

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 480**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/66 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C40B 40/08 (2006.01)

C40B 50/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 18174793 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3388519**

54 Título: **Adaptador vesicular y sus usos en la construcción y secuenciación de una biblioteca de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

12.09.2014 WO PCT/CN2014/086418

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

23.01.2020

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:

**JIANG, YUAN;
GUO, JING;
JI, XIAOJUN;
GENG, CHUNYU;
TIAN, KAI;
ZHAO, XIA;
XU, HUIQIAN;
ZHANG, WENWEI;
JIANG, HUI y
DRMANAC, RADOJE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 738 480 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

Adaptador vesicular y sus usos en la construcción y secuenciación de una biblioteca de ácidos nucleicos

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere al campo de la biotecnología, en particular al uso de un adaptador vesicular del oligonucleótido para construir una biblioteca de ácido nucleico monocatenario cíclico.

Antecedentes

10 La tecnología de secuenciación de segunda generación, también conocida como tecnología de secuenciación de próxima generación, se denomina con respecto a la tecnología de secuenciación de primera generación que está representada por el método de secuenciación de Sanger. La tecnología de secuenciación de segunda generación está representada por la pirosecuenciación Roche/454, la secuenciación de la síntesis de polimerasa de Illumina/Solexa y la secuenciación de la ligasa ABI/SOLiD, y su característica común es el alto rendimiento de la secuenciación. En comparación con estas plataformas de secuenciación principales, la plataforma de secuenciación de Complete Genomics (CG) con el rendimiento más alto puede producir 9,9 TB de datos en cada ejecución, y su salida puede alcanzar los 50 Gb por hora, lo que es de 10 a 25 veces mayor que la de las plataformas de secuenciación principales. 15 Con respecto a la longitud de lectura para haploidía, entre las plataformas de secuenciación principales, solo el secuenciador de Illumina puede lograr una longitud de lectura de 8-10 kb para haploidía, mientras que el secuenciador de CG puede alcanzar una longitud de lectura superior a 99 kb. Además, el secuenciador de CG puede alcanzar una precisión de hasta el 99,999%, mejor que otros secuenciadores comerciales. Por lo tanto, en comparación con las plataformas de secuenciación principales, la plataforma de secuenciación de CG tiene ventajas únicas.

20 En el proceso de construcción de una biblioteca de secuenciación de ácidos nucleicos, generalmente es necesario introducir un adaptador con una secuencia conocida para la secuenciación. Sin embargo, se ha informado que cuando un adaptador se liga para la construcción de la biblioteca de manera conocida, no solo la eficiencia de ligado no es lo suficientemente alta, sino que también surgen muchos subproductos a bajo nivel. Además, como la plataforma de secuenciación de CG adopta una biblioteca monocatenaria cíclica para la secuenciación, las bibliotecas bicatenarias lineales construidas para las plataformas de secuenciación convencionales no son adecuadas para los secuenciadores de CG. Sin embargo, en cuanto al método para construir la biblioteca monocatenaria cíclica para la secuenciación de ácidos nucleicos, no se ha publicado literatura hasta el momento. 25

Con base en la situación anterior, se requiere con urgencia que se desarrolle en la técnica relacionada un adaptador con alta eficiencia y precisión de ligación.

30 El documento WO 2009/1333466 proporciona métodos y composiciones para etiquetar asimétricamente un fragmento de ácido nucleico usando adaptadores asimétricos.

Bennet et al. (2014) *Biotechniques* 56 (6) 289-300: "Library construction for ancient genomics; single strand or double-strand?" describe una PCR mediada por ligación de fragmentos de restricción de moléculas de ADN grandes.

Resumen

35 La presente invención se refiere al uso de un adaptador vesicular del oligonucleótido para construir una biblioteca monocatenaria cíclica para la secuenciación de ácidos nucleicos con alta eficacia.

El adaptador vesicular del oligonucleótido comprende:

una región bicatenaria emparejada en 5' en un primer terminal del adaptador;

40 una región bicatenaria emparejada en 3' en un segundo terminal del adaptador que comprende una primera cadena y una segunda cadena complementarias entre sí, en donde la primera cadena comprende un saliente en el extremo 3' de la misma y la segunda cadena comprende una base fosforilada en el extremo 5' de la misma para proporcionar un terminal adherente y

una región vesicular no emparejada entre la región bicatenaria emparejada en 5' y la región bicatenaria emparejada en 3',

45 en donde la región vesicular no emparejada comprende una primera cadena y una segunda cadena no complementarias entre sí y la primera cadena es de una longitud más larga que la de la segunda cadena.

El uso de dicho adaptador vesicular del oligonucleótido de acuerdo con la invención incluye:

50 (a) la ligación de dicho adaptador vesicular del oligonucleótido con un fragmento de ADN bicatenario para proporcionar una estructura K1-K2-K3 en la que K1 y K3 representan cada uno un adaptador vesicular ligado a través del terminal adherente de dicha región bicatenaria emparejada en 3';

(b) someter dicha estructura bicatenaria obtenida en (a) a la amplificación por PCR empleando un primer cebador que tiene la misma secuencia que al menos una parte de la primera cadena de la región vesicular no emparejada y un segundo cebador que se empareja específicamente con la segunda cadena de la región vesicular no emparejada para proporcionar un producto amplificado para el aislamiento de un ADN monocatenario para la ciclación.

5 En una realización de la presente divulgación, el terminal adherente de la región bicatenaria emparejada en 3' tiene una cola de una sola base.

En una realización de la presente divulgación, la cola de una sola base es timina (T).

En una realización de la presente divulgación, el adaptador vesicular tiene una longitud de al menos 20 nt, preferiblemente de 25 a 50 nt, y más preferiblemente de 30 a 45 nt.

10 En una realización de la presente divulgación, la primera cadena de la región vesicular no emparejada es más larga que la segunda cadena de la región vesicular no emparejada en al menos 5 a 30 nt.

En una realización de la presente divulgación, la región bicatenaria emparejada en 5' también tiene un terminal adherente.

15 En una realización de la presente divulgación, un terminal adherente de la región bicatenaria emparejada en 5' tiene 1 a 3 bases no complementarias.

En una realización de la presente divulgación, el adaptador vesicular comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, y tiene una estructura de fórmula I desde el terminal 5' hasta el terminal 3':



en la cual

20 Y0 representa la región bicatenaria emparejada en 5', y tiene una longitud de 10 a 15 nt, preferiblemente de 11 nt;

Y1 representa una región bicatenaria no emparejada, cuya cadena sentido es de una longitud de 5 a 30 nt más larga que la de la cadena antisentido;

Y2 representa la región bicatenaria emparejada en 3'.

En una realización de la presente divulgación, el adaptador vesicular tiene las siguientes secuencias:

25 5'-GTCCTAAGACCNGATCGGGCTTCGACTGGAGACTCCGACTT-3' (SEQ ID NO:1)

5'-/fos/AGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGACAT-3' (SEQ ID NO: 2)

La presente descripción incluye un kit para el uso de un adaptador vesicular de acuerdo con la invención. El kit incluye: un contenedor;

30 un adaptador vesicular del oligonucleótido para construir una biblioteca de acuerdo con la invención, en donde el adaptador vesicular del oligonucleótido está contenido en el contenedor;

un primer cebador que tiene la misma secuencia que al menos una porción de la primera cadena de la región vesicular no emparejada;

un segundo cebador, que se empareja específicamente con la segunda cadena de la región vesicular no emparejada; y

35 una instrucción

En una realización de la presente divulgación, el primer cebador se usa como un cebador de secuenciación.

En una realización de la presente divulgación, el adaptador está contenido en un contenedor.

En una realización de la presente invención,

se proporciona un método para construir una biblioteca monocatenaria cíclica. El método incluye:

40 (a) la reparación en el extremo de un fragmento de ADN bicatenario para obtener un fragmento de ADN bicatenario con terminales romos;

(b) agregar una base de adenina (A) a cada extremo 3' del fragmento de ADN bicatenario con los terminales romos obtenidos en (a), para obtener un fragmento de ADN bicatenario con una base A en cada extremo 3' del mismo;

(c) ligar un adaptador vesicular del oligonucleótido como se describió anteriormente a cada terminal del fragmento de ADN bicatenario con la base A en cada extremo 3' del mismo obtenido en (b) para obtener un fragmento de ADN bicatenario ligado con el adaptador vesicular del oligonucleótido en cada terminal del mismo;

5 (d) emplear el fragmento de ADN bicatenario ligado con el adaptador vesicular del oligonucleótido en cada terminal del mismo obtenido en (c) como plantilla para la amplificación por PCR con un par de cebadores como se describió anteriormente para obtener un producto amplificado de ADN, en el que uno del par de cebadores está marcado con biotina;

10 (e) aislar el ADN monocatenario marcado con biotina a partir del producto de ADN bicatenario amplificado obtenido en (d) usando perlas recubiertas con avidina a través de la combinación "avidina-biotina" obteniendo así el ADN monocatenario menos biotina para la ciclación;

(f) someter el ADN monocatenario menos la biotina obtenido en (e) a ciclación en presencia de una molécula monocatenaria cíclica.

Como se señaló anteriormente, el fragmento de ADN bicatenario ligado con el adaptador vesicular del oligonucleótido en cada terminal del mismo obtenido en (c) tiene una estructura de fórmula III:

15
$$K1-K2-K3 \quad (III)$$

en la cual,

K1 representa un adaptador vesicular como se describió anteriormente;

K2 representa una secuencia de ADN arbitraria (secuencia de un fragmento que se va a secuenciar);

K3 representa otro adaptador vesicular como se describió anteriormente,

20 en el que K1 y K3 están conectados a K2, respectivamente, en dos terminales de K2.

En una realización de la presente divulgación, K2 tiene una longitud de aproximadamente 150 pb a aproximadamente 250 pb.

En una realización de la presente divulgación, el método incluye además:

25 (g) digerir los ADN no ciclados contenidos en la mezcla obtenida en (f) con nucleasas que digieren específicamente ADN lineales para obtener un producto previo; y

(h) purificar el producto previo obtenido en (g) para obtener la biblioteca monocatenaria cíclica.

En una realización de la presente divulgación, el fragmento de ADN bicatenario en (a) se prepara mediante:

(a0) fragmentar una muestra de ARNm para obtener ARNm fragmentados; y

30 (a1) transcripción inversa de los ARNm fragmentados para obtener un producto amplificado de ADNc como los fragmentos de ADN bicatenario.

En una realización de la presente divulgación, el fragmento de ADN bicatenario en (a) se obtiene fragmentando una muestra de ADN.

En una realización de la presente divulgación, la avidina en (e) es estreptavidina.

En una realización de la presente divulgación, el par de cebadores en (d) incluye:

35 un cebador directo:

5-/phos/AGACAAGCTCNNNNNNNNNGATCGGGCTTCGACTGGAGAC (SEQ ID NO:3); y

un cebador inverso: 5-/bio/TCCTAAGACCGCTTGGCCTCCGACT (SEQ ID NO: 4),

en los cuales,

5-/phos/indica que el nucleótido del terminal 5' se modifica por fosforilación;

40 NNNNNNNNNN representa una secuencia de etiqueta, donde N representa adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G); y

5-/bio/indica que el nucleótido terminal 5' está marcado con biotina.

En una realización de la presente divulgación, la molécula monocatenaria cíclica en (f) es de una secuencia:

TCGAGCTTGTCTTCCTAAGACCGC (SEQ ID NO.: 5).

En una realización de la presente divulgación, las nucleasas usadas en (g) son exonucleasas.

5 En una realización de la presente divulgación, las nucleasas usadas en (g) incluyen una primera exonucleasa que digiere específicamente ADN monocatenarios lineales y una segunda exonucleasa que digiere específicamente ADN bicatenarios lineales.

En una realización de la presente divulgación, las nucleasas incluyen una mezcla de enzimas de Exo I y Exo III. La invención permite la provisión de una biblioteca de secuenciación para una plataforma de secuenciación de alto rendimiento que requiere una biblioteca monocatenaria cíclica, tal como la plataforma de secuenciación de Complete Genomics.

10 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama de flujo que muestra el método para construir una biblioteca de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente divulgación;

La Figura 2 es un diagrama que muestra la estructura de un adaptador vesicular de acuerdo con una realización de la presente divulgación;

15 La Figura 3 es un diagrama que muestra el resultado de una concentración del producto de PCR purificado detectado por Agilent 2100 en la construcción de la biblioteca de ácidos nucleicos; y

La Figura 4 es un electroforetograma de bibliotecas detectadas por un gel desnaturalizado con 6% de TBE, donde las carriles 1 y 2 representan cada uno una biblioteca monocatenaria cíclica, mientras que el carril 3 representa una escalara de ARN monocatenario de bajo rango.

20 Descripción detallada

Los presentes inventores han desarrollado por primera vez un adaptador vesicular para construir de manera eficiente una biblioteca de secuenciación de ácidos nucleicos con alta calidad a través de estudios extensos y en profundidad y un extenso cribado. Los resultados experimentales muestran que, en comparación con los datos de secuenciación obtenidos de otras técnicas de construcción de bibliotecas de secuenciación de ácidos nucleicos, la biblioteca de
 25 secuenciación de ácidos nucleicos construida con el adaptador vesicular de la presente divulgación tiene una mayor calidad y correlación, que se puede utilizar en la plataforma de secuenciación de CG, obteniendo de este modo datos altamente auténticos y fiables sin influencia adversa en el análisis de la información. Sobre esta base, la presente invención se ha completado.

Plataforma de secuenciación de CG

30 Para la plataforma de secuenciación de CG, las nanobolas de ADN están incrustadas en un chip que utiliza tecnología de nanochip de ADN de alta densidad, y las bases en la secuencia se leen con la tecnología de ligamiento de anclaje de sonda combinatoria (cPAL).

Se obtuvieron ADN monocatenarios cíclicos después de la construcción de la biblioteca. Se formó una nanobola de ADN (DNB), que incluía más de 200 copias de ADN monocatenarios cíclicos, mediante una amplificación de círculo rodante, y luego se integró en un agujero en un chip utilizando la tecnología de nanochips de ADN de alta densidad, con cada agujero solo capaz de acomodar una nanobola de ADN (como una nanobola de ADN, una vez combinada con el agujero en el chip, excluirá la combinación de otras nanobolas de ADN con el mismo agujero). La tasa de ocupación del nanochip de ADN fue superior al 90%, y cada nanochip de ADN preparado puede acomodar 180 mil millones de bases para la obtención de imágenes.

40 La técnica cPAL utiliza sondas marcadas con cuatro colores diferentes para leer las bases adyacentes al adaptador como máximo 10 bases consecutivas cada vez. Como cada secuenciación es independiente una de la otra, es decir, el resultado de la secuenciación no se ve afectado por un resultado de secuenciación anterior, por lo que se evita la acumulación de errores, lo que da como resultado una secuenciación de alta precisión con una tasa de error básica tan baja como 1/100.000. Durante la secuenciación, se agrega una molécula de anclaje a un par complementario con el adaptador, luego las sondas marcadas con cuatro colores diferentes se emparejan con las bases correspondientes de la plantilla con las ligasas de ADN. Los tipos de bases se determinan mediante la obtención de imágenes de grupos fluorescentes. Otra ventaja de la tecnología cPAL es que las concentraciones de sondas y enzimas pueden reducirse en gran medida a medida que las bases se leen utilizando una tecnología de ligamiento de anclaje de sonda combinatoria no continua y sin enlace (cPAL). A diferencia de la secuenciación por síntesis, se pueden leer varias bases una vez en cada ciclo de cPAL, de modo que los consumos de los reactivos de secuenciación y el tiempo para la obtención de imágenes se pueden reducir considerablemente. En comparación con la tecnología popular actual de secuenciación de próxima generación, los métodos para construir una biblioteca y su secuenciación de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación pueden obtener muchos más datos mientras consumen menos reactivos.

Método para construir una biblioteca

Una muestra de ARN se digirió con DNasa I. Los ARN digeridos se purificaron con perlas magnéticas limpias de ARN. Se aislaron ARNm de los ARN totales y se purificaron con perlas magnéticas Oligo (dT)₂₅, seguido de fragmentación para obtener ARNm fragmentados. Los ADNc se sintetizaron por transcripción inversa de los ARNm fragmentados, y luego se repararon en el extremo para formar fragmentos de ADN con terminales romos a los que se añadieron bases A para obtener fragmentos de ADN cada uno con una base A en el terminal 3' de los mismos. Los fragmentos de ADN obtenidos cada uno con una base A en el terminal 3' del mismo se ligaron con adaptadores vesiculares para obtener fragmentos de ADN cada uno ligado con el adaptador vesicular en cada terminal del mismo, que se purificaron con perlas magnéticas y luego se amplificaron a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) donde un cebador utilizado está marcado con biotina. El producto de la PCR obtenido de este modo se aisló mediante perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina para obtener un producto monocatenario de la PCR, que se cicla mediante oligonucleótidos puente y ligasas T4. El producto monocatenario no ciclado de la PCR se digirió enzimáticamente para obtener la biblioteca monocatenaria cíclica.

Biblioteca monocatenaria cíclica

La presente divulgación también proporciona en realizaciones una biblioteca monocatenaria cíclica, que es adecuada para la secuenciación y se construye mediante el método descrito anteriormente para construir una biblioteca.

En una realización preferida de la presente divulgación, los presentes inventores han verificado completamente la estabilidad, repetibilidad y verdadera fiabilidad del método de la presente divulgación explorando la condición óptima para construir la biblioteca y comparando los resultados obtenidos bajo la condición óptima con la obtenida por las otras técnicas. Además, se ha demostrado mediante varios experimentos con diferentes muestras que los datos de secuenciación obtenidos por la biblioteca monocatenaria cíclica de la presente divulgación son verdaderamente creíbles.

Las ventajas de la presente divulgación radican en que:

(1) El adaptador vesicular para construir la biblioteca de ácidos nucleicos se inventa por primera vez.

(2) Con el uso de un adaptador vesicular en realizaciones de la presente divulgación en la construcción de la biblioteca de ácidos nucleicos, tanto la eficiencia de ligación como la eficiencia de la PCR posterior son altas y las etapas de seguimiento son pocas.

(3) La biblioteca de ácidos nucleicos en realizaciones de la presente divulgación también se puede usar en una plataforma de secuenciación que necesita una biblioteca monocatenaria cíclica.

(4) El método proporcionado en las realizaciones de la presente divulgación es de alto rendimiento de secuenciación, alta precisión y operación simple.

(5) El método proporcionado en las realizaciones de la presente divulgación es de alta estabilidad, repetibilidad y confiabilidad.

La presente descripción se describirá adicionalmente a continuación con referencia a realizaciones específicas. Debe apreciarse que estas realizaciones se usan meramente para ilustrar la presente divulgación y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente divulgación. Los métodos experimentales en las siguientes realizaciones, que no especifican las condiciones detalladas, se llevarán a cabo de acuerdo con las condiciones convencionales, tal como se describe en Sambrook et al., *Molecular Cloning: Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), o de acuerdo con las condiciones propuestas por el fabricante. Los porcentajes y partes son en peso, a menos que se indique lo contrario.

Materiales y métodos

En las siguientes realizaciones, el reactivo se preparó de la siguiente manera: 5 x regulador de la primera cadena que contiene: cloruro de sodio 80-400 mM, cloruro de magnesio 10-80 mM, Tris-HCl 200 mM a 300 mM, fosfato y agua como disolvente, con un pH de 8,0-8,5. La sustancia estándar, el ARN de referencia humano universal, se adquirió a través de Agilent. Dicho ARN es una mezcla de 10 clases de líneas celulares humanas (células de mama, células de carcinoma de hepatoma, células cervicales, células embrionarias, células de glioma maligno, células de melanoma, células de liposarcoma, células de linfoma, células T de leucemia y linfocitos B de médula ósea).

Los fragmentos de ADN se purificaron mediante perlas magnéticas Ampure XP.

Los materiales usados en las realizaciones de la presente divulgación están todos disponibles comercialmente, a menos que se especifique lo contrario.

Realización 1

Construcción de la biblioteca de ARN con el uso del adaptador de nucleótido vesicular.

Los procedimientos específicos se llevaron a cabo de la siguiente manera (véanse los procedimientos mostrados en

la Fig. 1):

Los procedimientos específicos:

1. purificación de ARNm:

- 5 1) Se añadió ARN de referencia humano universal estándar (3 µg, Agilent) en un tubo libre de RNasa y se diluyó en 50 µL con DEPC. La mezcla obtenida se desnaturizó a 65 °C durante 5 minutos después de una mezcla uniforme para degradar la estructura secundaria del ARN, luego se colocó inmediatamente en hielo para obtener una muestra de ARN.
- 10 2) Se agregaron 15 µL de perlas magnéticas Dynalbeads Oligo (dT)₂₅ a un tubo EP antiadherente, se lavaron dos veces con 100 µL de regulador de unión y luego se resuspendieron en 50 µL de regulador de unión, seguido por la combinación con la muestra de ARN obtenida en 1), y finalmente se detuvo durante 5 min a temperatura ambiente.
- 15 3) El tubo EP antiadherente se colocó en MPC (separador magnético) durante 2 minutos para eliminar el sobrenadante. Las perlas magnéticas restantes se lavaron dos veces con 200 µL de regulador de lavado. Se agregaron 50 µL de regulador de unión a un nuevo tubo EP antiadherente.
- 20 4) El tubo EP (es decir, el tubo EP antiadherente en 3) que contenía perlas magnéticas se le agregaron 50 µL de Tris-HCl 10 mM y se calentó a 80 °C durante 2 minutos para eluir los ARNm de las perlas magnéticas. Luego, el tubo EP antiadherente se transfirió rápidamente al MPC. Los ARNm se transfirieron al nuevo tubo EP antiadherente que contenía el regulador de unión en 3), la mezcla obtenida se desnaturizó a 65 °C durante 5 minutos para degradar la estructura secundaria de los ARNm y se colocó inmediatamente en hielo. Además, se añadieron inmediatamente 200 µL de regulador de lavado en el tubo que contenía las perlas magnéticas restantes para lavar las perlas magnéticas dos veces.
- 25 5) Se añadieron 100 µL de muestra de ARNm con perlas magnéticas, se lavaron dos veces y luego se mantuvieron en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente. El tubo EP se colocó en MPC durante 2 minutos, el sobrenadante se extrajo cuidadosamente y las perlas magnéticas restantes se lavaron dos veces con 200 µL de regulador de lavado.
- 6) Al tubo EP que contiene las perlas magnéticas se le agregaron 17 µL de Tris-HCl 10 mM, luego se calentó a 80 °C durante 2 minutos para eluir los ARNm de las perlas magnéticas. El tubo EP se colocó rápidamente en MPC. El eluyente que contiene los ARNm se transfirió a un nuevo tubo de PCR de 200 µL. Se reciclaron aproximadamente 16 µL de ARNm.

2. Fragmentación del ARNm y síntesis de una primera cadena

- 30 Después de combinar con 3 µL del regulador de la primera cadena 5 x, el eluyente obtenido en la etapa anterior se incubó primero a 94 °C durante 10 minutos, luego se colocó inmediatamente en hielo, luego se combinó con 1 µL de cebadores aleatorios, y se incubó adicionalmente a 65 °C durante 5 minutos para degradar la segunda estructura y luego se colocó en hielo. Se añadió una mezcla de reacción, formulada con DTT 100 mM (2 µL), mezcla de dNTP 25 mM (0,4 µL) e inhibidor de RNasa (0,5 µL) en el tubo que contenía ARN, se mezcló hasta uniformidad y luego se mantuvo estable durante 2 minutos a temperatura ambiente, luego se combina con 1 µL de Superscript II (200U/µL) y agua hasta 25 µL. La reacción de PCR se realizó de acuerdo con los siguientes procedimientos:

35	Paso 1	25 °C	10min
	Paso 2	42 °C	50min
	Paso 3	70 °C	15min
40	Paso 4	4 °C	mantener

3. Síntesis de una segunda cadena

- 45 Después de la reacción de PCR anterior, al sistema de reacción resultante se le añadió agua hasta 82,8 µL, luego se mezcló con 10 µL de regulador de la segunda cadena 5 x y 1,2 µL de mezcla de dNTP 25 mM en secuencia para ser uniforme, seguido de la colocación en hielo durante 5 minutos, y luego mezclar con 1 µL de RNasaH y 5 µL de ADN Pol I para que sea uniforme. Dicho sistema de reacción obtenido para sintetizar una segunda cadena se incubó a 16 °C durante 2,5 h.

Una vez completada la reacción, el producto bicatenario resultante se purificó con perlas magnéticas Ampure XP, y el producto bicatenario purificado (ADN) se disolvió en 50 µL de regulador EB.

4. Reparación en el extremo

- 50 A una solución de 50 µL que contenía los ADN bicatenarios obtenidos en la etapa anterior se le añadieron

sucesivamente 27,4 µL de agua, 10 µL de regulador de reparación en el extremo 10X, 1,6 µL de mezcla de dNTP 25 mM, 5 µL de ADN polimerasas T4, 1 µL de ADN polimerasa Klenow y 5 µL de PNK T4 para formar 100 µL del sistema de reacción que se incubó a 20 °C durante 30 min.

5 Una vez completada la reacción, el producto reparado en el extremo se purificó con perlas magnéticas Ampure XP y luego se disolvió en 32 µL de regulador EB.

5. Adición de la base A y ligación del adaptador

10 A una solución de 32 µL que contenía ADN reparados en el extremo obtenidos en la etapa anterior se le añadieron sucesivamente 5 µL de regulador de cola A, 10 µL de dATP 1 mM y 3 µL de Klenow exo (actividades inhibitorias de exonucleasas para digerir desde el extremo 3' hasta Extremo 5') para formar un sistema de reacción de 50 µL, que se incubó a 37 °C durante 30 min.

Después de que se completó la reacción, el producto agregado de la base A se purificó con perlas magnéticas Ampure XP y luego se disolvió en 23 µL de regulador EB.

15 A una 23 µL de solución que contenía producto añadido con base A obtenido en la etapa anterior se le añadieron sucesivamente 25 µL de regulador rápido ADN Ligasa T4 2X, 1 µL de mezcla del adaptador vesicular (con una estructura como se muestra en la Figura 2) (que contiene el adaptador vesicular en una cantidad de 50 µmol) y 1 µL de ADN ligasa T4 para formar un sistema de reacción de 50 µL, que se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

La secuencia del adaptador fue la siguiente:

5'-GTCCTAAGACCCNGATCGGGCTTCGACTGGAGACTCCGACTT-3' (SEQ ID NO:1)

20 5'-/phos/AGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGACAT-3' (SEQ ID NO: 2).

Una vez completada la reacción, el producto de ligación se purificó con perlas magnéticas Ampure XP y luego se disolvió en 10 µL de regulador EB.

6. Amplificación y purificación por PCR.

25 A 30 µL de solución que contenía el producto ligado al adaptador obtenido en la etapa previa se le añadieron sucesivamente 10 µL de regulador Phusion Buffer,

1 µL de cebador F de PCR (5-/phos/AGACAAGCTCNNNNNNNNNGATCGGGCTTCGACTGGAGAC) (SEQ ID NO: 3),

30 1 µL de cebador R de PCR (5-/bio/TCCTAAGACCGCTTGGCCTCCGACT) (SEQ ID NO: 4), 0,5 µL de mezcla de dNTP 25 mM, 0,5 µL de ADN polimerasa de Phusion y 7 µL de agua para formar un sistema de reacción de 50 µL, que se incubó en el instrumento de PCR de acuerdo con los siguientes procedimientos:

a. 30 segundos, 98 °C

b. 15 ciclos:

10 segundos, 98 °C

30 segundos, 65 °C

35 30 segundos, 72 °C

c. 5 minutos, 72 °C

d. mantener a 4 °C

40 Una vez completada la reacción, el producto de PCR amplificado se purificó con perlas magnéticas Ampure XP y luego se disolvió en 32 µL de regulador EB. La concentración del producto de PCR purificado se detectó con Agilent 2100 y los resultados se muestran en la Figura 3.

7. Aislamiento de un producto monocatenario.

7.1 Lavado de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina

45 Se mezclaron 30 µL de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (para cada muestra) con 90 µL a 150 µL del regulador de unión de perlas magnéticas 1X hasta uniformidad en un tubo antiadherente, que luego se colocó en un separador magnético para dejarlo en reposo y adsorción. El tubo antiadherente se ajustó para estar en una dirección tal que permita que las perlas magnéticas se muevan hacia adelante y hacia atrás en el regulador de unión de perlas

magnéticas 1X, seguido por el descarte del sobrenadante. Después de que la etapa de ajuste de la dirección se repitió una vez, se sacó el tubo antiadherente del separador magnético, se agregaron 30 µL de regulador de unión de perlas magnéticas 1X, seguido de reposo a temperatura ambiente.

5 7.2 Después de combinar con agua hasta 60 µL, el producto de PCR purificado obtenido en la etapa 6 primero se mezcló con 20 µL de regulador de unión de perlas magnéticas 4X hasta uniformidad, y luego se transfirió al tubo antiadherente obtenido en 7.1 que contenía perlas magnéticas disueltas en 30 µL de regulador de unión de perlas magnéticas 1X, seguido de mezcla hasta uniformidad. Dicha mezcla resultante de 110 µL se incubó a temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos, durante los cuales la mezcla se agitó suavemente una vez para que se distribuyera uniformemente.

10 7.3 El tubo antiadherente después de la etapa 7.2 se colocó en el separador magnético durante 3 a 5 minutos, seguido del descarte del sobrenadante. Las perlas magnéticas restantes se lavaron dos veces con 1 mL de regulador de lavado de perlas magnéticas 1X como se describió en etapa 7.1.

15 7.4 Las perlas magnéticas después de la etapa 7.3 se mezclaron uniformemente con 78 µL de NaOH 0.1M por soplado hacia arriba y hacia abajo para obtener una mezcla, seguido de reposo durante 10 minutos y luego se colocaron en el separador magnético durante 3 a 5 minutos. Se transfirieron 74,5 µL de sobrenadante obtenido a un nuevo tubo EP de 1,5 ml.

7.5 Se agregaron 37,5 µL de MOPS 0,3 M en el tubo EP de 1,5 mL después de la etapa 7.4, seguido de mezcla hasta uniformidad obteniendo así una muestra de 112 µL para su uso.

7.6 La muestra de 112 µL se puede almacenar a -20 °C.

20 8. Ciclización del producto monocatenario.

8.1 Se formuló una solución de reacción con cebador de la siguiente manera aproximadamente 5 minutos antes:

ON1587 (TCGAGCTTGTCTTCTTAAGACCGC) (SEQ ID NO:5)

	Agua	43 µL
	ON1587 20 µM	20 µL
25	Volumen total	63 µL

8.2 Se mezclaron 63 µL de la solución de reacción con cebador obtenida en la etapa 8.1 agitando a fondo, se centrifugó y luego se agregaron a la muestra 112 µL obtenidos en la etapa 7 (la cantidad inicial n de la muestra fue crítica y generalmente se controló dentro de $100 \text{ ng} \leq n \leq 800 \text{ ng}$).

8.3 Se formuló una solución de reacción de ligasa de la siguiente manera aproximadamente 5 minutos antes:

30	agua	135,3 µL
	Regulador TA 10x (LK1)	35 µL
	ATP 100 mM	3,5 µL
	600 U/µL de Ligasa	1,2 µL
	total	175 µL

35 8.4 Se mezclaron 175 µL de solución de reacción de ligasa obtenida en la etapa 8.3 agitando a fondo, se centrifugó y luego se agregaron al tubo EP después de la etapa 8.2 que contenía la solución de reacción con cebador. Una mezcla así obtenida en esta etapa se mezcló agitando durante 10 s hasta uniformidad, y luego se centrifugó.

8.5 La mezcla obtenida en la etapa 8.4 se incubó en una incubadora durante 1,5 h a 37 °C.

40 8.6 Una vez completada la reacción, se detectaron 10 µL de la muestra resultante mediante electroforesis en un gel desnaturalizado al 6%, y la muestra restante en aproximadamente 350 µL se dejó en la siguiente reacción enzimática.

9. Digestión enzimática

9.1 Se formuló una solución de reacción de digestión enzimática de la siguiente manera aproximadamente 5 minutos antes:

	Agua	1,5 µL
45	Regulador TA 10x (LK1)	3,7 µL

ES 2 738 480 T3

20 U/μL de Exo I	11,1 μL
200 U/μL de Exo III	3,7 μL
total	20 μL

5 9.2 Se mezclaron 20 μL de solución de reacción de digestión enzimática obtenida en la etapa 9.1 agitando a fondo, se centrifugó y luego se agregaron a 350 μL de la muestra obtenida en la etapa 8.5 para obtener una mezcla.

9.3 La mezcla obtenida en la etapa 9.2 se mezcló con agitación durante 10 s hasta uniformidad y se centrifugó, y luego se incubó en la incubadora durante 30 min a 37 °C.

9.4 Después de 30 minutos, la reacción enzimática se detuvo agregando 15,4 μL de EDTA 500 mM.

10 9.5 Una muestra obtenida en la etapa 9.4 se purificó con perlas magnéticas PEG32 1,3X/Tween 20 (o perlas magnéticas Ampure XP) de la siguiente manera:

La muestra obtenida en la etapa 9.4 se transfirió a un tubo antiadherente de 1,5 mL y luego se combinó con 500 μL de perlas magnéticas PEG32. La mezcla así obtenida se dejó para unión a temperatura ambiente durante 15 minutos, durante los cuales la mezcla se mezcló una vez soplando hacia arriba y hacia abajo hasta uniformidad.

15 9.6 El tubo antiadherente después de la etapa 9.5 se colocó en el separador magnético durante 3 a 5 minutos, después de lo cual se desechó el sobrenadante, las perlas magnéticas restantes se lavaron dos veces con 700 μL de etanol al 75%, durante cada una de las cuales el tubo antiadherente se invirtió hacia adelante y hacia atrás para permitir que las perlas magnéticas se muevan 2 a 3 veces en el etanol.

9.7 Las perlas magnéticas después del lavado se secaron al aire y luego se redisolviéron en 40 μL de TE 1X durante 15 minutos, durante lo cual la mezcla así obtenida se mezcló una vez hasta uniformidad.

20 9.8 El sobrenadante de la mezcla obtenida en la etapa 9.8 se transfirió a un nuevo tubo EP de 1,5 ml, el producto final se cuantificó con el kit de ensayo de ADN monocatenario Qubit^{MR}.

25 9.9 5 μL de la muestra y 2 μL de la escalera de ARN de bajo rango se mezclaron respectivamente con 5 μL de 2x de regulador de carga de ARN hasta uniformidad en diferentes tubos de PCR, los cuales se incubaron a 95 °C durante 2 minutos para la desnaturalización en un instrumento de PCR y se enfriaron rápidamente en hielo durante 5 min. Las muestras resultantes se detectaron con un gel desnaturalizado con TBE al 6%. Los resultados se muestran en la Figura 4.

9.10 Estandarización de la concentración.

La cantidad inicial de la muestra preparada con nanobolas de ADN (DNB) se ajustó uniformemente a 7,5 fmol/μL de acuerdo con la concentración a la que se detectaron cuantitativamente las moléculas monocatenarias.

30 Realización 2

Comparación de la eficiencia de la PCR del adaptador vesicular en la construcción de la biblioteca con la de otros tipos de adaptadores

Las etapas específicas fueron los siguientes:

35 Se llevaron a cabo las mismas etapas que los descritos en la Realización 1, donde un adaptador era el adaptador vesicular, y el adaptador de comparación era un adaptador de emparejamiento. La amplificación y purificación por PCR se completaron como se describe en la etapa 6, después de lo cual se detectó la cantidad de producto de PCR purificado.

La concentración de la plantilla de PCR y la concentración de reciclado se midieron con el kit de ensayo de ADN bicatenario Qubit.

40 Los resultados experimentales se muestran en la Tabla

Adaptador	Adaptador de emparejamiento	Adaptador vesicular
Cantidad de plantilla de PCR (ng)	10	10
Concentración de producto reciclado (ng/μL)	5,66	53
Cantidad total de producto reciclado (ng)	226,4	2120

ES 2 738 480 T3

Eficiencia de la PCR	1,366	1,709
Nota: eficiencia de la PCR = (rendimiento total de la PCR/cantidad inicial de plantilla) × (1/ciclos)		

Se puede observar a partir de los resultados anteriores que la eficacia de la PCR del adaptador vesicular es evidentemente mayor que aquella del adaptador de emparejamiento.

Listado de secuencias

- 5 <110> MGI TECH CO., LTD
- <120> ADAPTADOR VESICULAR Y SUS USOS EN LA CONSTRUCCIÓN Y SECUENCIACIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE ÁCIDOS NUCLEICOS
- 10 <130> P241685EPD1 /CI
- <140> Divisional del documento EP14901593.5 con base en el documento PCT/CN2014/091852
<141> 2014-11-21
- 15 <150> PCT/CN2014/086418
<151> 2014-09-12
- <160> 5
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 41
<212> ADN
25 <213> Oligonucleótido
- <220>
<221> características diversas
- 30 <223> n es a, c, g, o t
- <220>
<221> características diversas
<222> (12)..(12)
35 <223> n es a, c, g, o t
- <400> 1
gtcctaagac cngatcgggc ttcgactgga gactccgact t 41
- 40 <210> 2
<211> 28
<212> ADN
<213> Oligonucleótido
- 45 <400> 2
agtcggaggc caagcgggtct taggacat 28
- <210> 3

<211> 41
 <212> ADN
 <213> Oligonucleótido

5 <220>
 <221> características diversas
 <222> (11)..(20)
 <223> Secuencia de la Etiqueta

10 <220>
 <221> características diversas
 <222> (11)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

15 <400> 3
 agacaagctc nnnnnnnnnn gatcgggctt cgactggaga c 41

20 <210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Oligonucleótido

<400> 4
 tcctaagacc gcttggcctc cgact 25

25 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Oligonucleótido

30 <400> 5
 tcgagcttgt ctctctaaga ccgc 24

REIVINDICACIONES

1. Uso de un adaptador vesicular del oligonucleótido para la construcción de una biblioteca de ácidos nucleicos monocatenarios cíclicos en donde dicho adaptador comprende
- una región bicatenaria emparejada en 5' en un primer terminal del adaptador;
- 5 una región bicatenaria emparejada en 3' en un segundo terminal del adaptador, que comprende una primera cadena y una segunda cadena complementarias entre sí, en la que la primera cadena comprende un saliente en el extremo 3' de la misma y la segunda cadena comprende una base fosforilada en su extremo 5' para proporcionar un terminal adherente y
- 10 una región vesicular no emparejada entre la región bicatenaria emparejada en 5' y la región bicatenaria emparejada en 3',
- en donde la región vesicular no emparejada comprende una primera cadena y una segunda cadena no complementarias entre sí y la primera cadena es de una longitud más larga que la de la segunda cadena,
- y dicho uso incluye:
- 15 (a) la ligación de dicho adaptador vesicular del oligonucleótido con un fragmento de ADN bicatenario para proporcionar una estructura K1-K2-K3 en la que K1 y K3 representan cada uno un adaptador vesicular ligado a través del terminal adherente de dicha región bicatenaria emparejada en 3';
- (b) someter dicha estructura bicatenaria obtenida en (a) a la amplificación por PCR empleando un primer cebador que tiene la misma secuencia que al menos una parte de la primera cadena de la región vesicular no emparejada y un segundo cebador que se empareja específicamente con la segunda cadena de la región vesicular no emparejada para
- 20 proporcionar un producto amplificado para el aislamiento de un ADN monocatenario para la ciclación.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el terminal adherente de la región bicatenaria emparejada en 3' de dicho adaptador vesicular del oligonucleótido tiene una cola de una sola base.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha cola de una sola base es timina (T).
4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la primera cadena de la región no emparejada vesicular es más larga que la segunda cadena de la región no emparejada vesicular en al menos 5 a 30
- 25 nt.
5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la región bicatenaria emparejada en 5' también tiene un terminal adherente.
6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la región bicatenaria emparejada en
- 30 5' tiene un terminal adherente de 1 a 3 bases no complementarias.
7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho adaptador vesicular del oligonucleótido comprende una cadena sentido y una cadena antisentido y es de una estructura de Fórmula I desde el terminal 5' hasta el terminal 3':
- Y0-Y1-Y2 (I)**
- 35 en la cual
- Y0 representa la región bicatenaria emparejada en 5', y tiene una longitud de 10 a 15 nt, preferiblemente de 11 nt;
- Y1 representa una región bicatenaria no emparejada, cuya cadena sentido es de una longitud de 5 a 30 nt más larga que la de la cadena antisentido;
- Y2 representa la región bicatenaria emparejada en 3'.
- 40 8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho primer cebador también se puede usar como un cebador de secuenciación para la secuenciación de la biblioteca monocatenaria cíclica después de la construcción.
9. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en donde se lleva a cabo un método para construir una biblioteca monocatenaria cíclica, que comprende:
- 45 (a) la reparación en el extremo de un fragmento de ADN bicatenario para obtener un fragmento de ADN bicatenario con terminales romos;
- (b) agregar una base de adenina (A) a cada extremo 3' del fragmento de ADN bicatenario con los terminales romos

obtenidos en (a), para obtener un fragmento de ADN bicatenario con una base A en cada extremo 3' del mismo;

(c) ligar un adaptador vesicular del oligonucleótido como se describió anteriormente a cada terminal del fragmento de ADN bicatenario con la base A en cada extremo 3' del mismo obtenido en (b) para obtener un fragmento de ADN bicatenario ligado con el adaptador vesicular del oligonucleótido en cada terminal del mismo;

5 (d) emplear el fragmento de ADN bicatenario ligado con el adaptador vesicular del oligonucleótido en cada terminal del mismo obtenido en (c) como plantilla para la amplificación por PCR con un par de cebadores como se describió anteriormente para obtener un producto amplificado de ADN, en el que uno del par de cebadores está marcado con biotina;

10 (e) aislar el ADN monocatenario marcado con biotina a partir del producto de ADN bicatenario amplificado obtenido en (d) usando perlas recubiertas con avidina a través de la combinación "avidina-biotina" obteniendo así el ADN monocatenario menos biotina para la ciclación;

(f) someter el ADN monocatenario menos la biotina obtenido en (e) a ciclación en presencia de una molécula monocatenaria cíclica.

10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende además:

15 (g) digerir los ADN no ciclados contenidos en la mezcla obtenida en (f) con nucleasas que digieren específicamente ADN lineales para obtener un producto previo; y

(h) purificar el producto previo obtenido en (g) para obtener la biblioteca monocatenaria cíclica.

20 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde las nucleasas usadas en (g) comprenden una primera exonucleasa que digiere específicamente ADN monocatenarios lineales y una segunda exonucleasa que específicamente digiere ADN bicatenarios lineales.

Figura 1

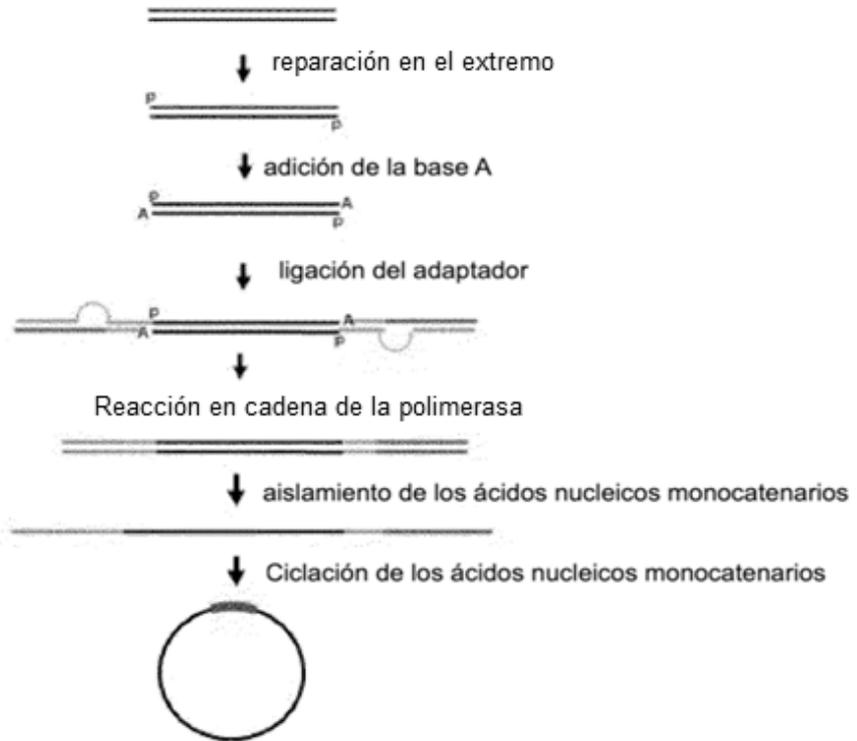


Figura 2



Figura 3

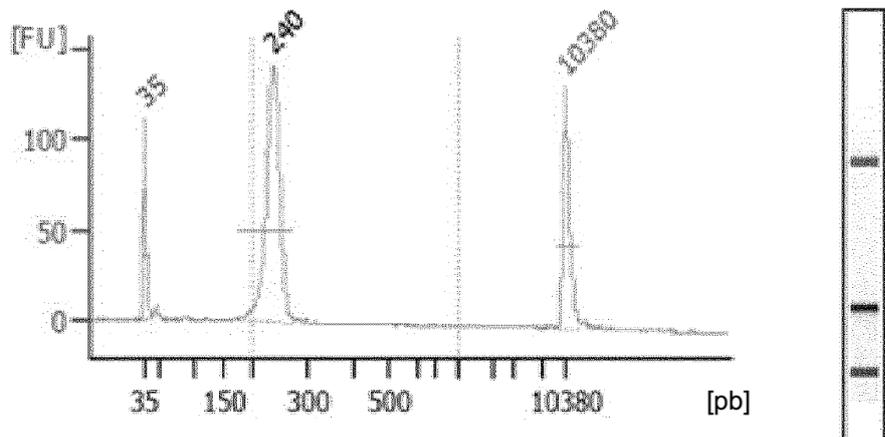


Figura 4

