo adaptador al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, para obtener un primer producto ligado, en el que el primer adaptador es diferente del segundo adaptador; y el primer adaptador y el segundo adaptador son cada uno un oligonucleótido aislado de la invención como se describió anteriormente; reemplazar una segunda cadena del primer adaptador por un primer ADN de cadena sencilla y reemplazar una segunda cadena del segundo adaptador por un segundo ADN de cadena sencilla, en donde el primer ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del primer adaptador para formar una primera estructura de cadena doble, y el segundo ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del segundo adaptador para formar una segunda estructura de cadena doble; conectar el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales para obtener un segundo producto ligado; y amplificar el segundo producto ligado con un primer cebador y un segundo cebador para obtener un producto amplificado, en donde el producto amplificado es un fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales, el primer cebador contiene la misma secuencia que uno del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla, y el segundo cebador contiene la misma secuencia que uno del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla y contiene biotina adicional en el extremo 5' en comparación con el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla. Como se describió anteriormente, el oligonucleótido de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación no se puede conectar con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, un oligonucleótido de este tipo puede usarse como un adaptador para la construcción de bibliotecas, ligando así diferentes adaptadores al fragmento de ácido nucleico respectivamente en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de la ligadura, así como la reducción de costes económicos y de tiempo para la construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al método, que no se describe con más detalle en el presente documento. Además, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla durante la construcción de la biblioteca, de modo que se forma una estructura más estable con la primera cadena del primer adaptador y la primera cadena del segundo adaptador. Además, el segundo producto ligado se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla utilizados como cebadores, formando así un fragmento de ADN con adaptadores estables en ambos terminales.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para construir una biblioteca para secuenciar un fragmento de ADN de cadena doble con dos terminales, cada uno de los cuales comprende extremos romos

emparejados sin ningún grupo fosfato. El método comprende: ligar un primer adaptador y un segundo adaptador al ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales mediante el método para agregar adaptadores descrito anteriormente, para obtener un fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales; separar el fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales en fragmentos de ADN de cadena sencilla; y ciclar el fragmento de ADN de cadena sencilla para obtener un bucle de ADN de cadena sencilla, en el que el bucle de ADN de cadena sencilla constituye la biblioteca para la secuenciación del fragmento de ADN de cadena doble con dos terminales. Como se describió anteriormente, el oligonucleótido de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación no se puede conectar con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, un oligonucleótido de este tipo puede usarse como un adaptador para la construcción de bibliotecas, ligando así diferentes adaptadores al fragmento de ácido nucleico respectivamente en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de ligadura, así como la reducción de costes económicos y de tiempo para la construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al método, que no se describe con más detalle en el presente documento. Además, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla durante la construcción de la biblioteca, de modo que se forma una estructura más estable con la primera cadena del primer adaptador y la primera cadena del segundo adaptador. Además, el segundo producto ligado se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla utilizados como cebadores, formando así un fragmento de ADN con adaptadores estables en ambos terminales. Posteriormente, un fragmento de ADN de cadena sencilla se aísla y se cicla, de modo que la biblioteca para la secuenciación se puede obtener de manera eficiente, por ejemplo, una biblioteca para una plataforma de secuenciación de CG.

En un quinto aspecto, la presente divulgación proporciona en realizaciones un método para secuenciar ácidos nucleicos. Dicho método incluye: construir una biblioteca mediante el método de construir la biblioteca para secuenciar el fragmento de ADN de cadena doble descrito anteriormente; y secuenciar la biblioteca. Como se describió anteriormente, el oligonucleótido de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación no se puede conectar con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, un oligonucleótido de este tipo puede usarse como un adaptador para la construcción de bibliotecas, ligando así diferentes adaptadores al fragmento de ácido nucleico respectivamente en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de ligadura, así como la reducción de costes económicos y de tiempo para la construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al método, que no se describe con más detalle en el presente documento. Además, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla durante la construcción de la biblioteca, de modo que se forma una estructura más estable con la primera cadena del primer adaptador y la primera cadena del segundo adaptador. Además, el segundo producto ligado se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla utilizados como cebadores, formando así un fragmento de ADN con adaptadores estables en ambos terminales. Posteriormente, un fragmento de ADN de cadena sencilla se aísla y se cicla, de modo que la biblioteca se puede obtener de manera eficiente, por ejemplo, una biblioteca para la plataforma de secuenciación de CG, lo que mejora aún más la eficiencia de la secuenciación y reduce el coste de la secuenciación.

En un sexto aspecto, la presente divulgación proporciona como una realización de la invención un dispositivo para agregar adaptadores, que comprende un primer adaptador y un segundo adaptador, a un fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, cada uno de los cuales comprende extremos romos emparejados sin ningún grupo de fosfato. El dispositivo comprende: una primera unidad de ligadura configurada para ligar el primer adaptador y el segundo adaptador al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, para obtener un primer producto ligado, en el que el primer adaptador es diferente del segundo adaptador, y el primer adaptador y el segundo adaptador son cada uno un oligonucleótido aislado de la invención como se describió anteriormente; una unidad de reemplazo configurada para reemplazar una segunda cadena del primer adaptador por un primer ADN de cadena sencilla y reemplazar una segunda cadena del segundo adaptador por un segundo ADN de cadena sencilla, en donde el primer ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del primer adaptador para formar una primera estructura de cadena doble, y el segundo ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del segundo adaptador para formar una segunda estructura de cadena doble; una segunda unidad de ligadura configurada para conectar el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, para obtener un segundo producto ligado, y una unidad amplificadora configurada para amplificar el segundo producto ligado con un primer cebador y un segundo cebador para obtener un producto amplificado, en donde el primer cebador contiene la misma secuencia que uno de los primeros ADN de

cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla, y el segundo cebador contiene la misma secuencia que el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla y contiene biotina adicional en el extremo 5' en comparación con el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla. Como se describió anteriormente, el oligonucleótido de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación no se puede conectar con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, un oligonucleótido de este tipo puede usarse como un adaptador para la construcción de bibliotecas, ligando así diferentes adaptadores al fragmento de ácido nucleico respectivamente en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de ligadura, así como la reducción de costes económicos y de tiempo para la construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al dispositivo, que no se describe con más detalle en el presente documento. Además, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla durante la construcción de la biblioteca, de modo que se forma una estructura más estable con la primera cadena del primer adaptador y la primera cadena del segundo adaptador. Además, el segundo producto ligado se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla utilizados como cebadores, formando así un fragmento de ADN con adaptadores estables en ambos terminales.

En un séptimo aspecto, la presente divulgación proporciona como una realización de la invención un dispositivo para construir una biblioteca para secuenciar un fragmento de ADN de cadena doble con dos terminales, cada uno de los cuales comprende extremos romos emparejados sin ningún grupo fosfato. El dispositivo comprende: el dispositivo para agregar adaptadores configurados para ligar el primer adaptador y el segundo adaptador al ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, para obtener un fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales; un dispositivo de aislamiento del fragmento de ADN de cadena sencilla configurado para separar el fragmento de ADN ligado con los adaptadores primero y segundo respectivamente en dos terminales en fragmentos de ADN de cadena sencillas; y un dispositivo de ciclación configurado para ciclar el fragmento de ADN de cadena sencilla para obtener un bucle de ADN de cadena sencilla, en el que el bucle de ADN de cadena sencilla constituye la biblioteca para secuenciar el fragmento de ADN de cadena doble con dos terminales. Como se describió anteriormente, el oligonucleótido de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación no se puede conectar con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, tal oligonucleótido puede usarse como un adaptador para la construcción de bibliotecas, ligando así diferentes adaptadores a un fragmento de ácido nucleico respectivamente en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de ligadura, así como reduce el coste económico y de tiempo para la construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al dispositivo, que no se describe con más detalle en el presente documento. Además, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla durante la construcción de la biblioteca, de modo que se forma una estructura más estable con la primera cadena del primer adaptador y la primera cadena del segundo adaptador. Además, el segundo producto ligado se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla utilizados como cebadores, formando así un fragmento de ADN con adaptadores estables en ambos terminales. Posteriormente, un fragmento de ADN de cadena sencilla se aísla y se cicla, de modo que la biblioteca se puede obtener de manera eficiente, por ejemplo, una biblioteca para la plataforma de secuenciación de CG.

En un octavo aspecto, la presente divulgación proporciona en realizaciones un sistema para la secuenciación de ácidos nucleicos. Dicho sistema incluye: el dispositivo para construir la biblioteca para secuenciar el fragmento de ADN de cadena doble con dos terminales descritos anteriormente; y un dispositivo de secuencia configurado para secuenciar la biblioteca. Como se describió anteriormente, el oligonucleótido de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación no se puede conectar con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, tal oligonucleótido puede usarse como un adaptador para la construcción de bibliotecas, ligando así diferentes adaptadores a un fragmento de ácido nucleico respectivamente en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de ligadura, así como la reducción del coste económico y de tiempo para la construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al sistema, que no se describe con más detalle en el presente documento. Además, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla durante la construcción de la biblioteca, de modo que se forma una estructura más estable con la primera cadena del primer adaptador y la primera cadena del segundo adaptador. Además, el segundo producto ligado se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el

5 primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla utilizados como cebadores, formando así un fragmento de ADN con adaptadores estables en ambos terminales. Posteriormente, un fragmento de ADN de cadena sencilla se aísla y se cicla, de modo que la biblioteca se puede obtener de manera eficiente, por ejemplo, una biblioteca para una plataforma de secuenciación de CG, lo que mejora aún más la eficiencia de la secuenciación y reduce el coste de la secuenciación.

10 En un noveno aspecto, la presente divulgación proporciona en realizaciones un dispositivo para construir una biblioteca para secuenciar ADN genómico. En algunas realizaciones, el dispositivo incluye: una primera unidad configurada para fragmentar la muestra de ADN genómico para obtener un producto de fragmentación; una segunda unidad configurada para desfosforilar el producto de fragmentación para obtener un producto de fragmentación desfosforilado; una tercera unidad configurada para reparar el extremo del producto de fragmentación desfosforilado para obtener el fragmento de ADN de cadena doble; una cuarta unidad configurada para ligar el primer adaptador y el segundo adaptador al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, para obtener un primer producto ligado, en el que el primer adaptador es diferente del segundo adaptador, y el primer adaptador y el segundo adaptador cada uno son el oligonucleótido aislado descrito anteriormente; una quinta unidad configurada para reemplazar una segunda cadena del primer adaptador por un primer ADN de cadena sencilla y reemplazar una segunda cadena del segundo adaptador por un segundo ADN de cadena sencilla, en el que el primer ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del primer adaptador para formar una primera estructura de cadena doble, y el segundo ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del segundo adaptador para formar una segunda estructura de cadena doble; una sexta unidad configurada para conectar el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, para obtener un segundo producto ligado; una séptima unidad configurada para amplificar el segundo producto ligado con un primer cebador y un segundo cebador para obtener un producto amplificado, en el cual el producto amplificado es un fragmento de ADN ligado con los adaptadores primero y segundo respectivamente en dos terminales, el primer cebador contiene la misma secuencia que uno del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla, y el segundo cebador contiene la misma secuencia que el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla y contiene biotina adicional en el extremo 5' en comparación con el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla; una octava unidad configurada para aislar un fragmento de ADN de cadena sencilla del fragmento de ADN ligado con los adaptadores primero y segundo respectivamente en dos terminales; y una novena unidad configurada para ciclar el fragmento de ADN de cadena sencilla para obtener un bucle de ADN de cadena sencilla, en el que el bucle de ADN de cadena sencilla constituye la biblioteca para secuenciar el ADN genómico. Como se describió anteriormente, el oligonucleótido de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación no se puede conectar con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, un oligonucleótido de este tipo puede usarse como un adaptador para la construcción de bibliotecas, ligando así diferentes adaptadores al fragmento de ácido nucleico respectivamente en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de ligadura, así como la reducción de costes económicos y de tiempo para la construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al dispositivo, que no se describe con más detalle en el presente documento. Además, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla durante la construcción de la biblioteca, de modo que se forma una estructura más estable con la primera cadena del primer adaptador y la primera cadena del segundo adaptador. Además, el segundo producto ligado se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla utilizados como cebadores, formando así un fragmento de ADN con adaptadores estables en ambos terminales. Posteriormente, un fragmento de ADN de cadena sencilla se aísla y se cicla, de modo que la biblioteca se puede obtener de manera eficiente, por ejemplo, una biblioteca para una plataforma de secuenciación de CG.

50 Los aspectos y ventajas adicionales de las realizaciones de la presente divulgación se darán en parte en las siguientes descripciones, se harán evidentes en parte a partir de las siguientes descripciones, o se aprenderán de la práctica de las realizaciones de la presente divulgación.

#### Breve divulgación de los dibujos

55 Estos y otros aspectos y ventajas de las realizaciones de la presente divulgación se harán evidentes y se apreciarán más fácilmente a partir de las siguientes descripciones realizadas con referencia a los dibujos, en los que:

60 La Figura 1 es un diagrama de flujo que muestra un proceso de construcción de biblioteca en una realización de la presente divulgación, en la que 1 se refiere a un fragmento de ADN fragmentado, 2 se refiere a un fragmento de ADN desfosforilado y reparado en el extremo (cada extremo es hidroxilo), 3 se refiere a un adaptador A, 4 se refiere a un adaptador B, 5 se refiere a un ácido nucleico de cadena sencilla C, 6 se refiere a una secuencia etiqueta del ácido nucleico de cadena sencilla C, 7 se refiere a un ácido nucleico D de cadena sencilla y 8 se refiere a un ácido nucleico de cadena sencilla ciclado que es un producto final;

La Figura 2 es un electroforetograma en una realización de la presente divulgación;

La Figura 3 es un electroforetograma en una realización de la presente divulgación;

La Figura 4 es un diagrama de flujo que muestra un método para agregar adaptadores a un fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales en una realización de la presente divulgación;

5 La Figura 5 es un diagrama esquemático que muestra un dispositivo para agregar adaptadores a un fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales en una realización de la presente divulgación;

La Figura 6 es un diagrama esquemático que muestra un dispositivo para construir una biblioteca para secuenciar un fragmento de ADN de cadena doble en una realización de la presente divulgación; y

10 La Figura 7 es un diagrama esquemático que muestra un sistema para secuenciar ácidos nucleicos en una realización de la presente divulgación.

#### Descripción detallada

Se hará referencia en detalle a las realizaciones de la presente divulgación. Las realizaciones descritas en el presente documento con referencia a los dibujos son explicativas, ilustrativas y se usan para comprender en general la presente divulgación. Las realizaciones no se interpretarán como limitantes de la presente divulgación.

15 Además, los términos tales como "primero" y "segundo" se usan en el presente documento para fines de divulgación y no pretenden indicar o implicar una importancia o importancia relativa. Por lo tanto, las funciones restringidas con "primero" y "segundo" pueden incluir explícita o implícitamente una o más de las funciones. Además, en la divulgación de la presente divulgación, a menos que se indique lo contrario, el término "una pluralidad de" se refiere a dos o más. Además, en la presente divulgación, las expresiones "ligar", "que liga", "ligado" o "ligadura" significa  
20 que dos moléculas de ácido nucleico de cadena sencilla forman una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla más larga directamente nucleótido por nucleótido debido a la presencia del grupo de fosforilación en el extremo 5' de una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla; mientras tanto las expresiones "conectar", "que conecta", "conectado" o "conexión" indican que dos moléculas de ácido nucleico de cadena sencilla forman una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla más larga indirectamente por medio de otra reacción, como la traducción del corte  
25 seguida de la ligadura.

#### Oligonucleótido aislado y kit

En un primer aspecto, como se señaló anteriormente, la presente invención proporciona un oligonucleótido aislado, que comprende: una primera cadena y una segunda cadena, en la que un primer nucleótido terminal en el extremo  
30 5' de la primera cadena tiene un grupo fosfato, y un segundo nucleótido terminal en el extremo 3' de la primera cadena es didesoxinucleótido; y un tercer nucleótido terminal en el extremo 5' de la segunda cadena no tiene grupo fosfato, y un cuarto nucleótido terminal en el extremo 3' de la segunda cadena es un didesoxinucleótido, en el que la primera cadena es de una longitud más larga que aquella de la segunda cadena, y se forma una estructura de cadena doble entre la primera cadena y la segunda cadena; y un primer saliente está ubicado en el extremo 3' de la primera cadena y, opcionalmente, un segundo saliente está ubicado en el extremo 5' de la segunda cadena, el  
35 primer saliente es de una longitud más larga que la del segundo saliente, si está presente, la longitud del primer saliente es de aproximadamente 6 nt a 12 nt y la longitud del segundo saliente, si está presente, es de hasta 4 nt.

En una realización de la presente divulgación, el número de nucleótidos no emparejados entre la segunda cadena y la primera cadena no es más de 3, lo que mejora aún más la eficiencia de ligadura y reduce el coste económico y de tiempo para la construcción de la biblioteca.

40 Como se indicó anteriormente, el oligonucleótido aislado incluye un primer saliente, ubicado en el extremo 3' de la primera cadena; y opcionalmente, un segundo saliente, ubicado en el extremo 5' de la segunda cadena, lo que mejora aún más la eficiencia de ligadura y reduce el coste económico y de tiempo para la construcción de la biblioteca.

45 Además, el primer saliente es de una longitud más larga que la del segundo saliente, lo que mejora aún más la eficiencia de ligadura y reduce el coste económico y de tiempo para la construcción de bibliotecas.

Como se señaló anteriormente, la longitud del primer saliente es de aproximadamente 6 nt a 12 nt, lo que mejora aún más la eficiencia de la ligadura y reduce el coste económico y de tiempo para la construcción de la biblioteca.

La longitud del segundo saliente, si está presente, es de hasta 4 nt, lo que mejora aún más la eficiencia de la ligadura y reduce el coste económico y de tiempo para la construcción de la biblioteca.

50 En una realización de la presente divulgación, la primera y la segunda cadena son ambas ADN.

En una realización de la presente divulgación, la longitud de la primera cadena es de aproximadamente 20 nt a aproximadamente 25 nt, mejorando así la eficiencia de la ligadura y reduciendo el coste económico y de tiempo para la construcción de la biblioteca.

5 En una realización de la presente divulgación, la longitud de la segunda cadena es de aproximadamente 10 nt a aproximadamente 15 nt, mejorando así la eficiencia de la ligadura y reduciendo el coste económico y de tiempo para la construcción de la biblioteca.

10 En una realización de la presente divulgación, la primera cadena tiene una secuencia de 5'GGCTCCGTCTGAAGCCCGACGC3' (SEQ ID NO: 1), y la segunda cadena tiene una secuencia de 5'CTTCGACGGAGCC3' (SEQ ID NO: 2); o la primera cadena tiene una secuencia de 5'ACGTCGGGGCCAAGCGGTCGTC3' (SEQ ID NO: 3), y la segunda cadena tiene una secuencia de 5'TTGGCCCCGGCTT3' (SEQ ID NO: 4), lo que mejora aún más la eficiencia de la ligadura y reduce el coste económico y de tiempo para la construcción de la biblioteca.

15 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende un primer adaptador y un segundo adaptador, siendo cada uno un oligonucleótido aislado de la invención como se describió anteriormente, en el que el primer adaptador es diferente del segundo adaptador.

20 Como se describió anteriormente, el oligonucleótido de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación no puede conectarse con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, un kit de este tipo puede usarse como un adaptador para la construcción de bibliotecas, ligando así diferentes adaptadores al fragmento de ácido nucleico, respectivamente, en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, lo que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de ligadura, así como la reducción de costes económicos y de tiempo para la construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al kit, que no se describe con más detalle en el presente documento.

25 En una realización de la presente divulgación, el kit incluye además un primer ADN de cadena sencilla capaz de emparejarse con una primera cadena del primer adaptador para formar una primera estructura de cadena doble; y un segundo ADN de cadena sencilla capaz de emparejarse con una primera cadena del segundo adaptador para formar una segunda estructura de cadena doble. Por lo tanto, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla durante la construcción de la biblioteca, de modo que se forma una estructura más estable con la primera cadena del primer adaptador y la primera cadena del segundo adaptador. Además, el segundo producto ligado se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla utilizados como cebadores, formando así un fragmento de ADN con adaptadores estables en ambos terminales.

30 En una realización de la presente divulgación, la primera estructura de cadena doble es de una longitud más larga que la de una tercera estructura de cadena doble formada con la primera cadena del primer adaptador y una segunda cadena del primer adaptador; y la segunda estructura de cadena doble es de una longitud más larga que la de una cuarta estructura de cadena doble formada con la primera cadena del segundo adaptador y una segunda cadena del segundo adaptador, mejorando así la eficiencia de ligadura y reduciendo el coste económico y de tiempo para la construcción de la biblioteca.

35 En una realización de la presente divulgación, el kit incluye además un primer cebador que es el mismo que uno del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla; y un segundo cebador con biotina adicional en el extremo 5' en comparación con el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla, lo que mejora aún más la eficiencia de ligadura y reduce el coste económico y de tiempo para la construcción de la biblioteca. Además, la molécula de ácido nucleico de cadena sencilla se puede aislar de manera efectiva por un agente capaz de unirse específicamente con una biotina y se puede usar adicionalmente para construir una biblioteca para una plataforma de secuenciación de CG.

40 En una realización de la presente divulgación, la primera cadena del primer adaptador tiene una secuencia de 5'GGCTCCGTCTGAAGCCCGACGC3' (SEQ ID NO: 1); una segunda cadena del primer adaptador tiene una secuencia de 5'CTTCGACGGAGCC3' (SEQ ID NO: 2); la primera cadena del segundo adaptador tiene una secuencia de 5'ACGTCGGGGCCAAGCGGTCGTC3' (SEQ ID NO: 3); una segunda cadena del segundo adaptador tiene una secuencia de 5'TTGGCCCCGGCTT3' (SEQ ID NO: 4); el primer ADN de cadena sencilla tiene una secuencia de 5'AGACAAGCTC(N)<sub>m</sub>GATCGGGCTTCGACGGAG3', en la que (N)<sub>m</sub> representa una secuencia de etiqueta de una longitud de m nucleótidos, donde m es un número entero de 4 a 10, y N representa adenina (A), timina (T), guanina (G) o citosina (C); y el segundo ADN de cadena sencilla tiene una secuencia de 5'TCCTAAGACCGCTTGGCCCCG3' (SEQ ID NO: 5), lo que mejora aún más la eficiencia de ligadura y reduce el coste económico y de tiempo para la construcción de la biblioteca. Además, la molécula de ácido nucleico de cadena

sencilla se puede aislar de manera efectiva por un agente capaz de unirse específicamente con una biotina y se puede usar adicionalmente para construir una biblioteca para una plataforma de secuenciación de CG.

Uso del oligonucleótido aislado en la secuenciación de ácidos nucleicos

5 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para agregar adaptadores, que comprenden un primer adaptador y un segundo adaptador, a un fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, cada uno de los cuales incluye extremos romos emparejados sin ningún grupo fosfato. Con referencia a la Figura 4, en una realización, el método incluye los siguientes pasos S100 a S400.

S100: el primer adaptador y el segundo adaptador se ligan al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales.

10 El primer adaptador y el segundo adaptador se ligan al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, para obtener un primer producto ligado, en el que el primer adaptador es diferente del segundo adaptador, y el primer adaptador y el segundo adaptador cada adaptador es el oligonucleótido aislado descrito anteriormente.

15 En una realización de la presente divulgación, el primer adaptador y el segundo adaptador están ligados al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales en un paso.

20 En una realización de la presente divulgación, el fragmento de ADN de cadena doble se obtiene mediante los siguientes pasos: fragmentar una muestra de ADN para obtener un producto de fragmentación; desfosforilar el producto de fragmentación para obtener un producto de fragmentación desfosforilado; y la reparación del extremo del producto de fragmentación desfosforilado para obtener el fragmento de ADN de cadena doble, obteniendo así efectivamente el fragmento de ADN adecuado para la construcción de la biblioteca.

En una realización de la presente divulgación, la muestra de ADN es al menos parte del ADN genómico o un producto de transcripción inversa del ARN, de manera que la biblioteca para la secuenciación del ADN o ARN genómico puede construirse de manera efectiva.

25 S200: una segunda cadena del primer adaptador se reemplaza por un primer ADN de cadena sencilla y una segunda cadena del segundo adaptador se reemplaza por un segundo ADN de cadena sencilla.

30 Una segunda cadena del primer adaptador se reemplaza por un primer ADN de cadena sencilla y una segunda cadena del segundo adaptador se reemplaza por un segundo ADN de cadena sencilla, en el que el primer ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del primer adaptador para formar una primera estructura de cadena doble, y el segundo ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del segundo adaptador para formar una segunda estructura de cadena doble.

35 En una realización de la presente divulgación, la primera estructura de cadena doble es de una longitud más larga que la de una tercera estructura de cadena doble formada con la primera cadena del primer adaptador y una segunda cadena del primer adaptador; y la segunda estructura de cadena doble es de una longitud más larga que la de una cuarta estructura de cadena doble formada con la primera cadena del segundo adaptador y una segunda cadena del segundo adaptador, mejorando así la eficiencia de la secuenciación, y reduciendo el coste de la secuenciación.

40 En una realización de la presente divulgación, la primera cadena del primer adaptador tiene una secuencia de 5'GGCTCCGTCGAAGCCCGACGC3' (SEQ ID NO: 1); una segunda cadena del primer adaptador tiene una secuencia de 5'CTTCGACGGAGCC3' (SEQ ID NO: 2); la primera cadena del segundo adaptador tiene una secuencia de 5'ACGTCGGGGCCAAGCGGTCGTC3' (SEQ ID NO: 3); una segunda cadena del segundo adaptador tiene una secuencia de 5'TTGCCCCCGGCTT3' (SEQ ID NO: 4); el primer ADN de cadena sencilla tiene una secuencia de 5'AGACAAGCTC(N)<sub>m</sub>GATCGGGCTTCGACGGAG3', en la que (N)<sub>m</sub> representa una secuencia de etiqueta de una longitud de m nucleótidos, donde m es un número entero de 4 a 10, y N representa adenina (A), timina (T), guanina (G) o citosina (C); y el segundo ADN de cadena sencilla tiene una secuencia de 5'TCCTAAGACCGCTTGGCCCCG3' (SEQ ID NO: 5), lo que mejora aún más la eficiencia de la secuenciación y reduce el coste de la secuenciación. Además, la molécula de ácido nucleico de cadena sencilla se puede aislar de manera efectiva por un agente capaz de unirse específicamente con una biotina y se puede usar adicionalmente para construir una biblioteca para una plataforma de secuenciación de CG.

50 En una realización de la presente divulgación, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla por medio de hibridación por desnaturalización térmica. En una realización específica de la presente divulgación, la desnaturalización térmica se realiza a aproximadamente 60 °C, mejorando así la eficiencia de la ligadura y reduciendo el coste económico y de tiempo para la construcción de la biblioteca.

S300: el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla están conectados al fragmento de ADN de cadena doble, respectivamente, en dos terminales.

El primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla están conectados al fragmento de ADN de cadena doble, respectivamente, en dos terminales, para obtener un segundo producto ligado.

- 5 En una realización de la presente divulgación, el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla están conectados al fragmento de ADN de cadena doble, respectivamente, en dos terminales por medio de traducción de muescas.

S400: el segundo producto ligado se amplifica con un primer cebador y un segundo cebador.

- 10 El segundo producto ligado se amplifica con un primer cebador y un segundo cebador para obtener un producto amplificado, en el que el producto amplificado es un fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales, el primer cebador contiene la misma secuencia que la del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla, y el segundo cebador contiene la misma secuencia que el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla y contiene biotina adicional en el extremo 5' en comparación con el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla.

- 15 Como se describió anteriormente, el oligonucleótido de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación no puede conectarse con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, tal oligonucleótido puede usarse como un adaptador para la construcción de bibliotecas, ligando así diferentes adaptadores a un fragmento de ácido nucleico respectivamente en  
20 dos terminales durante la construcción de la biblioteca, que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de ligadura, así como la reducción del coste económico y de tiempo para la construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al método, que no se describe con más detalle en el presente documento. Además, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de  
25 cadena sencilla durante la construcción de la biblioteca, de modo que se forma una estructura más estable con la primera cadena del primer adaptador y la primera cadena del segundo adaptador. Además, el segundo producto ligado se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla utilizados como cebadores, formando así un fragmento de ADN con adaptadores  
30 estables en ambos terminales.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para construir una biblioteca para secuenciar un fragmento de ADN de cadena doble con dos terminales, cada uno de los cuales comprende extremos romos emparejados sin ningún grupo fosfato. El método comprende los siguientes pasos.

- 35 En primer lugar, el primer adaptador y el segundo adaptador se ligan al ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales por el método para agregar adaptadores descritos anteriormente, para obtener un fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales.

- En segundo lugar, se aísla un fragmento de ADN de cadena sencilla del fragmento de ADN ligado con los adaptadores primero y segundo, respectivamente, en dos terminales. En una realización de la presente divulgación, la separación del fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales en los fragmentos de ADN de cadena sencilla incluye además: poner en contacto el fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales con perlas magnéticas para formar un complejo de perla magnética-ADN, en el cual la perla magnética está recubierta con estreptavidina; y exponer el complejo de ADN-perla magnética a una solución con un valor de pH superior a 7 para obtener el fragmento de ADN de cadena sencilla, aislando así efectivamente el fragmento de ADN de cadena sencilla, para mejorar la eficiencia de la  
40 construcción de la biblioteca y reducir el coste de construcción de bibliotecas. En una realización de la presente divulgación, la solución que tiene un valor de pH superior a 7 es una solución de hidróxido de sodio. En una realización de la presente divulgación, la solución de hidróxido de sodio tiene una concentración de aproximadamente 0,5 M a 2 M. En una realización de la presente divulgación, la solución de hidróxido de sodio tiene una concentración de aproximadamente 1 M. En una realización de la presente divulgación, el fragmento de ADN de  
45 cadena sencilla se aísla del fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores, respectivamente, a dos terminales que han sido seleccionados por adelantado, construyendo así la biblioteca para secuenciar una región predeterminada. En una realización de la presente divulgación, el fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales se selecciona por contacto con una sonda, en la que la sonda es específica para una secuencia predeterminada. En una realización de la presente divulgación, la sonda se proporciona en forma de matriz de microchip. Por lo tanto, el fragmento de ADN de cadena sencilla se puede ciclar eficazmente.  
50  
55

Posteriormente, el fragmento de ADN de cadena sencilla se cicla para obtener un bucle de ADN de cadena sencilla, en el que el bucle de ADN de cadena sencilla constituye la biblioteca para la secuenciación del fragmento de ADN

de cadena doble con dos terminales. En una realización de la presente divulgación, el fragmento de ADN de cadena sencilla se cicla con una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla, en la que la molécula de ácido nucleico de cadena sencilla incluye una primera región y una segunda región, la primera región es capaz de emparejarse con nucleótidos terminales en el extremo 5' o en el extremo 3' del fragmento de ADN de cadena sencilla, y la segunda región es capaz de emparejarse con nucleótidos terminales en el extremo 5' o en el extremo 3' del fragmento de ADN de cadena sencilla, lo que mejora aún más la eficiencia de ciclado. En una realización de la presente divulgación, la primera región está conectada en forma adyacente a la segunda región. En una realización de la presente divulgación, la primera región tiene una secuencia de 5'TCGAGCTTGTCT3' (SEQ ID NO: 6); y la segunda región tiene una secuencia de 5'TCCTAAGACCGC3' (SEQ ID NO: 7).

Como se describió anteriormente, el oligonucleótido de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación no puede conectarse con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, tal oligonucleótido puede usarse como un adaptador para la construcción de bibliotecas, ligando así diferentes adaptadores a un fragmento de ácido nucleico respectivamente en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de ligadura, así como la reducción del coste económico y de tiempo para la construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al método, que no se describe con más detalle en el presente documento. Además, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla durante la construcción de la biblioteca, de modo que se forma una estructura más estable con la primera cadena del primer adaptador y la primera cadena del segundo adaptador. Además, el segundo producto ligado se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla utilizados como cebadores, formando así un fragmento de ADN con adaptadores estables en ambos terminales. Posteriormente, un fragmento de ADN de cadena sencilla se aísla y se cicla, de modo que la biblioteca se puede obtener de manera eficiente, por ejemplo, una biblioteca para una plataforma de secuenciación de CG.

En un quinto aspecto, la presente divulgación proporciona en realizaciones un método para secuenciar ácidos nucleicos. Dicho método incluye: construir una biblioteca mediante el método de construcción de la biblioteca para secuenciar el fragmento de ADN de cadena doble; y secuenciar la biblioteca. En una realización de la presente divulgación, la biblioteca se secuenció en una plataforma de secuenciación de Complete Genomics (CG).

Como se describió anteriormente, el oligonucleótido de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación no puede conectarse con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, tal oligonucleótido puede usarse como un adaptador para la construcción de bibliotecas, ligando así diferentes adaptadores a un fragmento de ácido nucleico respectivamente en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de ligadura, así como la reducción del coste económico y de tiempo para la construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al método, que no se describe con más detalle en el presente documento. Además, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla durante la construcción de la biblioteca, de modo que se forma una estructura más estable con la primera cadena del primer adaptador y la primera cadena del segundo adaptador. Además, el segundo producto ligado se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla utilizados como cebadores, formando así un fragmento de ADN con adaptadores estables en ambos terminales. Posteriormente, un fragmento de ADN de cadena sencilla se aísla y se cicla, de modo que la biblioteca se puede obtener de manera eficiente, por ejemplo, una biblioteca para una plataforma de secuenciación de CG, lo que mejora aún más la eficiencia de la secuenciación y reduce el coste de la secuenciación.

En un sexto aspecto, la presente divulgación proporciona como una realización de la invención un dispositivo para agregar adaptadores, que comprende un primer adaptador y un segundo adaptador, a un fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, cada uno de los cuales incluye extremos romos emparejados sin ningún grupo de fosfato. Con referencia a la Figura 5, en algunas realizaciones, el dispositivo 100 incluye: una primera unidad 101 de ligadura, una unidad 102 de sustitución, una segunda unidad 103 de ligadura y una unidad 104 de amplificación.

La primera unidad 101 de ligadura se configura para ligar el primer adaptador y el segundo adaptador al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, para obtener un primer producto ligado, en el que el primer adaptador es diferente del segundo adaptador, y el primer adaptador y el segundo adaptador son cada uno un oligonucleótido aislado de la invención como se describió anteriormente. En una realización de la presente divulgación, el primer adaptador y el segundo adaptador se ligan al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales en un paso.

La unidad 102 de reemplazo se configura para reemplazar una segunda cadena del primer adaptador por un primer ADN de cadena sencilla y reemplazar una segunda cadena del segundo adaptador por un segundo ADN de cadena sencilla, en el que el primer ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del primer adaptador para formar una primera estructura de cadena doble, y el segundo ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del segundo adaptador para formar una segunda estructura de cadena doble. En una realización de la presente divulgación, la primera estructura de cadena doble es de una longitud más larga que la de una tercera estructura de cadena doble formada con la primera cadena del primer adaptador y una segunda cadena del primer adaptador; y la segunda estructura de cadena doble es de una longitud más larga que la de una cuarta estructura de cadena doble formada con la primera cadena del segundo adaptador y una segunda cadena del segundo adaptador, mejorando así la eficiencia de ligadura y reduciendo el coste económico y de tiempo para la construcción de la biblioteca. En una realización de la presente divulgación, la primera cadena del primer adaptador tiene una secuencia de 5'GGCTCCGTCGAAGCCCGACGC3' (SEQ ID NO: 1); una segunda cadena del primer adaptador tiene una secuencia de 5'CTTCGACGGAGCC3' (SEQ ID NO: 2); la primera cadena del segundo adaptador tiene una secuencia de 5'ACGTCGGGGCCAAGCGGTCGTC3' (SEQ ID NO: 3); una segunda cadena del segundo adaptador tiene una secuencia de 5'TTGGCCCCGGCTT3' (SEQ ID NO: 4); el primer ADN de cadena sencilla tiene una secuencia de 5'AGACAAGCTC(N)<sub>m</sub>GATCGGGCTTCGACGGAG3', en la que (N)<sub>m</sub> representa una secuencia de etiqueta de una longitud de m nucleótidos, en la que m es un número entero de 4 a 10, y N representa adenina (A), timina (T), guanina (G) o citosina (C); y el segundo ADN de cadena sencilla tiene una secuencia de 5'TCCTAAGACCGCTTGGCCCCG3' (SEQ ID NO: 5), lo que mejora aún más la eficiencia de ligadura y reduce el coste económico y de tiempo para la construcción de la biblioteca. Además, la molécula de ácido nucleico de cadena sencilla se puede aislar de manera efectiva por un agente capaz de unirse específicamente con una biotina y se puede usar adicionalmente para construir una biblioteca para una plataforma de secuenciación de CG.

En una realización de la presente divulgación, la unidad 102 de reemplazo se configura para reemplazar la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla por medio de hibridación por desnaturalización térmica. En una realización de la presente divulgación, la desnaturalización térmica se realiza a aproximadamente 60 °C, mejorando así la eficiencia de la ligadura y reduciendo el coste económico y de tiempo para la construcción de la biblioteca.

La segunda unidad 103 de ligadura se configura para conectar el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, para obtener un segundo producto ligado. En una realización de la presente divulgación, la segunda unidad 103 de ligadura se configura para conectar el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales por medio de la traducción de muescas.

La unidad 104 de amplificación se configura para amplificar el segundo producto ligado con un primer cebador y un segundo cebador para obtener un producto amplificado, en el que el primer cebador contiene la misma secuencia que uno del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla, y el segundo cebador contiene la misma secuencia que el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla y contiene biotina adicional en el extremo 5' en comparación con el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla.

En una realización de la presente divulgación, el dispositivo incluye además una unidad de obtención de fragmentos de ADN de cadena doble (no se muestra en los dibujos) y la unidad de obtención de fragmentos de ADN de cadena doble incluye: un montaje de fragmentación configurado para fragmentar una muestra de ADN para obtener un producto de fragmentación; un montaje de desfosforilación configurado para desfosforilar el producto de fragmentación para obtener un producto de fragmentación desfosforilado; y un montaje de reparación del extremo configurado para reparar el extremo del producto de fragmentación desfosforilado para obtener el fragmento de ADN de cadena doble, obteniendo así efectivamente el fragmento de ADN de cadena doble para la construcción de la biblioteca.

En una realización de la presente divulgación, la unidad de obtención de fragmentos de ADN de cadena doble incluye además: un montaje de extracción de ADN genómico configurado para extraer ADN genómico de una muestra biológica; y/o un montaje de transcripción inversa configurado para someter una muestra de ARN a una transcripción inversa para obtener un producto de transcripción inversa, en el que al menos parte del ADN genómico y/o el producto de la transcripción inversa constituye la muestra de ADN, construyendo así efectivamente la biblioteca para la secuenciación de ADN o ARN genómico.

Como se describió anteriormente, el oligonucleótido de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación no puede conectarse con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, tal oligonucleótido puede usarse como un adaptador para la construcción de bibliotecas, ligando así diferentes adaptadores a un fragmento de ácido nucleico respectivamente en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de ligadura, así como la reducción del coste económico y de tiempo para la

construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al dispositivo, que no se describe con más detalle en el presente documento. Además, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla durante la construcción de la biblioteca, de modo que se forma una estructura más estable con la primera cadena del primer adaptador y la primera cadena del segundo adaptador. Además, el segundo producto ligado se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla utilizados como cebadores, formando así un fragmento de ADN con adaptadores estables en ambos terminales.

5 En un séptimo aspecto, la presente divulgación proporciona como una realización de la invención un dispositivo para construir una biblioteca para secuenciar un fragmento de ADN de cadena doble con dos terminales, cada uno de los cuales comprende extremos romos emparejados sin ningún grupo fosfato. Con referencia a la Figura 6, en algunas realizaciones, el dispositivo incluye: el dispositivo 100 para agregar adaptadores, un dispositivo 200 de aislamiento de fragmentos de ADN de cadena sencilla y un dispositivo 300 de ciclado.

10 El dispositivo 100 para agregar adaptadores se configura para unir el primer adaptador y el segundo adaptador al ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, para obtener un fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales. El dispositivo 200 de aislamiento del fragmento de ADN de cadena sencilla está configurado para aislar un ADN de cadena sencilla del fragmento de ADN ligado con los adaptadores primero y segundo, respectivamente, en dos terminales. El dispositivo 300 de ciclado está configurado para ciclar el fragmento de ADN de cadena sencilla para obtener un bucle de ADN de cadena sencilla, en el que el bucle de ADN de cadena sencilla constituye la biblioteca para secuenciar el fragmento de ADN de cadena doble con dos terminales.

15 En una realización de la presente divulgación, el dispositivo 200 de aislamiento de fragmentos de ADN de cadena sencilla incluye además: una unidad de captura provista de perlas magnéticas, y configurada para poner en contacto el fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales con perlas magnéticas, para formar un complejo de perla magnética-ADN, en el que la perla magnética está recubierta con estreptavidina; y una unidad de lisis provista con una solución que tiene un valor de pH superior a 7, y configurada para exponer el complejo de perla magnética-ADN a la solución, para obtener el fragmento de ADN de cadena sencilla, aislando así efectivamente el fragmento de ADN de cadena sencilla, a fin de mejorar la eficiencia de la construcción de bibliotecas y reducir los costes para la construcción de bibliotecas. En una realización de la presente divulgación, la solución que tiene un valor de pH superior a 7 es una solución de hidróxido de sodio. En una realización de la presente divulgación, la solución de hidróxido de sodio tiene una concentración de aproximadamente 0,5 M a 2 M. En otra realización de la presente divulgación, la solución de hidróxido de sodio tiene una concentración de aproximadamente 1 M.

20 En una realización de la presente divulgación, el dispositivo incluye además un dispositivo de selección (no mostrado en los dibujos). El dispositivo de selección se configura para seleccionar el fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales, a partir de los cuales el fragmento de ADN de cadena sencilla se aísla posteriormente. En una realización de la presente divulgación, el dispositivo de selección está provisto de una sonda, en la que la sonda es específica de una secuencia predeterminada. En una realización de la presente divulgación, la secuencia predeterminada incluye al menos un exón. En una realización de la presente divulgación, la sonda se proporciona en forma de matriz de microchip.

25 En una realización de la presente divulgación, el dispositivo 300 de ciclado está provisto de una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla, en la que la molécula de ácido nucleico de cadena sencilla incluye una primera región y una segunda región, la primera región es capaz de emparejarse con los nucleótidos terminales en el extremo 5' o el extremo 3' del fragmento de ADN de cadena sencilla, y la segunda región es capaz de emparejarse con los nucleótidos terminales en el extremo 5' o el extremo 3' del fragmento de ADN de cadena sencilla. En una realización de la presente divulgación, la primera región está conectada en forma adyacente a la segunda región. En una realización de la presente divulgación, la primera región tiene una secuencia de 5'TCGAGCTTGTCT3' (SEQ ID NO: 6), y la segunda región tiene una secuencia de 5'TCCTAAGACCGC3' (SEQ ID NO: 7). Por lo tanto, el fragmento de ADN de cadena sencilla se puede ciclar eficazmente.

30 Como se describió anteriormente, el oligonucleótido de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación no puede conectarse con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, tal oligonucleótido puede usarse como un adaptador para la construcción de bibliotecas, ligando así diferentes adaptadores a un fragmento de ácido nucleico respectivamente en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de ligadura, así como la reducción del coste económico y de tiempo para la construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al dispositivo, que no se describe con más detalle en el presente documento. Además, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de

cadena sencilla durante la construcción de la biblioteca, de modo que se forma una estructura más estable con la primera cadena del primer adaptador y la primera cadena del segundo adaptador. Además, el segundo producto ligado se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla utilizados como cebadores, formando así un fragmento de ADN con adaptadores estables en ambos terminales. Posteriormente, un fragmento de ADN de cadena sencilla se aísla y se cicla, de modo que la biblioteca se puede obtener de manera eficiente, por ejemplo, una biblioteca para una plataforma de secuenciación de CG.

En un octavo aspecto, la presente divulgación proporciona en realizaciones un sistema para la secuenciación de ácidos nucleicos. Con referencia a la Figura 7, en algunas realizaciones, el sistema 1000 incluye: el dispositivo 1000 para construir la biblioteca para secuenciar el fragmento de ADN de cadena doble descrito anteriormente; y un dispositivo 2000 de secuenciación configurado para secuenciar la biblioteca. En una realización de la presente divulgación, el dispositivo 2000 de secuenciación es una plataforma de secuenciación de CG.

Como se describió anteriormente, el oligonucleótido de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación no puede conectarse con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, tal oligonucleótido puede usarse como un adaptador para la construcción de bibliotecas, ligando así diferentes adaptadores a un fragmento de ácido nucleico respectivamente en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de ligadura, así como la reducción del coste económico y de tiempo para la construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al sistema, que no se describe con más detalle en el presente documento. Además, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla durante la construcción de la biblioteca, de modo que se forma una estructura más estable con la primera cadena del primer adaptador y la primera cadena del segundo adaptador. Además, el segundo producto ligado se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla utilizados como cebadores, formando así un fragmento de ADN con adaptadores estables en ambos terminales. Posteriormente, un fragmento de ADN de cadena sencilla se aísla y se cicla, de modo que la biblioteca se puede obtener de manera eficiente, por ejemplo, una biblioteca para una plataforma de secuenciación de CG, lo que mejora aún más la eficiencia de la secuenciación y reduce el coste de la secuenciación.

En un noveno aspecto, la presente divulgación proporciona en realizaciones un dispositivo para construir una biblioteca para secuenciar ADN genómico. En algunas realizaciones, el dispositivo incluye: una primera unidad configurada para fragmentar la muestra de ADN genómico para obtener un producto de fragmentación; una segunda unidad configurada para desfosforilar el producto de fragmentación para obtener un producto de fragmentación desfosforilado; una tercera unidad configurada para reparar el extremo del producto de fragmentación desfosforilado para obtener el fragmento de ADN de cadena doble; una cuarta unidad configurada para ligar el primer adaptador y el segundo adaptador al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, para obtener un primer producto ligado, en el que el primer adaptador es diferente del segundo adaptador, y el primer adaptador y el segundo adaptador cada uno son el oligonucleótido aislado descrito anteriormente; una quinta unidad configurada para reemplazar una segunda cadena del primer adaptador por un primer ADN de cadena sencilla y reemplazar una segunda cadena del segundo adaptador por un segundo ADN de cadena sencilla, en el que el primer ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del primer adaptador para formar una primera estructura de cadena doble, y el segundo ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del segundo adaptador para formar una segunda estructura de cadena doble; una sexta unidad configurada para conectar el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, para obtener un segundo producto ligado; una séptima unidad configurada para amplificar el segundo producto ligado con un primer cebador y un segundo cebador para obtener un producto amplificado, en el cual el producto amplificado es un fragmento de ADN ligado con los adaptadores primero y segundo respectivamente en dos terminales, el primer cebador contiene la misma secuencia que uno del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla, y el segundo cebador contiene la misma secuencia que el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla y contiene biotina adicional en el extremo 5' en comparación con el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla; una octava unidad configurada para aislar un fragmento de ADN de cadena sencilla del fragmento de ADN ligado con los adaptadores primero y segundo respectivamente en dos terminales; y una novena unidad configurada para ciclar el fragmento de ADN de cadena sencilla para obtener un bucle de ADN de cadena sencilla, en el que el bucle de ADN de cadena sencilla constituye la biblioteca para secuenciar el ADN genómico.

Como se describió anteriormente, el oligonucleótido de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación no puede conectarse con otros fragmentos de ácido nucleico en los extremos 3' de la primera y segunda cadenas debido al didesoxinucleótido, o en el extremo 5' de la segunda cadena sin el grupo fosfato, evitando así que los oligonucleótidos se conecten entre sí. Por consiguiente, tal oligonucleótido puede usarse como un adaptador en la construcción de la biblioteca, ligando así diferentes adaptadores a un fragmento de ácido nucleico respectivamente

5 en dos terminales durante la construcción de la biblioteca, que no solo evita que los adaptadores se conecten entre sí, sino que también mejora la eficiencia de ligadura así como la reducción de costes económicos y de tiempo para la construcción de bibliotecas. Las descripciones en cuanto a las características y ventajas del oligonucleótido aislado de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación también son aplicables al dispositivo, que no se describe con más detalle en el presente documento. Además, la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla durante la construcción de la biblioteca, de modo que se forma una estructura más estable con la primera cadena del primer adaptador y la primera cadena del segundo adaptador. Además, el segundo producto ligado se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla utilizados como cebadores, formando así un fragmento de ADN con adaptadores estables en ambos terminales. Posteriormente, un fragmento de ADN de cadena sencilla se aísla y se cicla, de modo que la biblioteca se puede obtener de manera eficiente, por ejemplo, una biblioteca para una plataforma de secuenciación de CG.

15 En una realización de la presente divulgación, el primer adaptador y el segundo adaptador están ligados al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales en un paso.

En una realización de la presente divulgación, el dispositivo incluye además una décima unidad configurada para extraer el ADN genómico de una muestra biológica; y/o una undécima unidad configurada para someter el ARN a la transcripción inversa para obtener un producto de transcripción inversa, en el que al menos parte del ADN genómico y/o el producto de transcripción inversa constituyen la muestra de ADN.

20 En una realización de la presente divulgación, la octava unidad está además configurada para: contactar el fragmento de ADN ligado con los adaptadores primero y segundo respectivamente en dos terminales con perlas magnéticas, para formar un complejo de perla magnética-ADN, en el que la perla magnética está recubierta con estreptavidina; y exponer el complejo de perla magnética-ADN a una solución con un valor de pH superior a 7 para obtener el fragmento de ADN de cadena sencilla, aislando así efectivamente el fragmento de ADN de cadena sencilla, a fin de mejorar la eficiencia de la construcción de la biblioteca y reducir el coste de construcción de bibliotecas.

25 En una realización de la presente divulgación, el dispositivo incluye además una duodécima unidad configurada para seleccionar el fragmento de ADN ligado con los adaptadores primero y segundo respectivamente en dos terminales, a partir de los cuales el fragmento de ADN de cadena sencilla se aísla posteriormente. En una realización de la presente divulgación, el fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales se selecciona por contacto con una sonda, en la que la sonda es específica de una secuencia predeterminada. En una realización de la presente divulgación, la secuencia predeterminada incluye al menos un exón. En una realización de la presente divulgación, la sonda se proporciona en forma de matriz de microchip.

30 En una realización de la presente divulgación, la novena unidad se configura además para ciclar el fragmento de ADN de cadena sencilla con una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla, en la que la molécula de ácido nucleico de cadena sencilla comprende una primera región y una segunda región, la primera región es capaz de emparejarse con nucleótidos terminales en el extremo 5' o el extremo 3' del fragmento de ADN de cadena sencilla, y la segunda región es capaz de emparejarse con nucleótidos terminales en el extremo 5' o el extremo 3' del fragmento de ADN de cadena sencilla, con lo que se cicla efectivamente el fragmento de ADN de cadena sencilla con la molécula de ácido nucleico de cadena sencilla.

35 En conclusión, la solución técnica de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación tiene al menos una de las siguientes ventajas.

40 En primer lugar, la solución técnica de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación ha reducido los pasos de ligadura del adaptador en comparación con el método existente para construir la biblioteca para una plataforma de secuenciación de Complete Genomics.

45 En diversas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un nuevo método para agregar diferentes adaptadores al fragmento de ADN respectivamente en dos terminales en un paso, en lugar de en los respectivos pasos múltiples comúnmente utilizadas en el método tradicional.

50 En diversas realizaciones de la presente divulgación, también se hace posible evitar la autoconexión del adaptador, la interconexión de fragmentos, etc., incluso cuando se ligan simultáneamente dos adaptadores diferentes a un fragmento de ADN, respectivamente, en dos terminales. Sin embargo, el adaptador para su uso en la presente divulgación está diseñado con una secuencia única y se liga mediante un método novedoso, que evita la interconexión de fragmentos y la autoconexión del adaptador, mejora la eficiencia de la ligadura y proporciona una posición en la que se introduce la secuencia de la etiqueta, por lo tanto reduciendo grandemente los pasos de ligadura del adaptador, acortando el período de ligadura del adaptador y reduciendo significativamente el coste.

55 En diversas realizaciones de la presente divulgación, este método original de ligadura con adaptador se combina con tecnología para capturar ácidos nucleicos con una sonda. Al modificar y ajustar aún más el protocolo tradicional de construcción de una biblioteca para la plataforma de secuenciación de Complete Genomics, diferentes

adaptadores se ligan sucesivamente al fragmento de ADN respectivamente en dos terminales en un paso, en lugar de en dos pasos, lo que acorta significativamente el período para la construcción de la biblioteca y reducción del coste correspondiente. Además, todo un producto de secuenciación del exoma se crea con éxito con un solo adaptador con base en la plataforma de secuenciación de CG.

5 Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente divulgación, con referencia a la Figura 1, se construye una biblioteca como en los siguientes pasos:

1. fragmentar el ácido nucleico genómico para obtener fragmentos;

2. desfosforilar un fragmento objetivo para bloquear el extremo 5' del fragmento objetivo, a fin de evitar que los fragmentos se unan entre sí;

10 3. reparar el extremo de cada terminal del fragmento objetivo, dando como resultado extremos romos emparejados (indicados por 2 como se muestra en la Figura 1);

15 4. Ligar el adaptador A (indicado por 3 como se muestra en la Figura 1) y el adaptador B (indicado por 4 como se muestra en la Figura 1) al fragmento objetivo, respectivamente, en dos terminales, en los que el adaptador A y el adaptador B cada uno son polinucleótidos que consisten en una cadena larga (una primera cadena) y una cadena corta (una segunda cadena). Debido a que tiene un grupo fosfato en el extremo 5', la cadena larga puede ligarse al fragmento reparado en el extremo; mientras que la cadena corta se empareja con la cadena larga mediante el emparejamiento de bases complementarias. Sin embargo, la cadena corta no se ligará al fragmento reparado en el extremo porque ambos extremos de la cadena corta son secuencias de bloqueo;

20 5. agregar un ácido nucleico de cadena sencilla C (indicado por 5 como se muestra en la Figura 1) y un ácido nucleico de cadena sencilla D (indicado por 7 como se muestra en la Figura 1), en el que el ácido nucleico de cadena sencilla C tiene una secuencia de etiqueta (indicada por 6 como se muestra en la Figura 1) y otra parte del ácido nucleico de cadena sencilla C se empareja con la cadena larga del adaptador A; mientras que el ácido nucleico de cadena sencilla D se empareja con la cadena larga del adaptador B; después del proceso de hibridación, la cadena corta del adaptador respectivo, que se combina de manera débil, se elimina; y los ácidos nucleicos de cadena sencilla C y D se emparejan de manera complementaria con la cadena larga respectiva del adaptador, de modo que los ácidos nucleicos de cadena sencilla C y D se ligan al fragmento objetivo después de la extensión y la ligación.

25 6. amplificar un producto resultante obtenido en el paso 5 (como plantilla) con los ácidos nucleicos de cadena sencilla C y D como cebadores mediante la reacción en cadena de la polimerasa, enriqueciendo así un producto con una secuencia de etiqueta;

30 7. capturar un producto resultante obtenido en el paso 6 mediante hibridación con una sonda oligonucleotídica, que incluye específicamente la hibridación con la sonda, eluyendo un producto hibridado y enriqueciendo el producto hibridado;

35 8. seleccionar los ácidos nucleicos de cadena doble después de la captura por hibridación en función de su longitud (opcionalmente);

9. separar el ácido nucleico de cadena doble seleccionado en dos fragmentos de ácido nucleico de cadena sencilla a través de la biotina que solo existe en una de las cadenas dobles del ácido nucleico;

10. ciclar el fragmento de ácido nucleico de cadena sencilla y eliminar el fragmento de ácido nucleico de cadena sencilla no ciclado.

40 Debe observarse que el paso de selección con base en la longitud de los ácidos nucleicos se puede realizar después de otros pasos antes del paso 9 de separación del ácido nucleico de cadena doble seleccionado en dos fragmentos de ácido nucleico de cadena sencilla, dependiendo del requerimiento específico para secuenciar y el tamaño real de los fragmentos resultantes de diferentes pasos. Si los fragmentos resultantes de diferentes pasos siempre cumplen con el requisito de longitud, el paso 8 se puede omitir.

45 La secuenciación completa del exoma se puede lograr introduciendo el paso 7.

En una realización de la presente divulgación, después del tratamiento de bloqueo del extremo por medio de la desfosforilación en los pasos 2 y 3, el fragmento de ácido nucleico objetivo se convierte en un fragmento que tiene dos terminales bloqueadas, cada uno de los cuales es un par de extremos romos, evitando así que los fragmentos se ligan entre sí completamente y asegurando una alta unificación de los fragmentos antes de la ligadura.

50 En una realización de la presente divulgación, el adaptador utilizado en este documento está diseñado para haber introducido un grupo fosfato en la cadena larga en el extremo 5', así como introducido secuencias de bloqueo en la cadena larga en el extremo 3' y la cadena corta en ambos extremos. Debido a las secuencias de bloqueo, estos extremos bloqueados son incapaces de ligarse al fragmento de ácido nucleico objetivo u otros adaptadores agregados simultáneamente, de modo que se garantiza que el adaptador está ligado al extremo 3' del fragmento

objetivo de manera precisa y solo con el extremo 5' cuando se ligan los adaptadores en el paso 4, evitando así efectivamente que los adaptadores se ligen entre sí, lo que permite que se ligen diferentes adaptadores al mismo tiempo y garantizar la eficiencia de la ligación.

5 En algunas realizaciones de la presente divulgación, el adaptador que consiste en una cadena larga y una cadena corta como se describió anteriormente se unifica de tal manera que la cadena corta se separará de la cadena larga a una temperatura relativamente moderada debido a la inestabilidad de combinación con unas pocas bases emparejadas complementarias entre ellas; después de un hibridación lento, la cadena larga se empareja con el ácido nucleico de cadena sencilla C o D que tiene una mejor capacidad de emparejamiento complementario debido a la secuencia más larga; y se proporciona una etiqueta de reconocimiento al mismo tiempo introduciendo una  
10 secuencia de etiqueta en el ácido nucleico de cadena sencilla C. Con el adaptador diseñado en las formas anteriores simplemente se requiere una condición moderada para la reacción, el reemplazo de fragmentos, la ligadura y la extensión pueden llevarse a cabo en un paso (por ejemplo, como se muestra en el paso 5) mediante el ajuste de un sistema de reacción, un período de reacción y órdenes de reacción según corresponda, lo que da como resultado operaciones simples y una reacción rápida, lo que reduce considerablemente el período de procesamiento.

15 En diversas realizaciones de la presente divulgación, dos adaptadores diferentes se ligan a los fragmentos de ADN respectivamente en dos terminales dentro de tres pasos (es decir, ligadura de adaptador, traducción del corte y reacción en cadena de la polimerasa), en lugar de los cinco pasos tradicionales, que en gran medida reduce las operaciones y reduce los reactivos utilizados para dos pasos adicionales, ahorrando así una gran cantidad de tiempo y coste.

20 Según diversas realizaciones de la presente divulgación, no solo se modifican completamente los pasos específicos para la ligadura del adaptador, sino que también se ha modificado sustancialmente el protocolo tradicional de construcción de bibliotecas para una plataforma de secuenciación de CG para proporcionar una biblioteca novedosa que consiste en ácidos nucleicos de cadena sencilla (indicados por 8 como se muestra en la Figura 1), de modo que dos adaptadores diferentes se ligan a los fragmentos de ADN respectivamente en dos terminales en un paso,  
25 simplificados a partir de dos pasos de ligadura del adaptador en el protocolo tradicional, reduciendo así los tiempos de reacciones en cadena de la polimerasa y mejorando la calidad de la secuenciación. Más importante aún, la simplificación de los pasos permite que el período de construcción de la biblioteca se reduzca de 3 a 4 días, lo que resulta en una reducción significativa en el coste, lo que tiene una gran ventaja en comparación con el protocolo tradicional para la construcción de la biblioteca.

30 De acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación, un protocolo de alta eficacia para la construcción de bibliotecas de exoma completo humano para una plataforma de secuenciación de CG se desarrolla y proporciona con éxito modificando y complementando el protocolo tradicional de construcción de biblioteca para una plataforma de secuenciación de CG y combinando el nuevo método de ligamiento del adaptador descrito anteriormente. Además, también se proporciona por primera vez un nuevo producto para secuenciar un exoma completo humano  
35 en una plataforma de secuenciación de CG, logrando así un gran avance de la secuenciación del exoma completo en una plataforma de secuenciación de CG desde la nada.

Se hará referencia en detalle a ejemplos de la presente divulgación. Los expertos en la técnica apreciarán que los siguientes ejemplos son explicativos y no pueden interpretarse como limitantes del alcance de la presente divulgación. Si la tecnología o las condiciones específicas no se especifican en los ejemplos, se realizará un paso de acuerdo con las técnicas o condiciones descritas en la bibliografía de la técnica (por ejemplo, refiriéndose a J. Sambrook, et al. (Traducido por Huang PT), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª Ed., Science Press) o de acuerdo con las instrucciones del producto. Si no se especifican los fabricantes de reactivos o instrumentos, los reactivos o instrumentos pueden estar disponibles comercialmente.

#### Método general

45 Con referencia a la Figura 1, en una realización de la presente divulgación, se construye una biblioteca de acuerdo con los siguientes pasos:

1. fragmentar el ácido nucleico genómico para obtener fragmentos;
2. desfosforilar un fragmento objetivo para bloquear el extremo 5' del fragmento objetivo, para evitar que los fragmentos se ligen entre sí;
- 50 3. reparar el extremo de cada terminal del fragmento objetivo, dando como resultado extremos romos emparejados (indicados por 2 como se muestra en la Figura 1);
4. ligar el adaptador A (indicado por 3 como se muestra en la Figura 1) y el adaptador B (indicado por 4 como se muestra en la Figura 1) al fragmento objetivo, respectivamente, en dos terminales, en los que el adaptador A y el adaptador B cada uno son polinucleótidos que consisten en una cadena larga (una primera cadena) y una cadena  
55 corta (una segunda cadena). Debido a que tiene un grupo fosfato en el extremo 5', la cadena larga puede ligarse al fragmento reparado en el extremo; mientras que la cadena corta está emparejada con la cadena larga mediante un

par de bases complementarias. Sin embargo, la cadena corta no se ligará al fragmento reparado en el extremo debido a un extremo bloqueado;

5. agregar un ácido nucleico de cadena sencilla C (indicado por 5 como se muestra en la Figura 1) y un ácido nucleico de cadena sencilla D (indicado por 7 como se muestra en la Figura 1), en el que el ácido nucleico de cadena sencilla C tiene una secuencia de etiqueta (indicada por 6 como se muestra en la Figura 1) y otra parte del ácido nucleico de cadena sencilla C se empareja con la cadena larga del adaptador A; mientras que el ácido nucleico de cadena sencilla D se empareja con la cadena larga del adaptador B; después del proceso de hibridación, la cadena corta del adaptador respectivo, que se combina de manera débil, se elimina; y los ácidos nucleicos de cadena sencilla C y D se emparejan en forma complementaria con la cadena larga respectiva del adaptador, de modo que los ácidos nucleicos de cadena sencilla C y D se ligan al fragmento objetivo después de la extensión y la ligadura;

6. amplificar un producto resultante obtenido en el paso 5 (como plantilla) con los ácidos nucleicos de cadena sencilla C y D como cebadores mediante la reacción en cadena de la polimerasa, enriqueciendo así un producto con una secuencia de etiqueta;

7. capturar un producto resultante obtenido en el paso 6 mediante hibridación con una sonda oligonucleotídica, que incluye específicamente la hibridación con la sonda, eluyendo un producto hibridado y enriqueciendo el producto hibridado;

8. seleccionar los ácidos nucleicos de cadena doble después de la captura por hibridación en función de su longitud (opcionalmente);

9. separar el ácido nucleico de cadena doble seleccionado en dos fragmentos de ácido nucleico de cadena sencilla a través de la biotina que solo existe en una de las cadenas dobles del ácido nucleico;

10. ciclar el fragmento de ácido nucleico de cadena sencilla y eliminar el fragmento de ácido nucleico de cadena sencilla no ciclado.

Se debe tener en cuenta que el paso de selección basado en la longitud de los ácidos nucleicos puede realizarse después de otros pasos antes del paso 9 de separar el ácido nucleico de cadena doble en dos fragmentos de ácido nucleico de cadena sencilla, dependiendo del requisito específico para la secuenciación y el tamaño real de los fragmentos resultantes de los diferentes pasos. Si los fragmentos resultantes de los diferentes pasos siempre cumplen con el requisito de longitud, el paso 8 se puede omitir.

La secuenciación completa del exoma se puede lograr introduciendo el paso 7.

### Ejemplo 1

#### 1. Fragmentación del ADN genómico

El ADN genómico se puede fragmentar de varias maneras, tal como mediante ultrasonificación física y digestión enzimática, las cuales tienen procedimientos bien establecidos comercialmente. En el presente ejemplo, la ultrasonificación física se usó para la fragmentación.

A una placa de PCR de 96 pozos, se le agregaron hasta 80 µL de alambre de politetrafluoroetileno, 1 µg de ADN genómico y regulador Tris-EDTA (TE) o agua libre de nucleasas hasta completar 80 µL en cada pozo. Después de sellar con una película conservante, la placa de PCR de 96 pozos se colocó en un ultrasonificador E220 para la fragmentación en las siguientes condiciones.

Ciclo de trabajo	20%
Intensidad	5
Ciclos por Ráfaga	200
Duración de fragmentación	60 s, 5 veces

#### 2. Selección del ADN genómico fragmentado.

El ADN genómico fragmentado puede seleccionarse mediante purificación de perlas magnéticas o recuperación de gel. En el presente ejemplo, se usó la purificación de perlas magnéticas para la selección.

El ADN genómico fragmentado se mezcló con 80 µL de perlas magnéticas Ampure XP hasta uniformidad, seguido de reposo durante 7 min a 15 min. El primer sobrenadante recogido después de colocarlo en un separador magnético durante un tiempo se mezcló con 40 µL de perlas magnéticas frescas Ampure XP hasta uniformidad,

seguido de reposo durante 7 min a 15 min. El segundo sobrenadante recogido después de colocarlo en un separador magnético durante otro tiempo, se lavó dos veces con etanol al 75%. Después de secar, el producto se mezcló con 50 µL de regulador TE o agua libre de nucleasas hasta uniformidad, seguido de reposo durante 7 min a 15 min para disolver el producto recuperado.

5 3. Desfosforilación

Se formuló una primera solución de reacción como se indica a continuación.

Regulador 2 NEB 10x 6 µL	6 µL
Fosfatasa alcalina de camarón (1U/µL)	6 µL
Volumen total	12 µL

10 El producto recuperado obtenido en el paso 2 anterior se mezcló con 12 µL de la primera solución de reacción para que fuera uniforme para las reacciones en las condiciones que se detallan a continuación. El producto resultante generado se usó directamente para el siguiente paso. El paso de enfriamiento a 4 °C a una velocidad de 0,1 °C/s no es obligatorio, lo que también es cierto para los siguientes pasos. Además, no es necesario controlar con precisión la duración de la reacción, lo que también se aplica a los siguientes pasos.

37 °C	45 min
65 °C	10 min
Enfriamiento a 4°C a una velocidad de 0,1 °C/s	

4. Reparación del extremo.

15 Se formuló una segunda solución de reacción como se indica a continuación para ser uniforme.

Agua libre de nucleasa	12,2 µL
Regulador 2 NEB 10x	1,8 µL
Trifosadenina 0,1 M	0,8 µL
Trifosfato de desoxirribonucleósido 25 mM	0,8 µL
Albúmina de suero bovino	0,4 µL
ADN polimerasa T4 (3U/mL)	2 µL
Volumen total	18 µL

20 El producto desfosforilado obtenido en el paso 3 anterior se mezcló con la segunda solución de reacción hasta uniformidad, seguido de incubación a 12 °C durante 20 min, purificación con 80 µL de perlas magnéticas PEG 32 y recuperación mediante disolución en 40 µL de regulador TE. El producto resultante se puede purificar de varias maneras, es decir, usando perlas magnéticas, pasando a través de una columna, corriendo en gel y aislando el producto objetivo de la misma, etc., que se usan de manera intercambiable. En el presente ejemplo, el producto resultante se purificó con perlas magnéticas, a menos que se especifique lo contrario.

5. Adaptadores A y B de ligadura.

25 En el presente ejemplo, los adaptadores usados tienen las secuencias respectivas como se muestra a continuación. Debe observarse que la secuencia se escribe desde el extremo 5' al extremo 3' de izquierda a derecha; "/" significa que un grupo en él es un grupo modificador para un nucleótido terminal, o un nucleótido terminal en él se ha modificado; "fos" indica fosforilación; "dd" indica didesoxi; y "bio" representa biotina.

Adaptador A:

Cadena larga después de la modificación: /Fos/GGCTCCGTCGAAGCCCGACG/ddC/ (véase la SEQ ID NO: 1)

## ES 2 726 149 T3

Cadena corta: CTTCGACGGAGC/ddC/ (véase la SEQ ID NO: 2)

Adaptador B:

Cadena larga después de la modificación: /fos/ACGTCTGGGGCCAAGCGGTCGT/ddC/ (véase la SEQ ID NO: 3)

Hebra corta después de la modificación: TTGGCCCCGGCT/-ddT/ (véase la SEQ ID. NO: 4)

- 5 Se formuló una tercera solución de reacción como se indica a continuación para ser uniforme.

Agua libre de nucleasas	11,1 µL
Adaptador 5 µM A	1,85 µL
Adaptador 5 µM B	1,85 µL
Volumen total	14,8 µL

Se formuló una cuarta solución de reacción como se indica a continuación para ser uniforme.

Agua libre de nucleasas	25 µL
regulador de ligación de ADN T4 10x (Enzymatics, L6030-HC-L)	3 µL
ADN ligasa T4 (rápida) (600 U/µL) (Enzymatics, L6030-HC-L)	2 µL
Volumen total	30 µL

- 10 El producto reparado en el extremo obtenido en el paso 4 anterior se mezcló con la tercera solución de reacción y luego la cuarta solución de reacción hasta uniformidad, seguido de incubación a 20 °C durante 20 minutos, purificación con 100 µL de perlas magnéticas Ampure XP, y la recuperación disolviendo en 40 µL de regulador TE.

- 15 El adaptador A y el adaptador B se ligaron al fragmento objetivo después de este paso. La Figura 2 muestra un electroforetograma antes y después de la ligadura del adaptador. Como se puede ver en la Figura 2, el fragmento de ADN tiene un tamaño obviamente más largo después de la ligadura del adaptador en el paso 5, lo que indica que el método actual de acuerdo con el presente ejemplo es muy exitoso. En particular, los efectos de la selección y el enriquecimiento son más evidentes con una banda más intensa después de la reacción en cadena de la polimerasa en el paso 6.

6. Unión con ácidos nucleicos de cadena sencilla C y D

El ácido nucleico de cadena sencilla C:

- 20 /fos/AGACAAGCTC(N)<sub>m</sub>GATCGGGCTTCGACGGAG ("N<sub>m</sub>" ubicado de manera intermedia se refiere a una secuencia de etiqueta que consiste en nucleótidos intercambiables).

El ácido nucleico de cadena sencilla D después de la modificación:

/bio/TCCTAAGACCGCTTGGCCCCG (véase la SEQ ID NO: 5)

Se formuló una quinta solución de reacción como se indica a continuación para ser uniforme.

Agua libre de nucleasas	19,88 µL
Regulador Taq 10x	8 µL
Trifosadenina 0,1 M	0,8 µL
Trifosfato de desoxirribonucleósido 25 µM	0,32 µL
ácido nucleico de cadena sencilla D 20 µM	0,5 µL
Volumen total	30 µL

## ES 2 726 149 T3

Se formuló una sexta solución de reacción como se indica a continuación para ser uniforme.

Agua libre de nucleasas	0,4 µL
Regulador Taq 10x	0,4 µL
ADN ligasa T4 (600 U/µL)	4,8 µL
Taq polimerasa (5U/µL)	2,4 µL
Volumen total	8 µL

5 El producto recuperado ligado con el adaptador A y el adaptador B respectivamente en dos terminales se mezcló con 1 µL de ácido nucleico de cadena sencilla C (10 µM) hasta uniformidad y luego se incubó a 65 °C durante 5 minutos y se enfrió a 37 °C a una velocidad de 0,1 °C/s, temperatura a la cual se añadieron adicionalmente 8 µL de solución de la quinta reacción para otra incubación durante 20 min.

El producto resultante obtenido de este modo se purificó con 96 µL de perlas magnéticas Ampure XP y la recuperación mediante disolución en 25 µL de regulador TE.

7. Reacción en cadena de la polimerasa.

10 Se formuló una séptima solución de reacción como se indica a continuación para ser uniforme.

Agua libre de nucleasas	15,5 µL
Regulador PfuTurbo Cx 10x (Agilent, 01.Agilent.600414)	50,0 µL
ADN polimerasa PfuTurbo Cx Hot-start (2,5 U/mL) (Agilent, 01.Agilent.600414)	2 µL
Ácido nucleico de cadena sencilla D 20 µM	2,5 µL
Ácido nucleico de cadena sencilla C 10 µM	5,0 µL
Volumen total	75,0 µL

Después de disolverse en agua libre de nucleasas o regulador TE hasta 25 µL, se mezclaron 30 ng a 40 ng del producto resultante con el ácido nucleico de cadena sencilla C y el ácido nucleico de cadena sencilla D con la séptima solución de reacción hasta uniformidad, seguido de reacción en las siguientes condiciones.

95 °C	3 min
95 °C	30 s
56 °C	30 s
72 °C	90 s
68 °C	7 min
enfriamiento a 4°C a una velocidad de 0,1 °C/s.	

15 Después de la reacción, el producto amplificado se purificó con 120 µL de perlas magnéticas Ampure XP, y luego se recuperó disolviendo en 25 µL de agua libre de nucleasas.

8. Captura por hibridación.

Se formuló una octava solución de reacción como se muestra a continuación.

Agua libre de nucleasas	3,4 µL
-------------------------	--------

## ES 2 726 149 T3

SureSelect Bloque #1 (Agilent)	2,5 µL
SureSelect Bloque #2 (Agilent)	2,5 µL
Secuencia de bloqueo para el adaptador A	0,3 µL
Secuencia de bloqueo para el adaptador B	0,3 µL
Volumen total	9 µL

Después de concentración y evaporación, se mezclaron 500 ng a 1 µg del producto recuperado obtenido después de la amplificación con la octava solución de reacción hasta uniformidad, seguido de incubación a 95 °C durante 5 minutos y luego se mantuvo a 65 °C (primer sistema de reacción).

- 5 Se formuló una novena solución de reacción como se muestra a continuación.

SureSelect Híbrido #1 (Agilent)	8,3 µL
SureSelect Híbrido #2 (Agilent)	0,3 µL
SureSelect Híbrido #3 (Agilent)	3,3 µL
SureSelect Híbrido #4 (Agilent)	4,3 µL
Volumen total	16,3 µL

La novena solución de reacción se añadió luego al primer sistema de reacción para continuar la incubación a 65 °C (segundo sistema de reacción).

- Se formuló una décima solución de reacción como se muestra a continuación.

Agua libre de nucleasas	1 µL
Bloque de RNasa SureSelect (Agilent)	1 µL
Biblioteca de captura de oligos SureSelect	5 µL
Volumen total	7 µL

- 10 La décima solución de reacción se añadió al segundo sistema de reacción, seguido por incubación a 65 °C durante 20 ha 24 h (tercer sistema de reacción).

- Después de la reacción, el producto resultante en el tercer sistema de reacción se puso en contacto con perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina, después de lo cual las perlas magnéticas se disolvieron en 50 µL de agua libre de nucleasas.

- 15

- Se formuló una undécima solución de reacción como se muestra a continuación.

Agua libre de nucleasas	31 µL
Regulador PfuTurbo Cx 10x (Agilent, 01.Agilent.600414)	100,0 µL
ADN polimerasa PfuTurbo Cx Hot-start (Agilent, 01.Agilent.600414)	4 µL
Ácido nucleico de cadena simple D 20 mM (modificado con biotina)	5 µL
Ácido nucleico de cadena sencilla C 10 mM	10 µL
Volumen total	150 µL

## ES 2 726 149 T3

Las perlas magnéticas disueltas en agua libre de nucleasas se mezclaron luego con la undécima solución de reacción, seguido por reacciones bajo las siguientes condiciones.

95 °C	3 min
95 °C	30 s
56 °C	30 s
72 °C	90 s
68 °C	7 min
enfriamiento a 4 °C a una velocidad de 0,1 °C/s	

Después de la reacción, el producto resultante se purificó con 240 µL de perlas magnéticas Ampure XP.

- 5 9. Separación del ácido nucleico de cadena doble seleccionado en dos fragmentos de ácido nucleico de cadena sencilla

El complejo resultante de perla magnética-ADN obtenido en el paso 8 anterior se expuso a hidróxido de sodio 0,1 M, para aislar el fragmento de ácido nucleico de cadena sencilla que no contiene la biotina y, por lo tanto, no se une a las perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina, seguido por la adición de regulador ácido para la neutralización. Después de la neutralización, el volumen total fue de 112 µL.

10

10. Ciclización del fragmento de ácido nucleico de cadena sencilla

Se formuló una duodécima solución de reacción como se muestra a continuación, en la que el ácido nucleico de cadena sencilla E tiene una secuencia complementaria para dos extremos del fragmento de ácido nucleico de cadena sencilla obtenido en el paso 9 anterior para conexión.

- 15 El ácido nucleico de cadena sencilla E tiene una secuencia de TCGAGCTTGTCTTCCTAAGACCGC (SEQ ID NO: 8).

Agua libre de nucleasas	43 µL
ácido nucleico de cadena sencilla E	20 µL
Volumen total	63 µL

La solución de la duodécima reacción se añadió con el fragmento de ácido nucleico de cadena sencilla obtenido en el paso 9 anterior y se mezcló hasta uniformidad (cuarto sistema de reacción).

Se formuló una decimotercera solución de reacción como se muestra a continuación.

Agua libre de nucleasas	153,3 µL
Regulador TA 10x (Epicentre)	35 µL
Trifosadenina 100 mM	3,5 µL
ADN ligasa de T4 (rápida) (600U/mL) (Enzymatics, L6030-HC-L)	1,2 µL
Volumen total	175 mL

20

El decimotercer sistema se añadió al cuarto sistema de reacción y se mezcló hasta uniformidad, seguido de incubación a 37 °C durante 1,5 h.

11. Tratamiento con exonucleasa 1 y exonucleasa 2.

Se formuló una decimocuarta solución de reacción como se muestra a continuación.

Agua libre de nucleasas	1,5 $\mu$ L
Regulador TA 10x (Epicentre)	3,7 $\mu$ L
Exonucleasa 1 (20 U/mL) (NEB, M0293S)	11,1 $\mu$ L
Exonucleasa 3 (100 U/mL) (NEB, M0206S)	7,4 $\mu$ L
Volumen total	23,7 $\mu$ L

5 Se mezclaron 23,7  $\mu$ L de la decimocuarta solución de reacción con el producto de ciclación resultante en el paso 9 anterior hasta uniformidad, seguido de reposo a 37 °C durante 1,5 h para incubación y luego se agregaron 15,4  $\mu$ L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 500 mM. El producto resultante obtenido de este modo se purificó con 500  $\mu$ L de perlas magnéticas PEG32 y se redisolvió en 40  $\mu$ L a 80  $\mu$ L de agua libre de nucleasas/regulador TE, obteniendo así un producto final.

Los productos finales obtenidos como se ilustra en el presente ejemplo tienen concentraciones y cantidades totales de la siguiente manera:

	Concentración (ng/mL)	Cantidad (ng)
Producto final 1	2,72	108,8
Producto final 2	2,12	84,8
Producto final 3	4,26	170,4
Producto final 4	1,46	58,4
Producto final 5	3,06	122,4
Producto final 6	1,73	69,2

10 Se muestra un resultado electroforético en la Figura 3, que es un electroforetograma para los productos finales del paso 11 mediante electroforesis en gel modificado con poliacrilamida al 6%. Como se muestra en la Figura 3, los productos finales 1, 3 y 5 se han sometido a selección de longitud mediante electroforesis en gel después de hibridación; aunque los productos finales 2, 4 y 6 no se han sometido a una selección de longitud. Como se puede observar en la Figura 3, los productos finales después de llevar a cabo la selección de longitud tendrán un tamaño más uniforme. Todos los productos finales, independientemente de si se someten o no a una selección de longitud, pueden secuenciarse con éxito, lo que indica que esta solución de la presente divulgación es completamente exitosa.

#### Aplicabilidad industrial

20 De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, el oligonucleótido aislado se puede usar eficazmente como un adaptador para la construcción de bibliotecas; además, el método proporcionado en este documento puede ligar diferentes adaptadores a un fragmento de ácido nucleico respectivamente en dos terminales al mismo tiempo, lo que evita que los adaptadores se interconecten entre sí, mejorando de este modo la eficiencia de ligadura y reduciendo el coste económico y de tiempo para la construcción de la biblioteca.

25 La mención a través de esta memoria descriptiva a "una realización", "algunas realizaciones", "otro ejemplo", "un ejemplo", "un ejemplo específico" o "algunos ejemplos" significa que se incluye un rasgo, estructura, material o característica particular en relación con la realización o el ejemplo en al menos una realización o ejemplo de la presente divulgación. Por lo tanto, la aparición de frases tales como "en algunas realizaciones", "en una realización", "en otro ejemplo", "en un ejemplo", "en un ejemplo específico" o "en algunos ejemplos" en diversos sitios a lo largo de esta memoria descriptiva no se refieren necesariamente a la misma realización o ejemplo de la presente divulgación. Además, los rasgos, estructuras, materiales o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones o ejemplos.

#### Listado de secuencias

<110> BGI SHENZHEN CO., LIMITED

<120> OLIGONUCLEOTIDO AISLADO Y SU USO EN LA SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

<130> PIOC145502P  
<160> 8  
<170> PatentIn versión 3.3  
<210> 1  
5 <211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> primera cadena del primer adaptador  
10 <400> 1  
ggctcgcgcg aagcccgcgc c 21  
<210> 2  
<211> 13  
<212> ADN  
15 <213> Artificial  
<220>  
<223> segunda cadena del primer adaptador  
<400> 2  
cttcgcgcgcga gcc 13  
20 <210> 3  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
25 <223> primera cadena del segundo adaptador  
<400> 3  
acgtcggggc caagcggcgc tc 22  
<210> 4  
<211> 13  
30 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> segunda cadena del segundo adaptador  
<400> 4  
35 ttggccccgc ctt 13  
<210> 5  
<211> 21

<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> segundo ADN de cadena sencilla  
5 <400> 5  
tcctaagacc gcttgcccc g 21  
<210> 6  
<211> 12  
<212> ADN  
10 <213> Artificial  
<220>  
<223> primera región de ácido nucleico de cadena sencilla  
<400> 6  
tcgagcttgt ct 12  
15 <210> 7  
<211> 12  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
20 <223> segunda región de ácido nucleico de cadena sencilla\177  
<400> 7  
tcctaagacc gc 12  
<210> 8  
<211> 24  
25 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> ácido nucleico de cadena sencilla E  
<400> 8  
30 tcgagcttgt cttcctaaga ccgc 24

**REIVINDICACIONES**

1. Un oligonucleótido aislado, que comprende una primera cadena y una segunda cadena, en las que
- 5 un primer nucleótido terminal en el extremo 5' de la primera cadena tiene un grupo fosfato, y un segundo nucleótido terminal en el extremo 3' de la primera cadena es didesoxinucleótido; y
- un tercer nucleótido terminal en el extremo 5' de la segunda cadena no tiene un grupo fosfato, y un cuarto nucleótido terminal en el extremo 3' de la segunda cadena es un didesoxinucleótido,
- en el que la primera cadena es de una longitud más larga que aquella de la segunda cadena, y se forma una estructura de cadena doble entre la primera cadena y la segunda cadena y
- 10 un primer saliente está ubicado en el extremo 3' de la primera cadena y, opcionalmente, un segundo saliente está ubicado en el extremo 5' de la segunda cadena, el primer saliente es de una longitud más larga que la del segundo saliente, si está presente, la longitud del primer saliente es de aproximadamente 6 nt a 12 nt, y la longitud del segundo saliente, si está presente, es de hasta 4 nt.
- 15 2. El oligonucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la longitud de la primera cadena es de aproximadamente 20 nt a aproximadamente 25 nt, preferiblemente, la longitud de la segunda cadena es de aproximadamente 10 nt a aproximadamente 15 nt, opcionalmente,
- la primera cadena tiene una secuencia de 5'GGCTCCGTCGAAGCCCGACGC3' (SEQ ID NO: 1) y
- 20 la segunda cadena tiene una secuencia de 5'CTTCGACGGAGCC3' (SEQ ID NO: 2);
- o
- la primera cadena tiene una secuencia de 5'ACGTCGGGGCCAAGCGGTCGTC3' (SEQ ID NO: 3), y
- la segunda cadena tiene una secuencia de 5'TTGGCCCCGGCTT3' (SEQ ID NO: 4).
3. Un kit, que comprende:
- 25 un primer adaptador y un segundo adaptador, siendo cada uno un oligonucleótido aislado como se define en la reivindicación 1 o 2, en el que el primer adaptador es diferente del segundo adaptador.
4. El kit de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además:
- 30 un primer ADN de cadena sencilla capaz de emparejarse con una primera cadena del primer adaptador para formar una primera estructura de cadena doble; y
- un segundo ADN de cadena sencilla capaz de emparejarse con una primera cadena del segundo adaptador para formar una segunda estructura de cadena doble,
- preferiblemente,
- 35 la primera estructura de cadena doble es de una longitud mayor que la de una tercera estructura de cadena doble formada con la primera cadena del primer adaptador y una segunda cadena del primer adaptador; y
- la segunda estructura de cadena doble es de una longitud mayor que la de una cuarta estructura de cadena doble formada con la primera cadena del segundo adaptador y una segunda cadena del segundo adaptador.
5. El kit de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, que comprende además:
- un primer cebador es el mismo que uno del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla; y
- 40 un segundo cebador que tiene biotina adicional en el extremo 5' en comparación con el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla,

- preferiblemente, la primera cadena del primer adaptador tiene una secuencia de 5'GGCTCCGTCTGAAGCCCGACGC3' (SEQ ID NO: 1);
- una segunda cadena del primer adaptador tiene una secuencia de 5'CTTCGACGGAGCC3' (SEQ ID N°: 2);
- 5 la primera cadena del segundo adaptador tiene una secuencia de 5'ACGTCGGGGCCAAGCGGTCTGTC3' (SEQ ID NO: 3);
- una segunda cadena del segundo adaptador tiene una secuencia de 5'TTGGCCCCGGCTT3' (SEQ ID NO: 4);
- el primer ADN de cadena sencilla tiene una secuencia de 5'AGACAAGCTC(N)<sub>m</sub>GATCGGGCTTCGACGGAG3', en la que (N)<sub>m</sub> representa una secuencia de etiqueta que es de una longitud de m nucleótidos, en la que m es un número entero que varía de 4 a 10, y N representa adenina (A), timina (T), guanina (G) o citosina (C) y
- 10 el segundo ADN de cadena sencilla tiene una secuencia de 5'TCCTAAGACCGCTTGCCCCG3' (SEQ ID NO: 5).
6. Un método para agregar adaptadores, que comprende un primer adaptador y un segundo adaptador, a un fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, cada uno de los cuales comprende extremos romos emparejados sin ningún grupo fosfato, comprendiendo el método:
- 15 ligación del primer adaptador y el segundo adaptador al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, para obtener un primer producto ligado,
- en el que el primer adaptador es diferente del segundo adaptador; y
- el primer adaptador y el segundo adaptador son cada uno un oligonucleótido aislado como se define en la reivindicación 1 o 2;
- 20 reemplazar una segunda cadena del primer adaptador por un primer ADN de cadena sencilla y reemplazar una segunda cadena del segundo adaptador por un segundo ADN de cadena sencilla,
- en el que el primer ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del primer adaptador para formar una primera estructura de cadena doble, y el segundo ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del segundo adaptador para formar una segunda estructura de cadena doble;
- 25 conectar el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales para obtener un segundo producto ligado, y
- amplificar el segundo producto ligado con un primer cebador y un segundo cebador para obtener un producto amplificado, en el que
- 30 el producto amplificado es un fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales,
- el primer cebador contiene la misma secuencia que uno del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla, y
- el segundo cebador contiene la misma secuencia que el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla y contiene biotina adicional en el extremo 5' en comparación con el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el primer adaptador y el segundo adaptador se ligan al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales en un paso,
- opcionalmente, el fragmento de ADN de cadena doble se obtiene mediante los siguientes pasos:
- fragmentar una muestra de ADN para obtener un producto de fragmentación;
- 40 desfosforilar el producto de fragmentación para obtener un producto de fragmentación desfosforilado; y
- reparar en el extremo el producto de fragmentación desfosforilado para obtener el fragmento de ADN de cadena doble,
- preferiblemente, la muestra de ADN es al menos parte del ADN genómico o un producto de transcripción inversa de ARN.
- 45 8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que

la primera estructura de cadena doble es de una longitud mayor que la de una tercera estructura de cadena doble formada con la primera cadena del primer adaptador y una segunda cadena del primer adaptador; y

la segunda estructura de cadena doble es de una longitud mayor que la de una cuarta estructura de cadena doble formada con la primera cadena del segundo adaptador y una segunda cadena del segundo adaptador,

5 opcionalmente, la primera cadena del primer adaptador tiene una secuencia de 5'GGCTCCGTCTGAAGCCCGACGC3';

la segunda cadena del primer adaptador tiene una secuencia de 5'CTTCGACGGAGCC3';

la primera cadena del segundo adaptador tiene una secuencia de 5'ACGTCGGGGCCAAGCGGTCTGTC3';

la segunda cadena del segundo adaptador tiene una secuencia de 5'TTGGCCCCGGCTT3';

10 el primer ADN de cadena sencilla tiene una secuencia de 5'AGACAAGCTC(N)<sub>m</sub>GATCGGGCTTCGACGGAG3', en la que (N)<sub>m</sub> representa una secuencia etiqueta de una longitud de m nucleótidos, en la que m es un número entero que varía de 4 a 10, y representa adenina (A), timina (T), G (guanina) o C (citosina); y

el segundo ADN de cadena sencilla tiene una secuencia de 5'TCCTAAGACCGCTTGCCCCG3', opcionalmente,

15 la segunda cadena del primer adaptador y la segunda cadena del segundo adaptador se reemplazan respectivamente por el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla mediante hibridación por desnaturalización térmica,

preferiblemente, la desnaturalización térmica se realiza a aproximadamente 60 °C.

20 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla se conectan al fragmento de ADN de cadena doble, respectivamente, en dos terminales por medio de una traducción de muescas.

10. Un método para construir una biblioteca para secuenciar un fragmento de ADN de cadena doble con dos terminales, cada uno de los cuales comprende extremos romos emparejados sin ningún grupo fosfato, comprendiendo el método:

25 ligar un primer adaptador y un segundo adaptador al ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales mediante un método como se define en las reivindicaciones 6 a 9, para obtener un fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales;

separar el fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales en fragmentos de ADN de cadena sencilla; y

ciclar el fragmento de ADN de cadena sencilla para obtener un bucle de ADN de cadena sencilla,

30 en el que el bucle de ADN de cadena sencilla constituye la biblioteca para secuenciar el fragmento de ADN de cadena doble con dos terminales.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que separar el fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales en fragmentos de ADN de cadena sencilla comprende además:

35 poner en contacto el fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales con perlas magnéticas para formar un complejo de perla magnética-ADN, en el que la perla magnética está recubierta con estreptavidina; y

exponer el complejo perla magnética-ADN a una solución que tiene un valor de pH superior a 7 para obtener el fragmento de ADN de cadena sencilla,

40 preferiblemente, siendo la solución de valor de pH superior a 7 una solución de hidróxido de sodio,

más preferiblemente, la solución de hidróxido de sodio es de una concentración de aproximadamente 0,5 M a 2 M,

más preferiblemente, la solución de hidróxido de sodio es de una concentración de aproximadamente 1 M, opcionalmente,

45 el fragmento de ADN de cadena sencilla se aísla del fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores, respectivamente, en dos terminales, que han sido seleccionados previamente,

preferiblemente, el fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales se selecciona mediante contacto con una sonda, en el que la sonda es específica para una secuencia predeterminada,

más preferiblemente, la secuencia predeterminada comprende al menos un exón,

5 más preferiblemente, la sonda se proporciona en forma de matriz de microchip.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que el fragmento de ADN de cadena sencilla se cicla con una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla,

en el que la molécula de ácido nucleico de cadena sencilla comprende una primera región y una segunda región,

10 la primera región es capaz de emparejarse con nucleótidos terminales en el extremo 5' o el extremo 3' del fragmento de ADN de cadena sencilla, y

la segunda región es capaz de emparejarse con nucleótidos terminales en el extremo 5' o el extremo 3' del fragmento de ADN de cadena sencilla,

preferiblemente, la primera región está conectada en forma adyacente a la segunda región,

15 más preferiblemente, la primera región tiene una secuencia de 5'TCGAGCTTGTCT3' (SEQ ID NO: 6); y la segunda región tiene una secuencia de 5'TCCTAAGACCGC3' (SEQ ID NO: 7).

13. Un dispositivo para agregar adaptadores, que comprende un primer adaptador y un segundo adaptador, a un fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, cada uno de los cuales comprende extremos romos emparejados sin ningún grupo fosfato, comprendiendo el dispositivo:

20 una primera unidad de ligación configurada para ligar el primer adaptador y el segundo adaptador al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales para obtener un primer producto ligado,

en el que el primer adaptador es diferente del segundo adaptador, y

el primer adaptador y el segundo adaptador son cada uno un oligonucleótido aislado como se define en la reivindicación 1 o 2;

25 una unidad de reemplazo configurada para reemplazar una segunda cadena del primer adaptador por un primer ADN de cadena sencilla y reemplazar una segunda cadena del segundo adaptador por un segundo ADN de cadena sencilla,

30 en el que el primer ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del primer adaptador para formar una primera estructura de cadena doble, y el segundo ADN de cadena sencilla es capaz de emparejarse específicamente con una primera cadena del segundo adaptador para formar una segunda estructura de cadena doble;

una segunda unidad de ligación configurada para conectar el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla al fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales para obtener un segundo producto ligado, y

35 una unidad de amplificación configurada para amplificar el segundo producto ligado con un primer cebador y un segundo cebador para obtener un producto amplificado, en el que

el primer cebador contiene la misma secuencia que uno del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla, y

40 el segundo cebador contiene la misma secuencia que el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla y contiene biotina adicional en el extremo 5' en comparación con el otro del primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla.

14. Un dispositivo para construir una biblioteca para secuenciar un fragmento de ADN de cadena doble con dos terminales, cada uno de los cuales comprende extremos romos emparejados sin ningún grupo fosfato, comprendiendo el dispositivo:

45 el dispositivo para agregar adaptadores como se define en la reivindicación 13, configurado para ligar el primer adaptador y el segundo adaptador al ADN de cadena doble respectivamente en dos terminales, para obtener un fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales;

un dispositivo de aislamiento de fragmentos de ADN de cadena sencilla configurado para separar el fragmento de ADN ligado con el primer y segundo adaptadores respectivamente en dos terminales en los fragmentos de ADN de cadena sencillas; y

un dispositivo de ciclado configurado para ciclar el fragmento de ADN de cadena sencilla para obtener un bucle de ADN de cadena sencilla,

en el que el bucle de ADN de cadena sencilla constituye la biblioteca para secuenciar el fragmento de ADN de cadena doble con dos terminales.

Diagrama de flujo que muestra un proceso de ligación de diferentes adaptadores a los fragmentos de ADN respectivamente en dos terminales

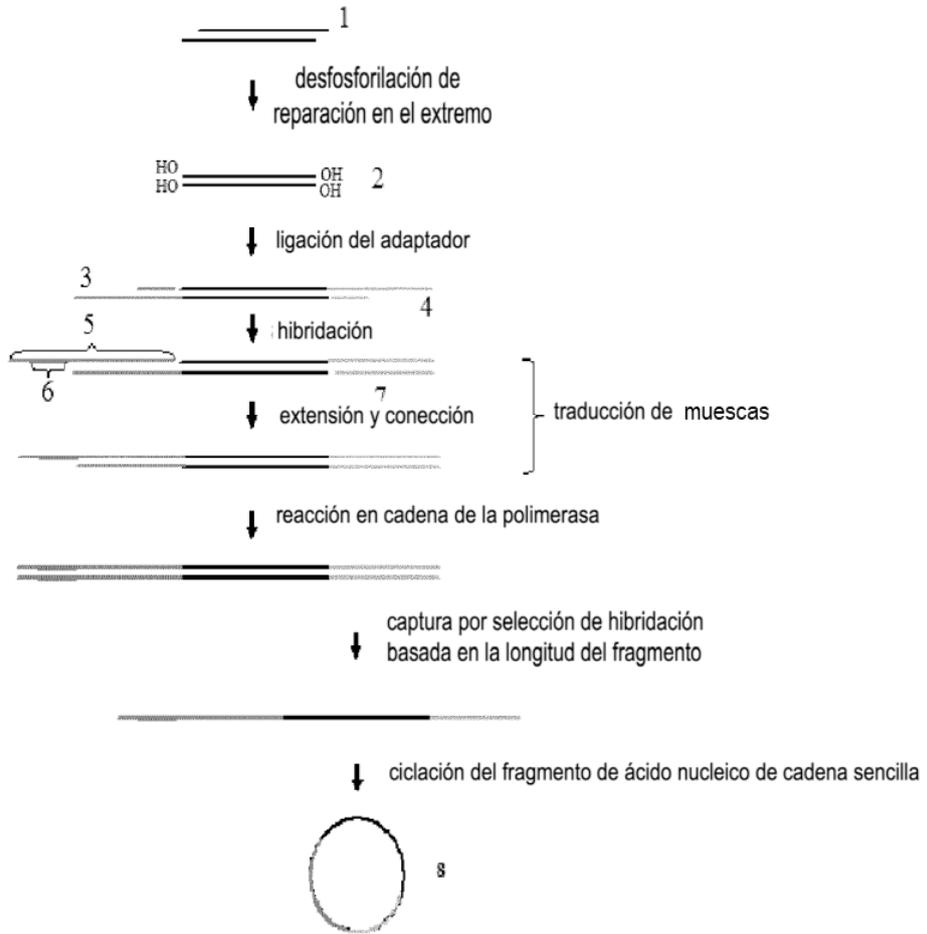


Fig. 1

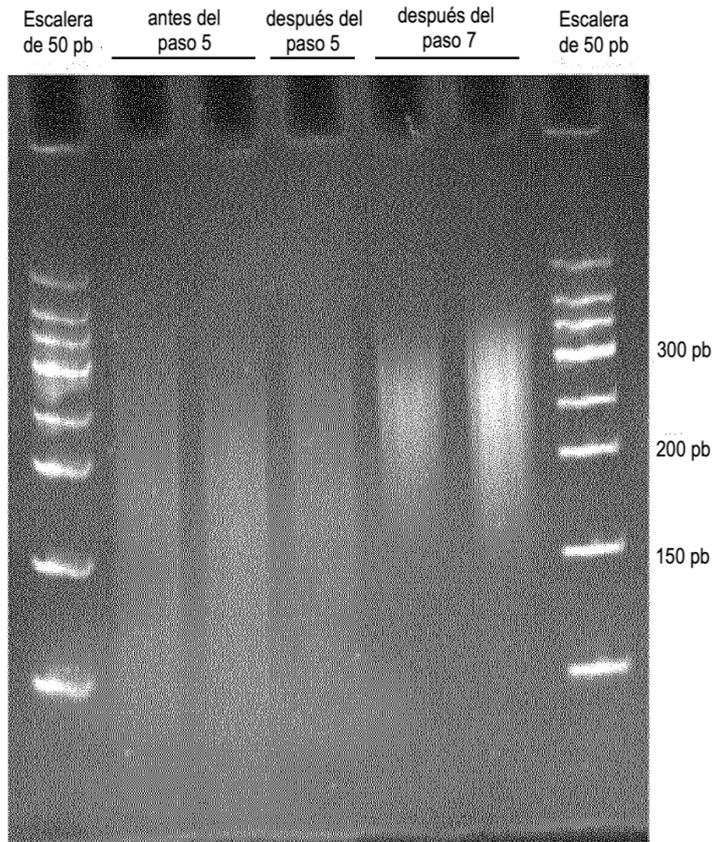


Fig. 2

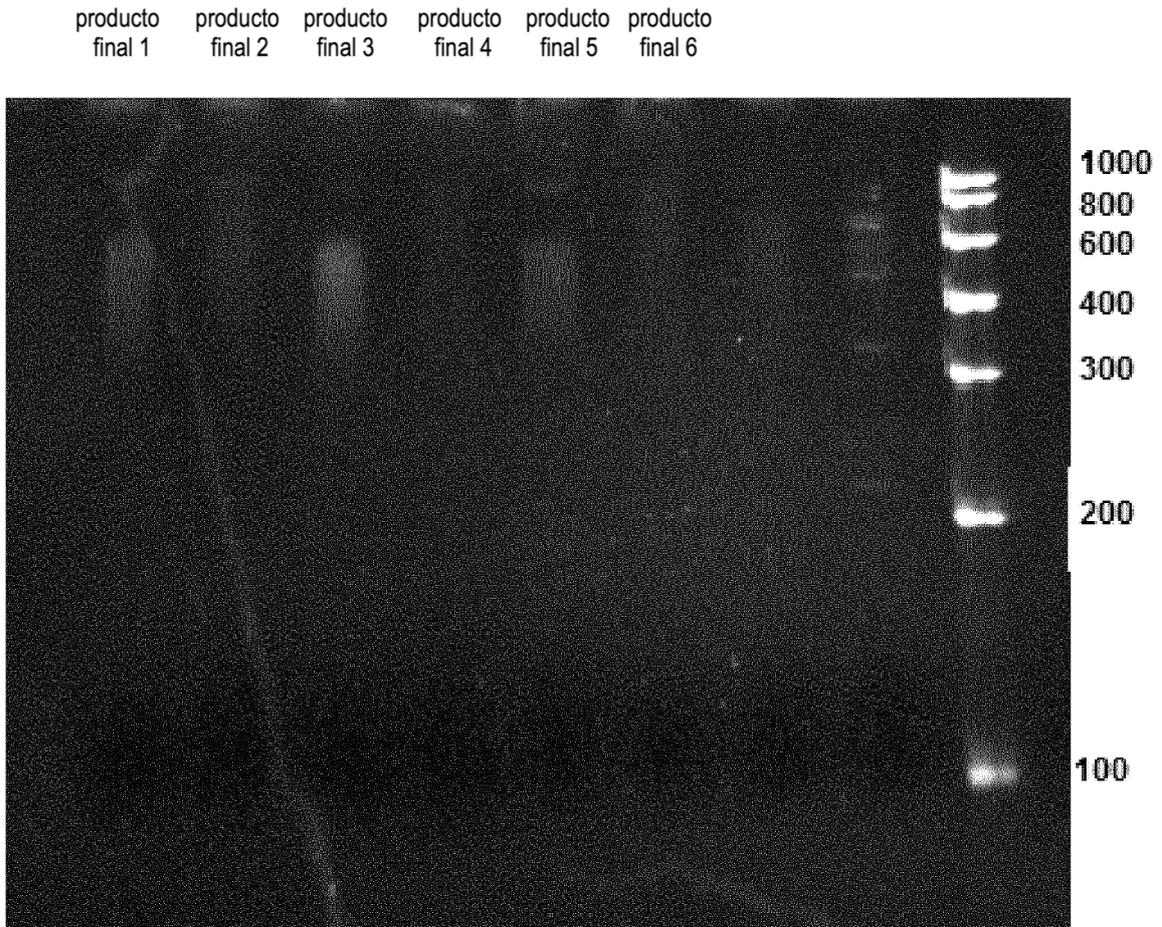


Fig. 3

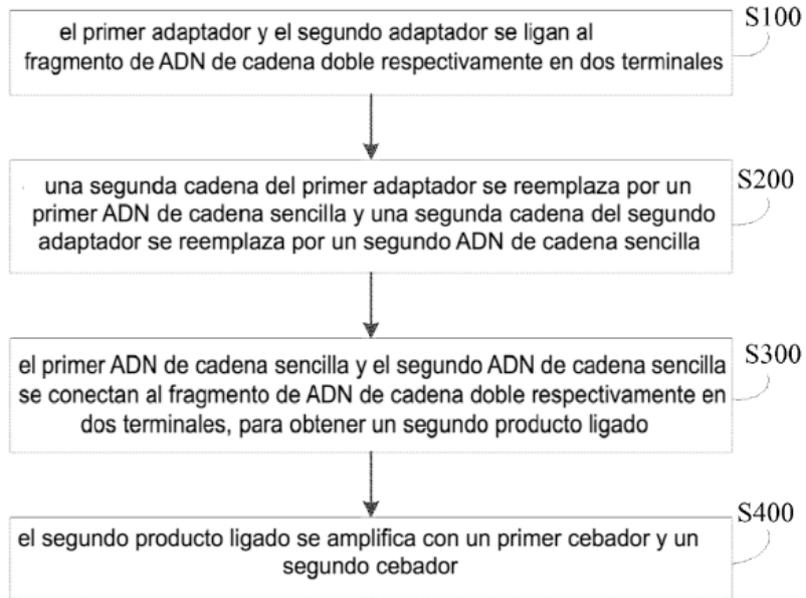


Fig. 4

100



Fig. 5

1000

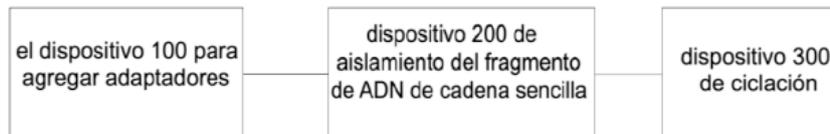


Fig. 6

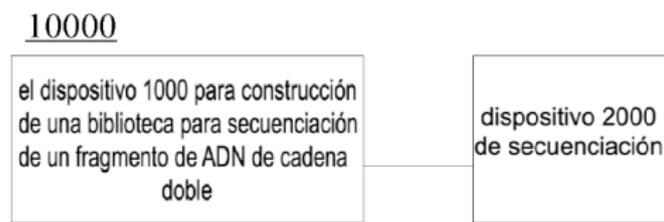


Fig. 7