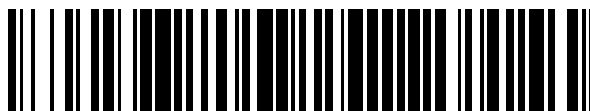


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 017**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

G06F 17/00 (2006.01)

G06F 19/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2010** **E 10843520 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016** **EP 2516680**

54 Título: **Procedimientos y kits para identificar la aneuploidia**

30 Prioridad:

22.12.2009 US 289370 P

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

12.07.2016

73 Titular/es:

SEQUENOM, INC. (100.0%)
3595 John Hopkins Court
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

EHRICH, MATHIAS;
MISTRO, GUY DEL;
DECIU, COSMIN;
CHEN, YONG QING;
MCCULLOUGH, RON MICHAEL y
TIM, ROGER CHAN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 577 017 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

Procedimientos y kits para identificar la aneuploidia

Campo

- 5 La tecnología se refiere en parte a procedimientos y composiciones para identificar una anomalía cromosómica, que incluyen, sin limitación, pruebas prenatales para detectar una aneuploidia (por ejemplo, trisomía 21 (síndrome de Down), trisomía 18 (síndrome de Edwards), trisomía 13 (síndrome de Patau)).

Antecedentes

- 10 Un cromosoma es una estructura organizada de ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteína que se encuentra en las células. Un cromosoma incluye en general un único fragmento de ADN que contiene muchos genes, elementos reguladores y otras secuencias de nucleótidos. La mayoría de las células en los seres humanos y otros mamíferos incluyen típicamente dos copias de cada cromosoma.

- 15 Organismos diferentes incluyen cantidades de cromosomas diferentes. La mayoría de las células felinas incluyen diecinueve (19) pares de cromosomas y la mayoría de las células caninas incluyen treinta y nueve (39) pares de cromosomas. La mayoría de las células humanas incluyen veinte y tres (23) pares de cromosomas. Una copia de cada par se hereda de la madre y la otra copia se hereda del padre. Los primeros veintidós (22) pares de cromosomas (denominados autosomas) se enumeran de 1 a 22, y están dispuestos del más grande al más pequeño en un cariotipo. El par veintitrés (23^o) de cromosomas es un par de cromosomas sexuales. Típicamente, las mujeres tienen dos cromosomas X, mientras que, típicamente, los hombres tienen un cromosoma X y un cromosoma Y.

- 20 Las anomalías cromosómicas se pueden producir de formas diferentes. La aneuploidia es un número anómalo de ciertos cromosomas en las células de un organismo. Existen múltiples mecanismos que pueden dar lugar a una aneuploidia, y la aneuploidia se puede producir en células cancerosas o células fetales, por ejemplo. Muchos fetos con células aneuploides no sobreviven al parto. Cuando un feto que tiene células aneuploides sobrevive al parto, el individuo afectado está en riesgo de padecer determinadas enfermedades y síndromes, incluyendo cáncer y otros descritos en el presente documento.

- 25 Un cromosoma adicional o ausente está asociado con una serie de enfermedades y síndromes, incluyendo síndrome de Down (trisomía 21), síndrome de Edwards (trisomía 18) y síndrome de Patau (trisomía 13), por ejemplo. Se estima una incidencia de la trisomía 21 en 1 de 600 nacimientos y se incrementa a 1 de 350 en mujeres de edad superior a 35. El síndrome de Down presenta múltiples características dismórficas, incluyendo fenotipo físico, retraso mental y cardiopatías congénitas (por ejemplo, aproximadamente en un 40 % de los casos). Se estima una
30 incidencia de la trisomía 18 en 1 de 80.000 nacimientos, incrementándose a 1 de 2.500 nacimientos en mujeres de edad superior a 35. El síndrome de Edwards también presenta múltiples características dismórficas y un retraso mental profundo. Las anomalías congénitas del tubo neural abierto o de la pared anterior abierta se presentan aproximadamente en un 25 % de los casos y existe una tasa de letalidad de un 90 % en el primer año. Se estima una incidencia de la trisomía 13 en 1 de 10.000 recién nacidos vivos, y presenta anomalías cardíacas, anomalías cerebrales, labio leporino fisura palatina, alteraciones visuales (por ejemplo, onfalocelo, trompa y holoprosencefalia),
35 por ejemplo. Más de un 80 % de los niños con trisomía 13 mueren en el primer mes de vida.

- La aneuploidia en fetos en gestación se puede diagnosticar con una exactitud relativa por procedimientos de cariotipado y de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Dichos procedimientos, en general, implican amniocentesis y
40 biopsia de vellosidades coriónicas (BVC), ambos procedimientos relativamente invasivos, seguidos de varios días de cultivo celular y un análisis subjetivo de los cromosomas de la metafase. Existe además un riesgo no trivial de aborto asociado con estos procedimientos. Puesto que estos procedimientos son altamente laboriosos, se han propuesto como sustitutos ciertos procedimientos que son menos laboriosos. Los ejemplos de procedimientos potencialmente menos laboriosos incluyen la detección usando repeticiones en tándem cortas, cuantificación basada en PCR de cromosomas usando procedimientos basados en hibridación y moldes competidores sintéticos.

Resumen

- Los procedimientos actuales de cribado para las trisomías incluyen pruebas séricas y también pueden incluir una ecografía de translucidez nuchal (NT). Si el análisis del riesgo calculado es alto, la paciente se puede derivar para
50 realizar una amniocentesis o BVC para confirmación. Sin embargo, típicamente, el tratamiento de referencia en los Estados Unidos y Europa puede lograr una tasa de detección de un 80-85 % con una tasa de positivo falso de un 4-7 %. Como consecuencia, se está derivando innecesariamente a muchas pacientes para realizar procedimientos de amniocentesis o BVC invasivos. La amniocentesis implica la perforación del útero y del saco amniótico e incrementa el riesgo de aborto, y las células fetales obtenidas por amniocentesis a menudo se cultivan durante un periodo de tiempo para obtener células fetales suficientes para su análisis.

- 55 La tecnología descrita en el presente documento proporciona procedimientos no invasivos para detectar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica analizando el ácido nucleico extracelular (por ejemplo, el ácido nucleico obtenido a partir de una muestra acelular). Los procedimientos descritos en el presente documento también ofrecen

un incremento en la sensibilidad y especificidad en comparación con los procedimientos no invasivos actuales (por ejemplo, cribado sérico).

La determinación de si existe una anomalía cromosómica cuando se analiza el ácido nucleico libre de células puede presentar un reto debido a que existe ácido nucleico no diana mezclado con ácido nucleico diana. Por ejemplo, el ácido nucleico extracelular obtenido de una mujer embarazada para pruebas prenatales incluye el historial de ácidos nucleicos maternos junto con el ácido nucleico fetal diana. La tecnología descrita en el presente documento proporciona procedimientos para analizar con exactitud el ácido nucleico extracelular para determinar anomalías cromosómicas cuando está presente un historial de ácido nucleico no diana.

Por tanto, en el presente documento se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden: (a) preparar una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y (b) determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto; de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos.

También se proporcionan en el presente documento procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden: (a) preparar una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto por un único conjunto de cebadores de amplificación, (v) y cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y (b) determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto; de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos. En otro modo de realización, los cebadores de amplificación están modificados o de otro modo son diferentes entre sí y proporcionan productos de amplificación a niveles reproducibles relativos entre sí.

También se proporcionan en el presente documento procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía de un cromosoma diana en un sujeto, que comprenden: (a) preparar tres o más conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando tres o más conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir de un molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) una secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en un cromosoma diana y al menos una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto está presente en uno o más cromosomas de referencia, (iii) el cromosoma diana es común para todos los conjuntos; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (v) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (vi) las secuencias de hibridación de cebador de cada secuencia de nucleótidos en un conjunto en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vii) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y (b) determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto; (c) detectar la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos; de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a una disminución o incremento del cromosoma diana con relación al uno o más cromosomas de referencia. En un modo de realización relacionado, los tres o más conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se amplifican en una única reacción multiplexada. En otro modo de realización, la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto se determina en una única reacción multiplexada. En otro modo de realización, la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto se determina en dos o más reacciones multiplexadas replicadas. Aún en otro modo de realización, detectar la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos; de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a una disminución o incremento del cromosoma diana con relación al uno o más cromosomas de referencia.

En el presente documento también se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden: (a) preparar un conjunto de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando secuencias de nucleótidos de un molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en el conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en el conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en el conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en el conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y (b) determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en el conjunto; de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden: (a) preparar un conjunto de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando secuencias de nucleótidos de un molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en el conjunto está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13, (iii) cada secuencia de nucleótidos en el conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en el conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en el conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y (b) determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto; de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados en el conjunto. En determinados modos de realización, se utilizan dos o más conjuntos de especies de secuencias de nucleótidos, y especies de ácidos nucleicos amplificados generadas a partir de las mismas.

En algunos modos de realización, la anomalía cromosómica es la aneuploidia de un cromosoma diana, y en determinados modos de realización, el cromosoma diana es el cromosoma 21, cromosoma 18, cromosoma X y/o cromosoma Y. En algunos modos de realización, cada secuencia de nucleótidos en un conjunto no está presente en ningún cromosoma aparte de en cada cromosoma diana sin excepción.

El ácido nucleico del molde es de la sangre, en algunos modos de realización, y a veces la sangre es plasma sanguíneo, suero sanguíneo o una combinación de los mismos. El ácido nucleico extracelular a veces comprende una mezcla de ácido nucleico de células cancerosas y ácido nucleico de células no cancerosas. En algunos modos de realización, el ácido nucleico extracelular comprende una mezcla de ácido nucleico fetal y ácido nucleico materno. A veces la sangre es de una paciente embarazada que está en el primer trimestre del embarazo, el segundo trimestre del embarazo, o el tercer trimestre del embarazo. En algunos modos de realización, el molde de ácido nucleico comprende una mezcla de ácido nucleico materno y ácido nucleico fetal, y el ácido nucleico fetal a veces es de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 40 % del ácido nucleico. En algunos modos de realización, el ácido nucleico fetal es de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 4,99 % del ácido nucleico. En determinados modos de realización, el ácido nucleico fetal es de aproximadamente un 40,01 % a aproximadamente un 99 % del ácido nucleico. En algunos modos de realización, un procedimiento descrito en el presente documento comprende determinar la concentración de ácido nucleico fetal en el ácido nucleico, y en algunos modos de realización, la cantidad de ácido nucleico fetal se determina en base a un marcador específico para el feto (por ejemplo, específico para fetos macho). La cantidad de ácido nucleico fetal en el ácido nucleico extracelular se puede utilizar para la identificación de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en determinados modos de realización. En algunos modos de realización, el ácido nucleico fetal del ácido nucleico extracelular se enriquece, por el uso de diversos procedimientos de enriquecimiento, con relación al ácido nucleico materno.

Cada secuencia de nucleótidos en un conjunto es sustancialmente idéntica a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, en algunos modos de realización. En determinados modos de realización, cada secuencia de nucleótidos en un conjunto es una secuencia paráloga, y a veces cada secuencia de nucleótidos en cada conjunto comparte una identidad de aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con otra secuencia de nucleótidos en el conjunto. En algunos modos de realización, cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más emparejamientos erróneos de bases nucleotídicas (por ejemplo, diferencias de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 emparejamientos erróneos). En determinados modos de realización, el uno o más emparejamientos erróneos de bases nucleotídicas son polimorfismos (por ejemplo, SNP, inserciones o deleciones) con una tasa de heterocigosis baja (por ejemplo, menos de un 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos). Una o más de las secuencias de nucleótidos son no exónicas en algunos modos de realización, y a veces una o más de las secuencias de nucleótidos son intergénicas, intrónicas, parcialmente exónicas o parcialmente no exónicas. En determinados modos de realización, una secuencia de nucleótidos en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos exónica, secuencia intergénica o una

secuencia de nucleótidos no exónica. En algunos modos de realización, una o más especies de secuencias de nucleótidos se seleccionan del grupo que consiste en las enumeradas en la tabla 4B en el presente documento. En determinados modos de realización, se amplifica toda la longitud de una especie de secuencia de nucleótidos proporcionada en la tabla 4B, y en algunos modos de realización, se amplifica un ácido nucleico que es más corto o más largo que una especie de secuencia de nucleótidos proporcionada en la tabla 4B. En determinados modos de realización, se detecta toda la longitud de una especie de secuencia de nucleótidos proporcionada en la tabla 4B, y en algunos modos de realización, se detecta un ácido nucleico que es más corto o más largo que una especie de secuencia de nucleótidos proporcionada en la tabla 4B.

En algunos modos de realización, uno o más moldes competidores sintéticos que contienen un emparejamiento erróneo se introducen a una concentración conocida, de este modo el competidor puede facilitar la determinación de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto. El molde competidor sintético debe amplificar a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en un conjunto.

Uno o más de los conjuntos comprenden dos secuencias de nucleótidos en algunos modos de realización, y a veces uno o más conjuntos comprenden tres secuencias de nucleótidos. En algunos modos de realización, en aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de los conjuntos, dos secuencias de nucleótidos están en un conjunto, y a veces en aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de los conjuntos, tres secuencias de nucleótidos están en un conjunto. En un conjunto, las especies de secuencias de nucleótidos a veces están en el cromosoma 21 y cromosoma 18, o están en el cromosoma 21 y cromosoma 13, o están en el cromosoma 13 y cromosoma 18, o están en el cromosoma 21, y cromosoma 18 y cromosoma 13, y en aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de los conjuntos, las especies de nucleótidos están en dichos cromosomas designados. En determinados modos de realización, cada secuencia de nucleótidos en todos los conjuntos está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13.

En algunos modos de realización, las especies de amplificación de los conjuntos se generan en un recipiente de reacción. Las especies de ácidos nucleicos amplificados en un conjunto a veces se preparan por un procedimiento que comprende poner en contacto el ácido nucleico extracelular con un cebador inverso y un cebador directo, y en algunos modos de realización, las secuencias de nucleótidos en un conjunto se amplifican usando dos o más pares de cebadores. En determinados modos de realización, las cantidades de las especies de ácidos nucleicos amplificados en cada conjunto varían aproximadamente en un 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o menos, y en algunos modos de realización, las cantidades de las especies de ácidos nucleicos amplificados en cada conjunto varían hasta un valor que permite la detección de la anomalía cromosómica con un nivel de confianza de aproximadamente un 95 % o más. La longitud de cada una de las especies de ácidos nucleicos amplificados independientemente es de aproximadamente 30 a aproximadamente 500 pares de bases (por ejemplo, aproximadamente 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 pares de bases de longitud) en algunos modos de realización.

La cantidad de especies de ácidos nucleicos amplificados quiere decir el número de copias absoluto de una especie de ácido nucleico o las cantidades relativas de especies de ácidos nucleicos comparadas entre sí o con algún estándar. La cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado, en determinados modos de realización, se determina por cualquier procedimiento de detección conocido, incluyendo, sin limitación, extensión de cebador, secuenciación, reacción en cadena de la polimerasa digital (dPCR), PCR cuantitativa (Q-PCR) y espectrometría de masas. En algunos modos de realización, las especies de ácidos nucleicos amplificados se detectan: (i) poniendo en contacto la especie de ácido nucleico amplificado con cebadores de extensión, (ii) preparando cebadores de extensión extendidos, y (iii) determinando la cantidad relativa del uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo analizando los cebadores de extensión extendidos. El uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo se analizan por espectrometría de masas, en algunos modos de realización.

Para los procedimientos múltiples descritos en el presente documento, hay de aproximadamente 4 a aproximadamente 100 conjuntos de secuencias de nucleótidos, o ácidos nucleicos de amplificación, en determinados modos de realización (por ejemplo, aproximadamente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 conjuntos). En algunos modos de realización, una pluralidad de conjuntos específicos está en un grupo, y un procedimiento de determinación de aneuploidia comprende evaluar el mismo grupo múltiples veces (por ejemplo, dos o más veces; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces). Por ejemplo, un grupo puede incluir los conjuntos A, B y C, y este mismo grupo de conjuntos se puede evaluar múltiples veces (por ejemplo, tres veces).

En determinados modos de realización, un procedimiento de determinación de aneuploidia comprende evaluar diferentes grupos, en los que cada grupo tiene diferentes conjuntos de secuencias de nucleótidos. En algunos modos de realización, uno o más conjuntos se pueden superponer, o no superponer, entre uno o más grupos. Por ejemplo, se puede evaluar un grupo que incluye los conjuntos A, B y C y un segundo grupo que incluye los conjuntos D, E y F, en el que cada grupo se evalúa una vez o múltiples veces, para una determinación de aneuploidia.

En determinados modos de realización, una especie de secuencia de nucleótidos designada por un asterisco en la tabla 4 en el presente documento, y/o un ácido nucleico de cebador de amplificación asociado o ácido nucleico de extensión, no se incluye en un procedimiento o composición descrita en el presente documento. En algunos modos de realización, las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto de ácidos nucleicos no son del cromosoma

13 o cromosoma 18.

En algunos modos de realización, la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se basa en las cantidades de la especie de ácido nucleico en un 80 % o más de los conjuntos. El número de conjuntos proporciona una sensibilidad de un 70 % a un 99,99 %, y a veces de un 85 % a un 99,99 %, para determinar la ausencia de la anomalía cromosómica en algunos modos de realización (por ejemplo, una sensibilidad de aproximadamente un 82, 84, 86, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 99,5 %), y en determinados modos de realización, el número de conjuntos proporciona una especificidad de un 70 % a un 99,99 %, y a veces de un 85 a un 99,99 %, para determinar la presencia de la anomalía cromosómica (por ejemplo, una especificidad de aproximadamente un 82, 84, 86, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 99,5 %). En determinados modos de realización, el número de conjuntos se determina en base a (i) una sensibilidad de un 80 % a un 99,99 % para determinar la ausencia de la anomalía cromosómica, y (ii) una especificidad de un 80 % a un 99,99 % para determinar la presencia de la anomalía cromosómica. En embarazos de mayor riesgo (por ejemplo, los evaluados como tales por un profesional sanitario o los de mujeres de más de 35 o 40 años de edad), se puede asumir que habrá una mayor frecuencia de la presencia de una anomalía cromosómica, y seleccionar (i) número de conjuntos, y/o (ii) tipos de secuencias de nucleótidos que proporcionen una (un) especificidad relativamente menor y (b) sensibilidad relativamente mayor, en algunos modos de realización. En determinados modos de realización, un procedimiento en el presente documento comprende determinar una proporción entre la cantidad relativa de (i) una especie de ácido nucleico amplificado y (ii) otra especie de ácido nucleico amplificado, en cada conjunto; y la determinación de la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se identifica por la proporción. En algunos modos de realización, la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se basa en nueve o menos replicados (por ejemplo, aproximadamente 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 replicados) o en ningún replicado, sino sólo un único resultado a partir de una muestra. En un modo de realización relacionado, la reacción de amplificación se realiza en nueve o menos replicados (por ejemplo, aproximadamente 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 replicados).

También se proporcionan en el presente documento kits para identificar la presencia o ausencia de anomalía cromosómica. En determinados modos de realización, los kits comprenden uno o más de (i) uno o más cebadores de amplificación para amplificar una especie de secuencia de nucleótidos de un conjunto, (ii) uno o más cebadores de extensión para discriminar entre especies de ácidos nucleicos amplificados o especies de secuencias de nucleótidos de cada conjunto, (iii) un soporte sólido para la detección múltiple de especies de ácidos nucleicos amplificados o especies de secuencias de nucleótidos de cada conjunto (por ejemplo, un soporte sólido que incluye una matriz para espectrometría de masas de desorción ionización láser asistida por matriz (MALDI)); (iv) reactivos para detectar especies de ácidos nucleicos amplificados o especies de secuencias de nucleótidos de cada conjunto; (v) un detector para detectar las especies de ácidos nucleicos amplificados o especies de secuencias de nucleótidos de cada conjunto (por ejemplo, espectrómetro de masas); (vi) reactivos y/o equipo para cuantificar el ácido nucleico fetal en ácido nucleico extracelular de una mujer embarazada; (viii) reactivos y/o equipo para enriquecer el ácido nucleico fetal a partir de ácido nucleico extracelular de una mujer embarazada; (ix) programa informático y/o una máquina para analizar señales que resultan de un procedimiento para detectar especies de ácidos nucleicos amplificados o especies de secuencias de nucleótidos de los conjuntos; (x) información para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica (por ejemplo, tablas que convierten información de señales o proporciones en resultados), (xi) recipiente y/o reactivos para obtener ácido nucleico extracelular (por ejemplo, equipo para la extracción de sangre; equipo para generar sangre libre de células; reactivos para aislar el ácido nucleico (por ejemplo, ADN) del plasma o suero; reactivos para estabilizar el suero o plasma o ácido nucleico para su envío y/o procesamiento).

Determinados modos de realización se describen adicionalmente en la siguiente descripción, reivindicaciones y dibujos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 proporciona una visión general del uso de parálogos para detectar desequilibrios cromosómicos a partir de una muestra que comprende una mezcla heterogénea de ácido nucleico extracelular.

La figura 2 muestra que más conjuntos de marcadores (por ejemplo, ensayos multiplexados) incrementan la discernibilidad entre euploides y aneuploides.

La figura 3 muestra simulaciones en las que se representan gráficamente la concentración fetal (10 % frente a un 20 %) frente a la disminución en el coeficiente de variación (CV) frente a la sensibilidad y especificidad.

La figura 4 muestra diferentes niveles de varianza para diferentes etapas de detección y cuantificación por MassARRAY de Sequenom, que incluye amplificación (PCR), desfosforilación usando fosfatasa alcalina de gamba (SAP), extensión de cebadores (EXT) e identificación y cuantificación de cada emparejamiento erróneo de nucleótidos por espectrometría de masas MALDI-TOF (MAL).

La figura 5 muestra un ejemplo de un ensayo de trabajo del sistema de modelo de conjunto de ADN 1: sin sesgo étnico ($p > 0,05$); gran diferencia significativa ($p < 0,001$) entre N y T21; CV bajos.

La figura 6 muestra un ejemplo de dos ensayos malos del sistema de modelo de conjunto de ADN 1: sesgo étnico (p

< 0,001) y varianza grande.

La figura 7 muestra un ejemplo de un ensayo de trabajo y un ensayo malo basado en el conjunto de ADN 2. Para el ensayo de trabajo, los resultados observados (cruces más oscuras y la línea de color claro correspondiente) muestran una respuesta lineal que coincide con los resultados esperados (cruces más claras y la línea de color oscuro correspondiente); mientras que, el ensayo malo no muestra una respuesta lineal y no coincide con los resultados esperados.

La figura 8 muestra un ejemplo de un ensayo de trabajo y un ensayo malo basado en el conjunto de ADN 3.

La figura 9 muestra los resultados del experimento I, línea IV. El gráfico se basa en un análisis de componentes de principio simple, y muestra que los dos componentes principales pueden separar muestras euploides de muestras aneuploides. Las muestras euploides se designan por diamantes y las muestras aneuploides se designan por círculos en la figura 9.

Descripción detallada

En el presente documento se proporcionan procedimientos y kits mejorados para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica. Dichos procedimientos y kits imparten las ventajas de (i) disminuir el riesgo de complicaciones en el embarazo ya que son no invasivos; (ii) proporcionar resultados rápidos; y (iii) proporcionar resultados con un alto grado de uno o más de confianza, especificidad y sensibilidad, por ejemplo. Los procedimientos y kits descritos en el presente documento se pueden aplicar para identificar la presencia o ausencia de una variedad de anomalías cromosómicas, tales como trisomía 21, trisomía 18 y/o trisomía 13, y estados aneuploides asociados con cánceres particulares, por ejemplo. Además, dichos procedimientos y kits son útiles para aplicaciones incluyendo, pero sin limitarse a, cribado y diagnóstico prenatal no invasivo, detección de cáncer, detección de la variación en el número de copias, y como herramientas de control de calidad para procedimientos de biología molecular con relación a la replicación celular (por ejemplo, células madre).

Anomalías cromosómicas

Las anomalías cromosómicas incluyen, sin limitación, una ganancia o pérdida de un cromosoma entero o una región de un cromosoma que comprende uno o más genes. Las anomalías cromosómicas incluyen monosomías, trisomías, polisomías, pérdida de heterocigosis, deleciones y/o duplicaciones de una o más secuencias de nucleótidos (por ejemplo, uno o más genes), incluyendo deleciones y duplicaciones provocadas por translocaciones desequilibradas. Los términos "aneuploidia" y "aneuploide" como se usa en el presente documento se refiere a un número anómalo de cromosomas en las células de un organismo. Puesto que los organismos diferentes tienen complementos cromosómicos ampliamente variables, el término "aneuploidia" no se refiere a un número particular de cromosomas, sino más bien a la situación en la que el contenido de cromosomas dentro de una célula o células dadas de un organismo es anómalo.

El término "monosomía" como se usa en el presente documento se refiere a la falta de un cromosoma del complemento normal. La monosomía parcial se puede producir en translocaciones desequilibradas o deleciones, en las que sólo una porción del cromosoma está presente en una única copia (véase deleción (genética)). La monosomía de los cromosomas sexuales (45, X) provoca el síndrome de Turner.

El término "disomía" se refiere a la presencia de dos copias de un cromosoma. Para organismos tales como los seres humanos que tienen dos copias de cada cromosoma (los que son diploide o "euploide"), es la condición normal. Para organismos que normalmente tienen tres o más copias de cada cromosoma (los que son triploide o lo anterior), la disomía es un complemento cromosómico aneuploide. En la disomía uniparental, ambas copias de un cromosoma provienen del mismo progenitor (sin contribución del otro progenitor).

El término "trisomía" se refiere a la presencia de tres copias, en lugar de las dos normales, de un cromosoma particular. La presencia de un cromosoma adicional 21, que se encuentra en el síndrome de Down, se denomina trisomía 21. La trisomía 18 y trisomía 13 son las otras dos trisomías autosómicas reconocidas en humanos recién nacidos vivos. La trisomía de cromosomas sexuales se puede observar en mujeres (47, XXX) o en hombres (47, XXY que se encuentra en el síndrome de Klinefelter; o 47, XYY).

Los términos "tetrasomía" y "pentasomía" como se usa en el presente documento, se refieren a la presencia de cuatro o cinco copias de un cromosoma, respectivamente. Aunque rara vez se observa con autosomas, se ha informado de tetrasomía y pentasomía de cromosomas sexuales en seres humanos, incluyendo XXXX, XXXY, XYYY, XYYY, XXXXX, XXXXY, XXXYY, XXXYY y XYYYY.

Las anomalías cromosómicas pueden estar provocadas por una variedad de mecanismos. Los mecanismos incluyen, pero no se limitan a (i) no disyunción que se produce como resultado de un punto de control mitótico debilitado, (ii) puntos de control mitóticos inactivos que provocan la no disyunción en múltiples cromosomas, (iii) unión merotética que se produce cuando un cinetocoro se une a ambos polos del huso mitótico, (iv) un huso multipolar que se forma cuando se forman más de dos polos del huso, (v) un huso monopolar que se forma cuando sólo se forma un único polo del huso, y (vi) un intermedio tetraploide que se produce como resultado final del

mecanismo del huso monopolar.

Los términos "monosomía parcial" y "trisomía parcial" como se usan en el presente documento, se refieren a un desequilibrio de material genético provocado por la pérdida o ganancia de parte de un cromosoma. Una monosomía parcial o trisomía parcial puede resultar de una translocación desequilibrada, en la que un individuo lleva un cromosoma derivado formado a través de la rotura y fusión de dos cromosomas diferentes. En esta situación, el individuo podría tener tres copias de parte de un cromosoma (dos copias normales y la parte que existe en el cromosoma derivado) y sólo una copia de parte del otro cromosoma implicada en el cromosoma derivado.

El término "mosaicismo" como se usa en el presente documento se refiere a aneuploidia en algunas células, pero no en todas las células, de un organismo. Determinadas anomalías cromosómicas pueden existir como anomalías cromosómicas en mosaico y no mosaico. Por ejemplo, determinados individuos con trisomía 21 tienen síndrome de Down mosaico y algunos tienen síndrome de Down no mosaico. Diferentes mecanismos pueden dar lugar al mosaicismo. Por ejemplo, (i) un cigoto inicial puede tener tres cromosomas 21, lo que normalmente daría como resultado una trisomía simple 21, pero durante el ciclo de división celular, una o más líneas celulares pierden uno de los cromosomas 21; y (ii) un cigoto inicial puede tener dos cromosomas 21, pero durante el ciclo de división celular, se duplicó uno de los cromosomas 21. El mosaicismo somático se produce muy probablemente a través de mecanismos distintos de los asociados típicamente con los síndromes genéticos que implican aneuploidia completa o en mosaico. Se ha identificado el mosaicismo somático en determinados tipos de cánceres y en neuronas, por ejemplo: En determinados casos, se ha identificado trisomía 12 en leucemia linfocítica crónica (LLC) y se ha identificado trisomía 8 en leucemia mieloide aguda (LMA). Además, los síndromes genéticos en los que un individuo está predispuesto a la rotura de cromosomas (síndromes de inestabilidad cromosómica) están asociados con frecuencia con un incremento en el riesgo de varios tipos de cáncer, destacando así el papel de la aneuploidia somática en la carcinogénesis. Los procedimientos y kits descritos en el presente documento pueden identificar la presencia o ausencia de anomalías cromosómicas no mosaico y mosaico.

Lo siguiente es una lista no limitante de anomalías cromosómicas que se pueden identificar potencialmente por los procedimientos y kits descritos en el presente documento.

Cromosoma	Anomalia	Asociación de enfermedad
X	XO	Síndrome de Turner
Y	XXY	Síndrome de Klinefelter
Y	XYY	Síndrome del doble Y
Y	XXX	Síndrome de trisomía X
Y	XXXX	Síndrome de X cuádruple
Y	Deleción de Xp21	Síndrome de Duchenne/Becker, hipoplasia suprarrenal congénita, enfermedad granulomatosa crónica
Y	Deleción de Xp22	insuficiencia de esteroide-sulfatasa
Y	Deleción de Xq26	enfermedad linfoproliferativa ligada al cromosoma X
1	monosomía trisomía 1p (somática)	neuroblastoma
2	monosomía trisomía 2q	retraso del crecimiento, trastornos del desarrollo y retraso mental, y anomalías físicas menores
3	monosomía trisomía (somática)	linfoma no hodgkiniano
4	monosomía trisomía (somática)	leucemia no linfocítica aguda (LNLA)
5	5p	Síndrome del maullido; síndrome de Lejeune
5	5q monosomía trisomía (somática)	síndrome mielodisplásico
6	monosomía trisomía (somática)	sarcoma de células claras
7	deleción de 7q11.23	síndrome de William
7	monosomía trisomía	monosomía 7 síndrome de la infancia; somática: adenomas corticales renales; síndrome mielodisplásico
8	deleción de 8q24.1	síndrome de Langer-Giedon
8	monosomía trisomía	síndrome mielodisplásico; síndrome de Warkany; somática: leucemia mieloide crónica
9	monosomía 9p	síndrome de Alfi

(continuación)

Cromosoma	Anomalía	Asociación de enfermedad
9	monosomía 9p trisomía parcial	síndrome de Rethore
9	trisomía	síndrome de trisomía 9 completa; síndrome de trisomía 9 mosaico
10	monosomía trisomía (somática)	LLA o LNLA
11	11p-	Aniridia; tumor de Wilms
11	11q-	Síndrome de Jacobson
11	monosomía trisomía (somática)	linajes mielógenos afectados (LNLA, SMD)
12	monosomía trisomía (somática)	LLC, tumor de células granulosas juvenil (TCGJ)
13	13q-	síndrome de 13q; síndrome de Orbeli
13	deleción de 13q14	retinoblastoma
13	monosomía trisomía	síndrome de Patau
14	monosomía trisomía (somática)	trastornos mielógenos (SMD, LNLA, LMC atípica)
15	deleción de 15q11-q13	síndrome de Prader-Willi, síndrome de Angelman
15	monosomía trisomía (somática)	linajes mielógenos y linfáticos afectados, por ejemplo, SMD, LNLA, LLA, LLC)
16	deleción de 16q13.3 monosomía trisomía (somática)	carcinomas de células renales papilares de Rubenstein-Taybi (malignos)
17	17p-(somática)	síndrome de 17p en neoplasias malignas mielógenas
17	deleción de 17q 11.2	Smith-Magenis
17	17q13.3	Miller-Dieker
17	monosomía trisomía (somática)	adenomas corticales renales
17	17p11.2-12 trisomía	síndrome de Charcot-Marie-Tooth tipo 1; NHPP
18	18p-	síndrome de monosomía parcial 18p o síndrome de Grouchy-Lamy-Thieffry
18	18q-	síndrome de Grouchy-Lamy-Salmon
18	monosomía trisomía	síndrome de Edwards
19	monosomía trisomía	
20	20p-	síndrome de trisomía 20p
20	deleción de 20p11.2-12	Alagille
20	20q-	somática: SMD, LNLA, policitemia vera, leucemia neutrófila crónica
20	monosomía trisomía (somática)	carcinomas de células renales papilares (malignos)
21	monosomía trisomía	síndrome de Down
22	deleción de 22q11.2	Síndrome de DiGeorge, síndrome de velocardiofacial, síndrome de anomalía conotroncal-facial, síndrome de Opitz G/BBB autosómico dominante, síndrome cardiofacial de Cailor
22	monosomía trisomía	síndrome de trisomía 22 completa

En determinados modos de realización, se identifica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica fetal (por ejemplo, trisomía 21, trisomía 18 y/o trisomía 13). En algunos modos de realización, se identifica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica relacionada con una afección de proliferación celular o cáncer. En algunos modos de realización se puede identificar la presencia o ausencia de una o más de las anomalías cromosómicas descritas en la tabla anterior.

Ácido nucleico molde

El ácido nucleico molde utilizado en los procedimientos y kits descritos en el presente documento a menudo se obtiene y se aísla de un sujeto. Un sujeto puede ser cualquier fuente viva o no viva, incluyendo pero sin limitarse a un ser humano, un animal, una planta, una bacteria, un hongo, un protista. Se puede seleccionar cualquier ser humano o animal, incluyendo pero sin limitarse a, no humano, mamífero, reptil, ganado bovino, gato, perro, cabra, porcino, cerdo, mono, simio, gorila, toro, vaca, oso, caballo, oveja, ave de corral, ratón, rata, peces, delfín, ballena y tiburón, o cualquier animal u organismo que puede tener una anomalía cromosómica detectable.

El ácido nucleico molde se puede aislar a partir de cualquier tipo de líquido o tejido de un sujeto, incluyendo, sin limitación, sangre del cordón umbilical, vellosidades coriónicas, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, líquido de

lavado (por ejemplo, broncoalveolar, gástrico, peritoneal, ductal, ótico, atroscópico), muestra de biopsia (por ejemplo, de embrión preimplantatorio), muestra de celocentesis, células nucleadas fetales o restos celulares fetales, lavados del aparato reproductor femenino, orina, heces, expectoración, saliva, mucosa nasal, líquido prostático, lavado, semen, fluido linfático, bilis, lágrimas, sudor, leche materna, líquido mamario, células embrionarias y células fetales.

En algunos modos de realización, una muestra biológica puede ser sangre, y en ocasiones plasma. Como se usa en el presente documento, el término "sangre" engloba sangre completa o cualquier fracción de sangre, tal como suero y plasma como se define de forma convencional. Plasma sanguíneo se refiere a la fracción de sangre completa resultante de la centrifugación de la sangre tratada con anticoagulantes. Suero sanguíneo se refiere a la parte acuosa de líquido restante después de que se haya coagulado una muestra de sangre. A menudo las muestras de líquido o tejido se recogen de acuerdo con los protocolos estándar que siguen, en general, hospitales o clínicas. Para la sangre, a menudo se extrae una cantidad apropiada de sangre periférica (por ejemplo, entre 3-40 mililitros) y se puede almacenar de acuerdo con procedimientos estándar antes de la preparación adicional en dichos modos de realización. Una muestra de líquido o tejido a partir de la que se extrae el ácido nucleico molde puede ser acelular. En algunos modos de realización, una muestra de líquido o tejido puede contener elementos celulares o restos celulares. En algunos modos de realización, las células fetales o células cancerosas pueden comprender la muestra.

La muestra puede ser heterogénea, por esto se quiere decir que en la muestra está presente más de un tipo de especies de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ácido nucleico heterogéneo puede incluir, pero no se limita a, (i) ácido nucleico fetalmente derivado y maternalmente derivado, (ii) ácido nucleico canceroso y no canceroso, y (iii) más en general, ácido nucleico mutado y natural. Una muestra puede ser heterogénea debido a porque está presente más de un tipo de célula, tal como una célula fetal y una célula materna o una célula cancerosa y no cancerosa.

Para aplicaciones prenatales de la tecnología descrita en el presente documento, se puede recoger una muestra de líquido o tejido de una mujer en una edad gestacional adecuada para pruebas, o de una mujer que se va a someter a prueba por un posible embarazo. La edad gestacional adecuada puede variar dependiendo de la anomalía cromosómica sometida a prueba. En determinados modos de realización, una paciente embarazada está a veces en el primer trimestre del embarazo, a veces en el segundo trimestre del embarazo, o a veces en el tercer trimestre del embarazo. En determinados modos de realización, se recoge un líquido o tejido de una mujer embarazada en las 1-4, 4-8, 8-12, 12-16, 16-20, 20-24, 24-28, 28-32, 32-36, 36-40, o 40-44 semanas de gestación fetal, y a veces entre 5-28 semanas de gestación fetal.

El ácido nucleico molde puede ácido nucleico extracelular en determinados modos de realización. El término "ácido nucleico molde extracelular" como se usa en el presente documento se refiere a ácido nucleico aislado de una fuente que no tiene sustancialmente células (por ejemplo, sin células detectables; puede contener elementos celulares o restos celulares). Los ejemplos de fuentes acelulares para ácido nucleico extracelular son plasma sanguíneo, suero sanguíneo y orina. Sin quedar limitados por la teoría, el ácido nucleico extracelular puede ser un producto de apoptosis celular y ruptura celular, lo que proporciona la base para un ácido nucleico extracelular que tenga a menudo una serie de longitudes a través de un gran espectro (por ejemplo, una "escalera").

El ácido nucleico molde extracelular puede incluir diferentes especies de ácidos nucleicos, y por lo tanto se denomina en el presente documento "heterogéneo" en determinados modos de realización. Por ejemplo, el suero o plasma sanguíneo de una persona que tiene cáncer puede incluir ácido nucleico de células cancerosas y ácido nucleico de células no cancerosas. En otro ejemplo, el suero o plasma sanguíneo de una mujer embarazada puede incluir ácido nucleico materno y ácido nucleico fetal. En algunos casos, el ácido nucleico fetal a veces es de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 40 % de todo el ácido nucleico molde, (por ejemplo, aproximadamente un 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 o 39 % del ácido nucleico molde es ácido nucleico fetal). En algunos modos de realización, la mayoría del ácido nucleico fetal en el ácido nucleico molde es de una longitud de aproximadamente 500 pares de bases o menos (por ejemplo, aproximadamente un 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % del ácido nucleico fetal es de una longitud de aproximadamente 500 pares de bases o menos).

Los términos "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se pueden usar de forma intercambiable en toda la divulgación. Los términos se refieren a ácidos nucleicos de cualquier composición de, tal como ácido desoxirribonucleico (ADN, por ejemplo, ADN complementario (ADNc), ADN genómico (ADNg) y similares), ácido ribonucleico (ARN, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), ARN inhibidor corto (ARNip), ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), microARN, ARN altamente expresado por el feto o placenta, y similares), y/o análogos de ADN o ARN (por ejemplo, que contienen análogos de bases, análogos de azúcares y/o una cadena principal no natural y similares), híbridos de ARN/ADN y ácidos nucleicos de poliamida (PNA), de los que su totalidad puede estar en forma mono o bicatenaria, y a menos que se limite de otro modo, puede incluir análogos conocidos de nucleótidos naturales que puedan funcionar de manera similar a los nucleótidos naturales. Un ácido nucleico puede estar en cualquier forma útil para llevar a cabo procedimientos en el presente documento (por ejemplo, lineal, circular, superhelicoidal, monocatenaria, bicatenaria y similares). Un ácido nucleico puede ser, o puede ser de, un plásmido, fago, se de replicación autónoma (SRA), centrómero, cromosoma artificial, cromosoma, u otro ácido nucleico que se puede replicar o que se replique *in vitro* o en una célula huésped, una célula, un núcleo celular o citoplasma de una célula en determinados modos de realización. Un ácido nucleico molde, en algunos modos de realización puede ser de un único cromosoma (por ejemplo, una muestra de ácido nucleico puede ser de un cromosoma de una muestra obtenida de un organismo diploide). El término también puede incluir, como

equivalentes, derivados, variantes y análogos de ARN o ADN sintetizado a partir de análogos de nucleótidos, polinucleótidos monocatenarios ("sentido" o "antisentido", hebra "positiva" o hebra "negativa", marco de lectura "directo" o marco de lectura "inverso") y bicatenarios. Los desoxirribonucleótidos incluyen desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina y desoxitimidina. Para el ARN, la base citosina se reemplaza por uracilo. Un ácido nucleico molde se puede preparar usando un ácido nucleico obtenido a partir de un sujeto como molde.

El ácido nucleico molde se puede derivar de una o más fuentes (por ejemplo, células, suelo, etc.) por procedimientos conocidos para el experto en la técnica. Los procedimientos y reactivos de lisis celular son comúnmente conocidos en la técnica y en general se pueden realizar por procedimientos de lisis químicos, físicos o electrolíticos. Por ejemplo, los procedimientos químicos emplean en general agentes de lisado para romper las células y extraer los ácidos nucleicos de las células, seguido del tratamiento con sales caotrópicas. Los procedimientos físicos tales como congelación/descongelación seguidos de molienda, el uso de prensas celulares y similares también son útiles. Los procedimientos de lisis con alto contenido en sal también se usan comúnmente. Por ejemplo, se puede utilizar un procedimiento de lisis alcalina. Este último procedimiento incorpora tradicionalmente el uso de soluciones de fenol-cloroformo, y se puede utilizar un procedimiento sin fenol-cloroformo alternativo que implica tres soluciones. En los últimos procedimientos, la solución 1 puede contener Tris 15 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM y 100 ug/ml de RNasa A; la solución 2 puede contener NaOH 0,2 N y SDS al 1 %; y la solución 3 puede contener KOAc 3 M, pH 5,5. Estos procedimientos se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6 (1989).

También se puede aislar ácido nucleico molde en un punto temporal diferente en comparación con otro ácido nucleico molde, en el que cada una de las muestras son de la misma fuente o de fuentes diferentes. Un ácido nucleico molde puede ser de una colección de ácidos nucleicos, tal como una colección de ADNc o ARN, por ejemplo. Un ácido nucleico molde puede ser resultado de la purificación o aislamiento de ácido nucleico y/o amplificación de moléculas de ácido nucleico a partir de la muestra. El ácido nucleico molde proporcionado para los procedimientos descritos en el presente documento puede contener ácido nucleico de una muestra o de dos o más muestras (por ejemplo, de 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 o más muestras).

El ácido nucleico molde se puede proporcionar para llevar a cabo los procedimientos descritos en el presente documento sin el procesamiento de la(s) muestra(s) que contiene(n) el ácido nucleico en determinados modos de realización. En algunos modos de realización, el ácido nucleico molde se proporciona para llevar a cabo los procedimientos descritos en el presente documento después del procesamiento de la(s) muestra(s) que contiene(n) el ácido nucleico. Por ejemplo, un ácido nucleico molde se puede extraer, aislar, purificar o amplificar a partir de la(s) muestra(s). El término "aislado" como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico extraído de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si es natural, o una célula huésped si se expresa de forma exógena), y por tanto está alterado por intervención humana (por ejemplo, "por la mano del hombre") de su entorno original. Un ácido nucleico aislado, en general, está provisto de menos componentes distintos del ácido nucleico (por ejemplo, proteína, lípido) que la cantidad de componentes presente en una muestra de fuente. Una composición que comprende ácido nucleico molde aislado se puede aislar sustancialmente (por ejemplo, aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de un 99 % libre de componentes distintos del ácido nucleico). El término "purificado" como se usa en el presente documento se refiere a ácido nucleico molde siempre que contenga menos especies de ácidos nucleicos que en la fuente de muestra a partir de la que se deriva el ácido nucleico molde. Una composición que comprende ácido nucleico molde se puede purificar sustancialmente (por ejemplo, aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de un 99 % libre de otras especies de ácidos nucleicos). El término "amplificado" como se usa en el presente documento se refiere a someter a un ácido nucleico de una muestra a un procedimiento que genera de forma lineal o exponencial ácidos nucleicos amplicones que tienen la misma o sustancialmente la misma secuencia de nucleótidos que la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico en la muestra, o parte de la misma.

El ácido nucleico molde también se puede procesar sometiendo el ácido nucleico a un procedimiento que genera fragmentos de ácido nucleico, en determinados modos de realización, antes de proporcionar ácido nucleico molde para un procedimiento descrito en el presente documento. En algunos modos de realización, el ácido nucleico molde sometido a fragmentación o escisión puede tener una longitud nominal, promedio o media de aproximadamente 5 a aproximadamente 10.000 pares de bases, de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 pares de bases, de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 pares de bases, o aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 o 9000 pares de bases. Se pueden generar fragmentos por cualquier procedimiento conocido en la técnica, y la longitud promedio, media o nominal de los fragmentos de ácido nucleico se puede controlar seleccionando un procedimiento de generación de fragmentos apropiado por el experto en la técnica. En determinados modos de realización, se puede utilizar el ácido nucleico molde de una longitud relativamente más corta para analizar secuencias que contienen una variación de secuencia pequeña y/o que contienen cantidades relativamente grandes de información de la secuencia de nucleótidos conocida. En algunos modos de realización, se puede utilizar el ácido nucleico molde de una longitud relativamente más larga para analizar secuencias que contienen una variación de secuencia mayor y/o que contienen cantidades relativamente pequeñas de información de la secuencia de nucleótidos desconocida.

Los fragmentos de ácido nucleico molde pueden contener secuencias de nucleótidos superpuestas, y dichas secuencias superpuestas pueden facilitar la construcción de una secuencia de nucleótidos del ácido nucleico molde previamente no fragmentado, o una porción de la misma. Por ejemplo, un fragmento puede tener las subsecuencias x e y, y otro fragmento puede tener las subsecuencias y y z, en el que x, y y z son secuencias de nucleótidos que pueden ser de 5 nucleótidos de longitud o mayor. La secuencia superpuesta y se puede utilizar para facilitar la construcción de la secuencia de nucleótidos x-y-z en el ácido nucleico de una muestra en determinados modos de realización. El ácido nucleico molde se puede fragmentar parcialmente (por ejemplo, a partir de una reacción de escisión específica incompleta o terminada) o se puede fragmentar totalmente en determinados modos de realización.

El ácido nucleico molde se puede fragmentar por varios procedimientos conocidos por el experto en la técnica, que incluyen, sin limitación, procedimientos físicos, químicos y enzimáticos. Los ejemplos de dichos procedimientos se describen en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 20050112590 (publicada el 26 de mayo de 2005, titulada "Fragmentation-based methods and systems for sequence variation detection and discovery", a nombre de Van Den Boom *et al.*). Se pueden seleccionar determinados procedimientos por el experto en la técnica para generar fragmentos escindidos de forma inespecífica o fragmentos escindidos de forma específica. Los ejemplos de procedimientos que pueden generar ácido nucleico molde de fragmentos escindidos de forma inespecífica incluyen, sin limitación, poner en contacto el ácido nucleico molde con el aparato que expone el ácido nucleico a una fuerza de cizallamiento (por ejemplo, pasar el ácido nucleico a través de una aguja de jeringuilla; uso de un sistema French press); exponer el ácido nucleico molde a irradiación (por ejemplo, irradiación gamma, rayos x, UV; los tamaños de fragmento se pueden controlar por la intensidad de irradiación); hervir el ácido nucleico en agua (por ejemplo, proporciona fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases) y exponer el ácido nucleico a un procedimiento de hidrólisis ácida y básica.

El ácido nucleico molde se puede escindir específicamente poniendo en contacto el ácido nucleico con uno o más agentes de escisión específica. El término "agente de escisión específica" como se usa en el presente documento se refiere a un agente, a veces una sustancia química o una enzima que puede escindir un ácido nucleico en uno o más sitios específicos. A menudo los agentes de escisión específica se escinden específicamente de acuerdo con una secuencia de nucleótidos particular en un sitio particular.

Los ejemplos de agentes de escisión específica enzimática incluyen, sin limitación, endonucleasas (por ejemplo, DNasa (por ejemplo, DNasa I, II); RNasa (por ejemplo, RNasa E, F, H, P); enzima Cleavase™; ADN polimerasa Taq; ADN polimerasa I de *E. Coli* y endonucleasas de estructura específica eucariotas; endonucleasas FEN-1 murinas; endonucleasas de restricción tipo I, II o III tales como Acc I, Afl III, Alu I, Alw44 I, Apa I, Asn I, Ava I, Ava II, BamH I, Ban II, Bel I, Bgl I, Bgl II, Bln I, Bsm I, BssH II, BstE II, Cfo I, Cla I, Dde I, Dpn I, Dra I, EclX I, EcoR I, EcoR II, EcoR V, Hae II, Hae III, Hind II, Hind III, Hpa I, Hpa II, Kpn I, Ksp I, Mlu I, MluN I, Msp I, Nci I, Neo I, Nde I, Nde II, Nhe I, Not I, Nru I, Nsi I, Pst I, Pvu I, Pvu II, Rsa I, Sac I, Sal I, Sau3A I, Sca I, ScrF I, Sfi I, Sma I, Spe I, Sph I, Ssp I, Stu I, Sty I, Swa I, Taq I, Xba I, Xho I.); glucosilasas (por ejemplo, uracil-ADN glucosilasa (UDG), 3-metiladenina-ADN glucosilasa, 3-metiladenina-ADN glucosilasa II, pirimidina hidrato-ADN glucosilasa, FaPy-ADN glucosilasa, timina con emparejamiento erróneo-ADN glucosilasa, hipoxantina-ADN glucosilasa, 5-hidroximetiluracilo-ADN glucosilasa (HmUDG), 5-Hidroximetilcitosina-ADN glucosilasa, o 1,N6-eteno-adenina-ADN glucosilasa); exonucleasas (por ejemplo, exonucleasa III); ribozimas, y ADNzimas. Se puede tratar el ácido nucleico molde con un agente químico, y se puede escindir el ácido nucleico modificado. En los ejemplos no limitantes, se puede tratar el ácido nucleico molde con (i) agentes alquilantes tales como metilnitrosourea que generan varias bases alquiladas, incluyendo N3-metiladenina y N3-metilguanina, que se reconocen y se escinden por alquil-purina-ADN-glucosilasa; (ii) bisulfito de sodio, que provoca la desaminación de residuos de citosina en el ADN para formar residuos de uracilo que se pueden escindir por uracilo-N-glucosilasa; y (iii) un agente químico que convierte guanina en su forma oxidada, 8-hidroxiguanina, que se puede escindir por formamidopirimidina-ADN-N-glucosilasa. Los ejemplos de procedimientos de escisión química incluyen, sin limitación, alquilación, (por ejemplo, alquilación de ácido nucleico modificado con fosforotioato); escisión de labilidad ácida de ácido nucleico que contiene P3'-N5'-fosfoamidato; y tratamiento con tetróxido de osmio y piperidina del ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, "fragmentación" o "escisión" se refiere a un procedimiento o condiciones en las que una molécula de ácido nucleico, tal como una molécula génica de molde de ácido nucleico o producto amplificado de la misma, se puede separar en dos o más moléculas de ácido nucleico más pequeñas. Dicha fragmentación o escisión se puede específica de secuencia, específica de base, o inespecífica, y se puede llevar a cabo por cualquiera de una variedad de procedimientos, reactivos o condiciones, incluyendo, por ejemplo, fragmentación química, enzimática, física.

Como se usa en el presente documento, "fragmentos", "productos de escisión", "productos escindidos" o variantes gramaticales de los mismos, se refieren a moléculas de ácido nucleico resultantes de una fragmentación o escisión de una molécula génica de molde de ácido nucleico o producto amplificado de la misma. Aunque dichos fragmentos o productos escindidos se pueden referir a todas las moléculas de ácido nucleico resultantes de una reacción de escisión, típicamente dichos fragmentos o productos escindidos se refieren sólo a moléculas de ácido nucleico resultantes de una fragmentación o escisión de una molécula génica de molde de ácido nucleico o la parte de un producto amplificado de la misma que contiene la secuencia de nucleótidos correspondiente de una molécula génica de molde de ácido nucleico. Por ejemplo, está dentro del alcance de los presentes procedimientos, compuestos y

composiciones, que un producto amplificado pueda contener uno o más nucleótidos más que la región nucleotídica amplificada de la secuencia génica del molde de ácido nucleico (por ejemplo, un cebador puede contener nucleótidos "adicionales" tales como una secuencia de iniciación de la transcripción, además de nucleótidos complementarios a una molécula génica de molde de ácido nucleico, lo que da como resultado un producto amplificado que contiene nucleótidos "adicionales" o nucleótidos que no corresponden con la región nucleotídica amplificada de la molécula génica de molde de ácido nucleico). En un ejemplo de este tipo, los fragmentos o productos escindidos correspondientes a los nucleótidos que no surgen de la molécula de molde de ácido nucleico, típicamente no proporcionarán ninguna información relativa a la metilación en la molécula de molde de ácido nucleico. Un experto en la técnica puede entender, por tanto, que los fragmentos de un producto amplificado usado para proporcionar información sobre metilación en los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden ser fragmentos que contienen uno o más nucleótidos que surgen de la molécula de molde de ácido nucleico, y no fragmentos que contienen nucleótidos que surgen exclusivamente de una secuencia distinta a la de la molécula diana de ácido nucleico. En consecuencia, un experto en la técnica entenderá que los fragmentos que surgen de procedimientos, compuestos y composiciones proporcionados en el presente documento incluyen fragmentos que surgen de partes de las moléculas de ácido nucleico amplificado que contienen, al menos en parte, la información sobre la secuencia de nucleótidos de o basada en la molécula de molde de ácido nucleico representativa.

Como se usa en el presente documento, el término "reacciones de escisión complementarias" se refiere a reacciones de escisión que se llevan a cabo en el mismo ácido nucleico molde usando diferentes reactivos de escisión o alterando la especificidad de escisión del mismo reactivo de escisión de modo que se generan patrones de escisión alternos de la misma proteína o ácido nucleico diana o de referencia. En determinados modos de realización, el ácido nucleico molde se puede tratar con uno o más agentes de escisión específicos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más agentes de escisión específicos) en uno o más recipientes de reacción (por ejemplo, el ácido nucleico molde se trata con cada agente de escisión específico en un recipiente separado).

El ácido nucleico molde también se puede exponer a un procedimiento que modifica determinados nucleótidos en el ácido nucleico antes de proporcionar el ácido nucleico molde para un procedimiento descrito en el presente documento. Un procedimiento que modifica selectivamente el ácido nucleico basado en el estado de metilación de los nucleótidos en el mismo se puede aplicar al ácido nucleico molde, por ejemplo. El término "estado de metilación" como se usa en el presente documento se refiere a si está o no metilado un nucleótido particular en una secuencia polinucleotídica. Los procedimientos para modificar una molécula de ácido nucleico molde de manera que refleje el patrón de metilación de la molécula de ácido nucleico molde son conocidos en la técnica, como se ejemplifica en la patente de los EE. UU. N.º 5.786.146 y las publicaciones de patente de los EE. UU. 20030180779 y 20030082600. Por ejemplo, los nucleótidos citosina no metilada en un ácido nucleico se pueden convertir en uracilo por tratamiento con bisulfito, que no modifica la citosina metilada. Los ejemplos no limitantes de agentes que pueden modificar una secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico incluyen metanosulfonato de metilo, metanosulfonato de etilo; sulfato de dietilo, nitrosoguanidina (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina), ácido nitroso, sulfuro de di-(2-cloroetil), di-(2-cloroetil)metilamina, 2-aminopurina, t-bromouracilo, hidroxilamina, bisulfito de sodio, hidracina, ácido fórmico, nitrito de sodio y 5-metilcitosina-ADN glucosilasa. Además, condiciones tales como temperatura alta, radiación ultravioleta, radiación X, pueden inducen cambios en la secuencia de una molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico molde se puede proporcionar en cualquier forma útil para llevar a cabo un análisis de secuencia o procedimiento de fabricación descrito en el presente documento, tal como forma sólida o líquida, por ejemplo. En determinados modos de realización, el ácido nucleico molde se puede proporcionar en una forma líquida que comprende opcionalmente uno o más de otros componentes, incluyendo, sin limitación, uno o más tampones o sales seleccionados por el experto en la técnica.

Determinación del contenido en ácido nucleico fetal y enriquecimiento de ácido nucleico fetal

En algunos modos de realización se determina la cantidad de ácido nucleico fetal (por ejemplo, concentración) en el ácido nucleico molde. En determinados modos de realización, se determina la cantidad de ácido nucleico fetal de acuerdo con marcadores específicos para un feto varón (por ejemplo, marcadores de STR del cromosoma Y (por ejemplo, marcadores DYS 19, DYS 385, DYS 392); marcador RhD en mujeres sin RhD), o de acuerdo con uno o más marcadores específicos para ácido nucleico fetal y no para ácido nucleico materno (por ejemplo, metilación diferencial entre madre y feto, o marcadores de ARN fetal en plasma sanguíneo materno; Lo, 2005, Journal of Histochemistry and Cytochemistry 53 (3): 293-296). Las composiciones y procedimientos cuantificadores de ácidos nucleicos fetales basados en metilación se describen en la solicitud de los EE. UU. N.º 12/561.241, presentada el 16 de septiembre de 2009. La cantidad de ácido nucleico fetal en el ácido nucleico molde extracelular se puede cuantificar y usar junto con los procedimientos de detección de aneuploidia proporcionados en el presente documento. Por tanto, en determinados modos de realización, los procedimientos de la tecnología comprenden la etapa adicional de determinar la cantidad de ácido nucleico fetal. La cantidad de ácido nucleico fetal se puede determinar en una muestra de ácido nucleico de un sujeto antes o después del procesamiento para preparar un ácido nucleico molde de muestra. En determinados modos de realización, la cantidad de ácido nucleico fetal se determina en una muestra después de que se procese y se prepare el ácido nucleico molde de muestra, cantidad que se utiliza para una evaluación adicional. La etapa de determinación se puede realizar antes, durante o después de los procedimientos de detección de aneuploidia descritos en el presente documento. Por ejemplo, para lograr un procedimiento de detección de aneuploidia con una sensibilidad o especificidad dada, se puede implementar un procedimiento de cuantificación de ácido nucleico fetal antes de, durante o después de la detección de la aneuploidia

para identificar las muestras con ácido nucleico fetal mayor de aproximadamente un 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, el 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 % o más. En algunos modos de realización, las muestras que se determina que tienen una determinada cantidad umbral de ácido nucleico fetal (por ejemplo, ácido nucleico fetal de aproximadamente un 15 % o más) se analizan adicionalmente para determinar la presencia o ausencia de aneuploidia. En determinados modos de realización, las determinaciones de la presencia o ausencia de aneuploidia se seleccionan (por ejemplo, se seleccionan y se comunican a un paciente) sólo para las muestras que tienen una determinada cantidad umbral de ácido nucleico fetal (por ejemplo, ácido nucleico fetal de aproximadamente un 15 % o más).

En algunos modos de realización, el ácido nucleico extracelular está enriquecido o relativamente enriquecido en ácido nucleico fetal. Los procedimientos para enriquecer una muestra en una especie particular de ácido nucleico se describen en la patente de los EE. UU. número 6.927.028, presentada el 31 de agosto de 2001, solicitud de patente PCT número PCT/US07/69991, presentada el 30 de mayo de 2007, solicitud de patente PCT número PCT/US2007/071232, presentada el 15 de junio de 2007, solicitudes provisionales de los EE. UU. número 60/968.876 y 60/968.878, y solicitud de patente PCT número PCT/EP05/012707, presentada el 28 de noviembre de 2005. En determinados modos de realización, el ácido nucleico materno se retira selectivamente (parcialmente, sustancialmente, casi completamente o completamente) de la muestra. En determinados modos de realización, el ácido nucleico fetal se diferencia y se separa del ácido nucleico materno en base a diferencias de metilación. El enriquecimiento en una especie de ácido nucleico con bajo número de copias también puede mejorar la sensibilidad cuantitativa. Por ejemplo, el área de detección de la proporción máxima más sensible está dentro del 10 % desde el punto central. Véase la figura 1.

Especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto

En los procedimientos descritos en el presente documento, se analizan las especies de secuencias de nucleótidos particulares situadas en un cromosoma diana particular y en uno o más cromosomas de referencia. El término "cromosoma diana" como se usa en el presente documento se utiliza en dos contextos, ya que el término se refiere a (i) un cromosoma particular (por ejemplo, cromosoma 21, 18 o 13) y a veces (ii) un cromosoma de una fuente diana particular (por ejemplo, cromosoma de un feto, cromosoma de una célula cancerosa). Cuando el término se refiere a un cromosoma particular, se utiliza el término "cromosoma diana" (por ejemplo, "cromosoma diana 21") y cuando el término se refiere a un cromosoma diana particular de una fuente particular, se incluye la fuente del cromosoma diana (por ejemplo, "cromosoma diana fetal", "cromosoma diana de célula cancerosa").

Un "conjunto" incluye las especies de secuencias de nucleótidos situadas en un cromosoma diana y uno o más cromosomas de referencia. Las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto están situadas en el cromosoma diana y en el uno o más cromosomas de referencia. El término "cromosoma de referencia" se refiere a un cromosoma que incluye una especie de secuencia de nucleótidos como subsecuencia, y a veces es un cromosoma no asociado con una anomalía cromosómica particular que se está sometiendo a cribado. Por ejemplo, en un procedimiento de cribado prenatal para el diagnóstico de síndrome de Down (es decir, trisomía 21), el cromosoma 21 es el cromosoma diana y otro cromosoma (por ejemplo, el cromosoma 5) es el cromosoma de referencia. En determinados modos de realización, un cromosoma de referencia puede estar asociado con una anomalía cromosómica. Por ejemplo, el cromosoma 21 puede ser el cromosoma diana y el cromosoma 18 puede ser el cromosoma de referencia cuando se somete a cribado para el diagnóstico de síndrome de Down, y el cromosoma 18 puede el cromosoma diana y el cromosoma 21 puede ser el cromosoma de referencia cuando se somete a cribado para el diagnóstico de síndrome de Edwards.

Los términos "especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto", un "conjunto de especies de secuencias de nucleótidos" y variantes gramaticales de los mismos, como se usa en el presente documento, se refieren a especies de secuencias de nucleótidos en un cromosoma diana y un cromosoma de referencia. Las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto, en general, comparten un nivel significativo de identidad de secuencia. Una especie de secuencia de nucleótidos en un conjunto está situada en un cromosoma y otra especie de secuencias de nucleótidos en un conjunto está situada en otro cromosoma. Una especie de secuencia de nucleótidos en un conjunto situada en un cromosoma diana se puede denominar "especie de secuencia de nucleótidos diana" y una especie de secuencia de nucleótidos en un conjunto situada en un cromosoma de referencia se puede denominar "especie de secuencia de nucleótidos de referencia".

Las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto comparten una identidad de aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 % o 94 %, y todos los valores intermedios de la misma, entre sí en algunos modos de realización. Las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto son "sustancialmente idénticas" entre sí en algunos modos de realización, lo que se refiere a especies de secuencias de nucleótidos que comparten una identidad de un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, o una identidad mayor de un 99 %, entre sí, en determinados modos de realización. Para especies de secuencias de nucleótidos altamente idénticas en un conjunto, las especies de secuencias de nucleótidos pueden ser idénticas entre sí con la excepción de un emparejamiento erróneo de par de bases, en determinados modos de realización. Por ejemplo, las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto pueden ser idénticas entre sí con la excepción de un emparejamiento erróneo de par de bases para una longitud de especie de secuencia de nucleótidos de aproximadamente 100 pares de bases (por ejemplo, una longitud de secuencia de aproximadamente 80, 82, 84, 86,

88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118 o 120 pares de bases). Por tanto, las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto pueden ser "secuencias parálogas" o "secuencias con paralogía", que, como se usa en el presente documento, se refiere a especies de secuencias de nucleótidos que incluyen sólo uno o dos emparejamientos erróneos de pares de bases. A veces las secuencias parálogas tienen un origen evolutivo común y a veces se duplican con el tiempo en un genoma de interés. A veces las secuencias parálogas conservan la estructura de secuencia y gen (por ejemplo, número y posición relativa de intrones y exones y a menudo la longitud del transcrito). En algunos modos de realización, las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto pueden diferir en dos o más emparejamientos erróneos de pares de bases (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 emparejamientos erróneos de pares de bases), en los que las pares de bases con emparejamiento erróneo son secuenciales o no secuenciales (por ejemplo, los emparejamientos erróneos de pares de bases pueden ser secuenciales durante aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 bases).

Las técnicas de alineación y la metodología de evaluación de la identidad de secuencia son conocidas. Dichos análisis se pueden realizar por inspección visual o usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, se puede utilizar el algoritmo de Meyers y Miller, CABIOS 4: 11-17 (1989), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0). Utilizando el algoritmo anterior, se puede usar una tabla de residuos por peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4 para determinar la identidad de secuencia.

Los emparejamientos erróneos de pares de bases entre especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto no son significativamente polimorfas en determinados modos de realización, y los nucleótidos que dan lugar a los emparejamientos erróneos están presentes en una tasa de más de un 95 % de sujetos y cromosomas en una población dada (por ejemplo, los mismos nucleótidos que dan lugar a los emparejamientos erróneos están presentes aproximadamente en un 98 %, 99 % o más de un 99 % de sujetos y cromosomas en una población) en algunos modos de realización. Cada especie de secuencia de nucleótidos en un conjunto, en su totalidad, a menudo está presente en una porción significativa de una población sin modificación (por ejemplo, presente sin modificación aproximadamente en un 97 %, 98 %, 99 %, o más de un 99 % de sujetos y cromosomas en una población).

Las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto pueden ser de cualquier longitud conveniente. Por ejemplo, una especie de secuencia de nucleótidos en un conjunto puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 10.000 pares de bases de longitud, de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 pares de bases de longitud, de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 pares de bases de longitud, o de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 o 9000 pares de bases de longitud. En algunos modos de realización, una especie de secuencia de nucleótidos en un conjunto es de aproximadamente 100 pares de bases de longitud (por ejemplo, aproximadamente 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118 o 120 pares de bases de longitud). En determinados modos de realización, las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto son de longitud idéntica, y a veces las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto son de longitud diferente (por ejemplo, una especie de secuencia de nucleótidos es más larga en de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nucleótidos (por ejemplo, aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 nucleótidos más larga).

Las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto son no exónicas en algunos modos de realización, y a veces una o más especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto son intrónicas, parcialmente intrónicas, parcialmente exónicas o parcialmente no exónicas. En determinados modos de realización, una secuencia de nucleótidos en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos exónica.

En algunos modos de realización, una o más especies de secuencias de nucleótidos se seleccionan de las mostradas en las tablas en el presente documento (por ejemplo, tabla 4A, tabla 4B y tabla 14).

Cada conjunto puede incluir dos o más especies de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5 especies de secuencias de nucleótidos). En algunos modos de realización, el número de cromosomas diana y de referencia equivale al número de especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto, y a veces cada una de las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto está presente sólo en un cromosoma. En determinados modos de realización, una especie de secuencia de nucleótidos está situada en más de un cromosoma (por ejemplo, 2 o 3 cromosomas).

Los procedimientos descritos en el presente documento se pueden llevar a cabo usando un conjunto de especies de secuencias de nucleótidos, y a veces se utilizan dos o tres conjuntos de especies de secuencias de nucleótidos. Para los procedimientos múltiples descritos en el presente documento, se pueden utilizar de aproximadamente 4 a aproximadamente 100 conjuntos de especies de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, aproximadamente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 conjuntos).

Uno o más de los conjuntos consisten en dos especies de secuencias de nucleótidos en algunos modos de realización, y a veces uno o más conjuntos consisten en tres especies de secuencias de nucleótidos. Algunos modos de realización se refieren a mezclas de conjuntos en las que algunos conjuntos consisten en dos especies de secuencias de nucleótidos y otros conjuntos consisten en tres especies de secuencias de nucleótidos, que se pueden usar. En algunos modos de realización, aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de los conjuntos consisten en tres especies de secuencias de nucleótidos.

93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de los conjuntos consisten en dos especies de secuencias de nucleótidos, y en determinados modos de realización, aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de los conjuntos consisten en tres secuencias de nucleótidos. En un conjunto, a veces las especies de secuencias de nucleótidos están en: el cromosoma 21 y cromosoma 18, o están en el cromosoma 21 y cromosoma 13, o están en el cromosoma 13 y cromosoma 18, o están en el cromosoma 21, y cromosoma 18 y cromosoma 13, o están en el cromosoma X, o están en el cromosoma Y, o están en el cromosoma X e Y, o están en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13 y cromosoma X o Y, y aproximadamente en un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de los conjuntos, a veces las especies de secuencias de nucleótidos están en dichos cromosomas designados. En determinados modos de realización, el conjunto utilizado, o cada conjunto cuando se utiliza más de un conjunto, consiste en especies de secuencias de nucleótidos situadas en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13.

En algunos modos de realización, las especies de secuencias de nucleótidos están amplificadas y los emparejamientos erróneos de pares de bases se detectan en las especies de ácidos nucleicos amplificados resultantes. En otros modos de realización, las especies de secuencias de nucleótidos no están amplificadas antes de la detección (por ejemplo, si el sistema de detección es suficientemente sensible o si está disponible o se genera una cantidad suficiente de ácido nucleico del cromosoma), y las especies de secuencias de nucleótidos se detectan directamente en el ácido nucleico del cromosoma o fragmentos del mismo.

Identificación de especies de secuencias de nucleótidos

En un aspecto, la tecnología en parte comprende identificar las especies de secuencias de nucleótidos que se amplifican de manera estable y reproducible relativamente entre sí y, de este modo, son útiles junto con los procedimientos de la tecnología. La identificación de especies de secuencias de nucleótidos se puede realizar computacionalmente identificando las secuencias que comprenden una identidad de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % sobre una región de secuencia amplificable. En otro modo de realización, las secuencias de hibridación de cebadores en las especies de secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas. A menudo, las especies de secuencias de nucleótidos comprenden un contenido en GC sustancialmente idéntico (por ejemplo, a veces las secuencias tienen una diferencia menor de aproximadamente un 5 % y a menudo, menor de aproximadamente un 1 % en el contenido en GC).

Los programas de búsqueda de secuencias son bien conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, BLAST (véase, Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410), BLAT (Kent, W.J. 2002. BLAT – The BLAST-Like Alignment Tool. Genome Research 4: 656-664), FASTA y SSAHA (véase, por ejemplo, Pearson, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(5): 2444-2448; Lung *et al.*, 1991, J. Mol. Biol. 221(4): 1367-1378). Además, los procedimientos de determinación de la significación de alineaciones de secuencias son conocidos en la técnica y se describen en Needleman y Wunsch, 1970, J. of Mol. Biol. 48: 444; Waterman *et al.*, 1980, J. Mol. Biol. 147: 195-197; Karlin *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2204-2268; y Dembo *et al.*, 1994, Ann. Prob. 22: 2022-2039. Aunque en un aspecto, se busca una única secuencia de consulta frente a la base de datos, en otro aspecto, se busca una pluralidad de secuencias frente a la base de datos (por ejemplo, usando el programa MEGABLAST, accesible a través de NCBI).

Existe una serie de bases de datos de secuencias genómicas humanas, incluyendo, pero sin limitarse a, la base de datos NCBI GenBank (en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome>); <http://www.jcvi.org/>; la base de datos del Genetic Information Research Institute (GIRI) (en <http://www.girinst.org/>); <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>. Las bases de datos de secuencias expresadas incluyen, pero no se limitan a, la base de datos NCBI EST, la base de datos de secuencias de ADNc aleatorias de Human Genome Sciences, y la base de datos EMBL (EMBL, Heidelberg, Alemania).

Aunque a menudo se utilizan procedimientos computacionales de identificación de conjuntos de secuencias de nucleótidos adecuados, se puede usar cualquier procedimiento de detección de secuencias que pueda realizar un emparejamiento de bases significativo para identificar o validar las secuencias de nucleótidos de la tecnología. Por ejemplo, se pueden validar conjuntos de secuencias de nucleótidos usando una combinación de procedimientos basados en hibridación y procedimientos computacionales para identificar las secuencias que se hibridan a múltiples cromosomas. La tecnología no está limitada a las secuencias de nucleótidos que aparecen exclusivamente en cromosomas diana y de referencia. Por ejemplo, los cebadores de amplificación pueden amplificar conjuntamente secuencias de nucleótidos de 2, 3, 4, 5, 6 o más cromosomas siempre que se produzcan las especies de ácidos nucleicos amplificados en una tasa reproducible y la mayoría (por ejemplo, más de un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de las especies diana provienen del cromosoma diana, permitiendo de este modo una detección exacta de anomalías cromosómicas diana. Como se usa en el presente documento, los términos "diana" y "referencia" pueden tener un grado de ambigüedad puesto que la "diana" puede ser cualquier cromosoma que sea susceptible a anomalías cromosómicas. Por ejemplo, un conjunto que consiste en especies de secuencias de nucleótidos de los cromosomas 13, 18 y 21 tiene el poder para detectar simultáneamente una anomalía cromosómica que se origina a partir de cualquiera de los tres cromosomas. En el caso de una muestra de síndrome de Down (trisomía 21), el cromosoma 21 es el "cromosoma diana" y los cromosomas 13 y 18 son los "cromosomas de referencia".

Las tablas 3 y 4 proporcionan ejemplos de conjuntos de secuencias de nucleótidos candidatos no limitantes, en los que al menos una especie del conjunto está situada en el cromosoma 21, 18 o 13.

Amplificación

En algunos modos de realización, las especies de secuencias de nucleótidos se amplifican usando un procedimiento de amplificación adecuado. Puede ser deseable amplificar las especies de secuencias de nucleótidos particularmente si una o más de las especies de secuencias de nucleótidos existen en un número de copias bajo. En algunos modos de realización, la amplificación de secuencias o regiones de interés puede ayudar en la detección de desequilibrios de dosificación génica, como se puede observar en trastornos genéticos que implican aneuploidia cromosómica, por ejemplo. Un producto de amplificación (amplicón) de una especie de secuencia de nucleótidos se denomina en el presente documento "especie de ácido nucleico amplificado".

A menudo la amplificación de ácido nucleico implica la síntesis enzimática de amplicones de ácido nucleico (copias), que contienen una secuencia complementaria a una especie de secuencia de nucleótidos que se va a amplificar. La amplificación de especies de secuencias de nucleótidos y la detección de los amplicones sintetizados, pueden mejorar la sensibilidad de un ensayo, puesto que se necesitan menos secuencias diana al principio del ensayo, y puede mejorar la detección de especies de secuencias de nucleótidos.

Se puede utilizar cualquier técnica de amplificación adecuada. La amplificación de polinucleótidos incluye, pero no se limita a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR); amplificación por unión (o reacción en cadena de la ligasa (LCR)); procedimientos de amplificación basados en el uso de Q-beta replicasa o polimerasa dependiente del molde (véase la publicación de patente de los EE. UU. número US20050287592); amplificación isotérmica dependiente de helicasa (Vincent *et al.*, "Helicase-dependent isothermal DNA amplification". EMBO reports 5 (8): 795-800 (2004)); amplificación de desplazamiento de hebra (SDA); amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos con SDA termófila (3SR o NASBA) y amplificación asociada a la transcripción (TAA). Los ejemplos no limitantes de procedimientos de amplificación por PCR incluyen PCR estándar, AFLP-PCR, PCR específica de alelo, Alu-PCR, PCR asimétrica, PCR de colonias, PCR de inicio en caliente, PCR inversa (IPCR), PCR in situ (ISH), PCR específica de intersecuencia (ISSR-PCR), PCR larga, PCR múltiple, PCR con cebadores internos, PCR cuantitativa, PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), PCR en tiempo real, PCR unicelular, PCR en fase sólida, combinaciones de las mismas, y similares. Los reactivos y el soporte físico para llevar a cabo la PCR están comercialmente disponibles.

Los términos "amplificar", "amplificación", "reacción de amplificación" o "amplificando" se refieren a cualquier procedimiento *in vitro* para multiplicar las copias de una secuencia diana de ácido nucleico. A veces, amplificación se refiere a un incremento "exponencial" en el ácido nucleico diana. Sin embargo, "amplificar" como se usa en el presente documento también se puede referir a incrementos lineales en los números de una secuencia diana seleccionada de ácido nucleico, pero es diferente de una etapa de extensión de cebadores individual de una sola vez. En algunos modos de realización, se puede realizar una reacción de amplificación limitada, también conocida como preamplificación. La preamplificación es un procedimiento en el que se produce una cantidad limitada de amplificación debido a que se está realizando un pequeño número de ciclos, por ejemplo, 10 ciclos. La preamplificación puede permitir algo de amplificación, pero detiene la amplificación antes de la fase exponencial, y típicamente produce aproximadamente 500 copias de la(s) secuencia(s) de nucleótidos deseada(s). El uso de la preamplificación también puede limitar las inexactitudes asociadas con los reactivos eliminados en las reacciones de PCR estándar, y también puede reducir los sesgos de la amplificación debido a la abundancia de secuencias de nucleótidos o especies de la diana. En algunos modos de realización, se puede usar una extensión de cebadores de una sola vez se puede realizar como preludio para la amplificación lineal o exponencial.

En el presente documento se presenta una descripción generalizada de un procedimiento de amplificación. Los cebadores y el ácido nucleico diana están conectados, y las secuencias complementarias se hibridan entre sí, por ejemplo. Los cebadores se pueden hibridar a un ácido nucleico diana, en o cerca de (por ejemplo, adyacente a, contiguo a, y similares) una secuencia de interés. Una mezcla de reacción, que contiene los componentes necesarios para la funcionalidad enzimática, se añade al híbrido cebador – ácido nucleico diana, y se puede producir la amplificación en condiciones adecuadas. Los componentes de una reacción de amplificación pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, cebadores (por ejemplo, cebadores individuales, pares de cebadores, conjuntos de cebadores y similares) un molde de polinucleótido (por ejemplo, ácido nucleico diana), polimerasa, nucleótidos, dNTP y similares. En algunos modos de realización, por ejemplo, se pueden usar nucleótidos o análogos de nucleótidos no naturales, tales como análogos que contienen un marcador detectable (por ejemplo, marcador fluorescente o colorimétrico). Las polimerasas se pueden seleccionar por un experto en la técnica e incluyen polimerasas para amplificación con termociclo (por ejemplo, Taq ADN polimerasa; Taq ADN polimerasa Q-Bio™ (forma truncada recombinante de Taq ADN polimerasa que carece de actividad 5'-3'exo); polimerasa SurePrime™ (Taq ADN polimerasa químicamente modificada para PCR de "inicio en caliente"); Taq ADN polimerasa Arrow™ (amplificación de molde larga y de alta sensibilidad)) y polimerasas para la amplificación termoestable (por ejemplo, ARN polimerasa para la amplificación mediada por transcripción (TMA) descrita en la URL de Internet "gen-probe.com/pdfs/tma_whiteppr.pdf). Se pueden añadir otros componentes enzimáticos, tales como transcriptasa inversa para reacciones de amplificación mediada por transcripción (TMA), por ejemplo.

Los términos "cerca" o "adyacente a" cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos de interés se refiere

a una distancia o región entre el extremo del cebador y la secuencia de nucleótidos o nucleótidos de interés. Como se usa en el presente documento, adyacente está en el intervalo de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 500 nucleótidos (por ejemplo, aproximadamente 5 nucleótidos lejos de nucleótido del interés, aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450 o aproximadamente 500 nucleótidos desde un nucleótido de interés). En algunos modos de realización, los cebadores en un conjunto se hibridan dentro de aproximadamente de 10 a 30 nucleótidos de una secuencia de ácidos nucleicos de interés y producen los productos cuantificados.

Cada especie de ácido nucleico amplificado independientemente es de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 pares de bases de longitud, en algunos modos de realización. En determinados modos de realización, una especie de ácido nucleico amplificado es de aproximadamente 20 a aproximadamente 250 pares de bases de longitud, a veces es de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 pares de bases de longitud y a veces es de aproximadamente 100 pares de bases de longitud. Por tanto, en algunos modos de realización, la longitud de cada uno de los productos de especies de ácidos nucleicos amplificados independientemente es de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 pares de bases (pb) de longitud.

Un producto de amplificación puede incluir nucleótidos naturales, nucleótidos no naturales, análogos de nucleótidos y similares y combinaciones de los anteriores. Un producto de amplificación a menudo tiene una secuencia de nucleótidos que es idéntica a o sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleótidos de ácido nucleico de muestra o complemento de la misma. Una secuencia de nucleótidos "sustancialmente idéntica" en un producto de amplificación tendrá, en general, un alto grado de identidad de secuencia con la especie de secuencia de nucleótidos que se va a amplificar o complemento de la misma (por ejemplo, una identidad de secuencia de aproximadamente un 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, el 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de un 99 %), y a veces las variaciones son resultado de la falta de fidelidad de la polimerasa usada para la extensión y/o amplificación, o secuencia(s) de nucleótidos adicional(es) añadida(s) a los cebadores usados para la amplificación.

Las condiciones de PCR pueden ser dependientes de las secuencias de cebadores, abundancia de la diana, y la cantidad deseada de amplificación, y por lo tanto, un experto en la técnica puede elegir entre una serie de protocolos de PCR disponible (véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. n.º 4.683.195 y 4.683.202; y PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.*, eds, 1990. La PCR digital también es conocida por los expertos en la técnica; véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. número 20070202525, presentada el 2 de febrero de 2007). A menudo la PCR se lleva a cabo como un procedimiento automático con una enzima termoestable. En este procedimiento, la temperatura de la mezcla de reacción se cicla a través de una región de desnaturalización, una región de hibridación de cebadores y una región de reacción de extensión automáticamente. Las máquinas adaptadas específicamente para este propósito están comercialmente disponibles. Un ejemplo no limitante de un protocolo de PCR que puede ser adecuado para los modos de realización descritos en el presente documento es, tratar la muestra a 95 °C durante 5 minutos; repetir cuarenta y cinco ciclos de 95 °C durante 1 minuto, 59 °C durante 1 minuto, 10 segundos, y 72 °C durante 1 minuto 30 segundos; y a continuación tratar la muestra a 72 °C durante 5 minutos. Con frecuencia se realizan múltiples ciclos usando un ciclador térmico comercialmente disponible. También se pueden aplicar procedimientos de amplificación isotérmica adecuados conocidos y seleccionados por el experto en la técnica, en determinados modos de realización.

En algunos modos de realización, se pueden usar procedimientos de amplificación múltiple para amplificar los ácidos nucleicos diana, de modo que múltiples amplicones se amplifican simultáneamente en una única reacción homogénea. Como se usa en el presente documento, "amplificación múltiple" se refiere a una variante de PCR en la que se puede lograr la amplificación simultánea de muchas dianas de interés en un recipiente de reacción usando más de un par de cebadores (por ejemplo, más de un conjunto de cebadores). La amplificación múltiple puede ser útil para el análisis de delecciones, mutaciones y polimorfismos, o ensayos cuantitativos, en algunos modos de realización. En determinados modos de realización, se puede usar la amplificación múltiple para detectar un desequilibrio de secuencia paráloga, aplicaciones de fenotipado en las que se requiere el análisis simultáneo de múltiples marcadores, detección de patógenos u organismos modificados genéticamente, o para análisis de microsatélites. En algunos modos de realización, se puede combinar la amplificación múltiple con otro procedimiento de amplificación (por ejemplo, PCR) (por ejemplo, PCR con cebadores internos o PCR de inicio en caliente, por ejemplo) para incrementar la especificidad y reproducibilidad de la amplificación. En otros modos de realización, se puede realizar una amplificación múltiple por duplicados, por ejemplo, para reducir la varianza introducida por dicha amplificación.

En algunos modos de realización, las especies de ácidos nucleicos de amplificación de los conjuntos de cebadores se generan en un recipiente de reacción. En algunos modos de realización, se puede realizar la amplificación de secuencias parálogas en un único recipiente de reacción. En determinados modos de realización, se pueden amplificar secuencias parálogas (en los mismos o diferentes cromosomas) por un único conjunto o par de cebadores. En algunos modos de realización, se pueden amplificar las especies de secuencias de nucleótidos por

un único conjunto o par de cebadores. En algunos modos de realización, las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto se pueden amplificar con dos o más pares de cebadores.

En determinados modos de realización, la amplificación de ácidos nucleicos puede generar especies de ácidos nucleicos adicionales de secuencia de ácido nucleico diferente o sustancialmente similar. En determinados modos de realización descritos en el presente documento, las especies de ácidos nucleicos contaminantes o adicionales, que puede contener secuencias sustancialmente complementarias a, o pueden ser sustancialmente idénticas a, la secuencia de interés, pueden ser útiles para la cuantificación de secuencias, con la condición de que el nivel de secuencias contaminantes o adicionales permanezca constante y por lo tanto, pueda ser un marcador fiable con un nivel que se pueda reproducir sustancialmente. Consideraciones adicionales que pueden afectar a la reproducibilidad de la amplificación de secuencia son; condiciones de PCR (número de ciclos, volumen de reacción, diferencia en la temperatura de fusión entre pares de cebadores, y similares), concentración de ácido nucleico diana en la muestra (por ejemplo, ácido nucleico fetal en el historial de ácido nucleico materno, ácido nucleico vírico en el historial del huésped), el número de cromosomas en el que reside la especie de nucleótido de interés (por ejemplo, secuencia paráloga), variaciones en la calidad de la muestra preparada, y similares. Los términos "reproducido sustancialmente" o "reproducible sustancialmente" como se usa en el presente documento se refieren a un resultado (por ejemplo, cantidad cuantificable de ácido nucleico) que, en condiciones sustancialmente similares, se podría producir sustancialmente de la misma manera en aproximadamente un 75 % del tiempo o más, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 99 % del tiempo o más.

En algunos modos de realización en los que un ácido nucleico diana es ARN, antes de la etapa de amplificación, se puede sintetizar una copia de ADN (ADNc) del transcrito de ARN de interés. Se puede sintetizar un ADNc por transcripción inversa, lo que se puede llevar a cabo como una etapa separada, o en una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), una modificación de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar ARN. Los procedimientos adecuados para la amplificación por PCR de ácidos ribonucleicos se describen por Romero y Rotbart en *Diagnostic Molecular Biology: Principles and Applications*, pp. 401-406; Persing *et al.*, eds., Mayo Foundation, Rochester, Minn., 1993; Egger *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 33:1442-1447, 1995; u la patente de los EE. UU. n.º 5.075.212. Se puede usar tecnología de ADN ramificado para amplificar la señal de los marcadores de ARN en la sangre materna. Para una revisión de la amplificación de señales de ADN ramificado (ADNb) para la cuantificación directa de secuencias de ácidos nucleicos en muestras clínicas, véase Nolte, *Adv. Clin. Chem.* 33:201-235, 1998.

La amplificación también se puede lograr usando PCR digital, en determinados modos de realización (por ejemplo, Kalinina y colaboradores (Kalinina *et al.*, "Nanoliter scale PCR with TaqMan detection." *Nucleic Acids Research*. 25; 1999-2004, (1997); Vogelstein y Kinzler (*Digital PCR. Proc Natl Acad Sci USA.* 96; 9236-41, (1999); publicación de patente PCT n.º WO05023091A2; publicación de patente de los EE. UU. n.º US 20070202525). La PCR digital se aprovecha de la amplificación de ácidos nucleicos (ADN, ADNc o ARN) a un nivel molecular individual, y ofrece un procedimiento altamente sensible para cuantificar el ácido nucleico con bajo número de copias. Están disponibles sistemas para la amplificación digital y el análisis de ácidos nucleicos (por ejemplo, Fluidigm® Corporation).

El uso de una reacción de extensión de cebadores también se puede aplicar en los procedimientos de la tecnología. Una reacción de extensión de cebadores funciona, por ejemplo, discriminando secuencias de ácidos nucleicos en un único emparejamiento erróneo de nucleótido (por ejemplo, un emparejamiento erróneo entre secuencias parálogas). El emparejamiento erróneo se detecta por la incorporación de uno o más desoxinucleótidos y/o didesoxinucleótidos a un oligonucleótido de extensión, que se hibrida a una región adyacente al sitio de emparejamiento erróneo. En general, el oligonucleótido de extensión se extiende con una polimerasa. En algunos modos de realización, se incorpora una marca detectable o marcador detectable en el oligonucleótido de extensión o en los nucleótidos añadidos en el oligonucleótido de extensión (por ejemplo, biotina o estreptavidina). El oligonucleótido extendido se puede detectar por cualquier procedimiento de detección adecuado conocido (por ejemplo, espectrometría de masas; procedimientos de secuenciación). En algunos modos de realización, el sitio de emparejamiento erróneo se extiende sólo por uno o dos desoxinucleótidos o didesoxinucleótidos complementarios que se marcan por un marcador específico o generan un producto de extensión de cebadores con una masa específica, y el emparejamiento erróneo se puede discriminar y cuantificar.

En algunos modos de realización, la amplificación se puede realizar sobre un soporte sólido. En algunos modos de realización, los cebadores pueden estar asociados a un soporte sólido. En determinados modos de realización, el ácido nucleico diana (por ejemplo, ácido nucleico molde) puede estar asociado a un soporte sólido. Un ácido nucleico (cebador o diana) en asociación con un soporte sólido a menudo se denomina un ácido nucleico de fase sólida.

En algunos modos de realización, las moléculas de ácido nucleico proporcionadas para la amplificación y en un "microrreactor". Como se usa en el presente documento, el término "microrreactor" se refiere a un espacio dividido en el que una molécula de ácido nucleico se puede hibridar a una molécula de ácido nucleico de soporte sólido. Los ejemplos de microrreactores incluyen, sin limitación, un glóbulo de emulsión (descrito a continuación en el presente documento) y un hueco en un sustrato. Un hueco en un sustrato puede ser un orificio, un poro o un pocillo (por ejemplo, micropocillo, nanopocillo, picopocillo, microporo o nanoporo) en un sustrato construido a partir de un

material sólido útil para contener fluidos (por ejemplo, plástico (por ejemplo, polipropileno, polietileno, poliestireno) o silicio) en determinados modos de realización. Los glóbulos de emulsión se dividen por una fase inmiscible como se describe en mayor detalle a continuación en el presente documento. En algunos modos de realización, el volumen del microrreactor es lo suficientemente grande como para acomodar un soporte sólido (por ejemplo, perla) en el microrreactor y lo suficientemente pequeño como para excluir la presencia de dos o más soportes sólidos en el microrreactor.

El término "emulsión" como se usa en el presente documento se refiere a una mezcla de dos sustancias inmiscibles y inmezclables, en la que una sustancia (la fase dispersa) a menudo se dispersa en la otra sustancia (la fase continua). La fase dispersa puede ser una solución acuosa (es decir, una solución que comprende agua) en determinados modos de realización. En algunos modos de realización, la fase dispersa está compuesta predominantemente de agua (por ejemplo, más de un 70 %, más de un 75 %, más de un 80 %, más de un 85 %, más de un 90 %, más de un 95 %, más de un 97 %, más de un 98 % y más de un 99 % de agua (en peso)). Cada porción discreta de una fase dispersa, tal como una fase dispersa acuosa, se denomina en el presente documento "glóbulo" o "microrreactor". Un glóbulo a veces puede ser de forma esferoide, sustancialmente esferoide o semiesferoide, en determinados modos de realización.

Los términos "aparato de emulsión" y "componente(s) de emulsión" como se usa en el presente documento se refieren a aparatos y componentes que se pueden usar para preparar una emulsión. Los ejemplos no limitantes de aparatos de emulsión incluyen, sin limitación, aparato de contraflujo, contracorriente, tambor giratorio y membrana adecuado para su uso por un experto en la técnica para preparar una emulsión. Un componente de emulsión forma la fase continua de una emulsión en determinados modos de realización, e incluye, sin limitación, una sustancia inmiscible con agua, tal como un componente que comprende o que consiste esencialmente en un aceite (por ejemplo, un aceite termoestable y biocompatible (por ejemplo, aceite de vaselina fluido)). Se puede utilizar un estabilizante de emulsión biocompatible como componente de emulsión. Los estabilizantes de emulsión incluyen, sin limitación, Atlox 4912, Span 80 y otros tensioactivos biocompatibles.

En algunos modos de realización, se pueden incluir componentes útiles para reacciones biológicas en la fase dispersa. Los glóbulos de la emulsión pueden incluir (i) una unidad de soporte sólido (por ejemplo, una perla o una partícula); (ii) molécula de ácido nucleico de muestra; y (iii) una cantidad suficiente de agentes de extensión para alargar el ácido nucleico de fase sólida y amplificar el ácido nucleico de fase sólida alargado (por ejemplo, nucleótidos de extensión, polimerasa, cebador). Los glóbulos inactivos en la emulsión pueden incluir un subconjunto de estos componentes (por ejemplo, un soporte sólido y reactivos de extensión y ningún ácido nucleico de muestra) y algunos pueden estar vacíos (es decir, algunos glóbulos no incluirán soporte sólido, ni ácido nucleico de muestra y ni agentes de extensión).

Se pueden preparar emulsiones usando procedimientos conocidos adecuados (por ejemplo, Nakano *et al.* "Single-molecule PCR using water-in-oil emulsion;" Journal of Biotechnology 102 (2003) 117-124). Los procedimientos de emulsificación incluyen, sin limitación, procedimientos coadyuvantes, procedimientos contraflujo, procedimientos contracorriente, procedimientos con tambor giratorio, procedimientos con membrana, y similares. En determinados modos de realización, se prepara una mezcla de reacción acuosa que contiene un soporte sólido (a continuación en el presente documento la "modos de reacción") y a continuación se añade a un aceite biocompatible. En determinados modos de realización, la mezcla de reacción se puede añadir gota a gota a una mezcla en rotación de aceite biocompatible (por ejemplo, aceite de vaselina fluido (Sigma)) y se deja emulsionar. En algunos modos de realización, la mezcla de reacción se puede añadir gota a gota en un flujo cruzado de aceite biocompatible. El tamaño de los glóbulos acuosos en la emulsión se puede ajustar, tal como variando el caudal y la velocidad a la que se añaden los componentes entre sí, por ejemplo.

El tamaño de los glóbulos de emulsión se puede seleccionar por el experto en la técnica en determinados modos de realización en base a dos factores competitivos: (i) los glóbulos son lo suficientemente grandes para englobar una molécula de soporte sólido, una molécula de ácido nucleico de muestra, y suficientes agentes de extensión para el grado de elongación y amplificación requerido; y (ii) los glóbulos son lo suficientemente pequeños de modo que se pueda amplificar una población de glóbulos por un equipo de laboratorio convencional (por ejemplo, equipo de termociclado, tubos de ensayo, incubadoras y similares). Los glóbulos en la emulsión pueden tener un diámetro nominal, medio o promedio de aproximadamente 5 micrómetros a aproximadamente 500 micrómetros, de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 350 micrómetros, de aproximadamente 50 a 250 micrómetros, de aproximadamente 100 micrómetros a aproximadamente 200 micrómetros, o de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400 o 500 micrómetros en determinados modos de realización.

En determinados modos de realización, las especies de ácidos nucleicos amplificados en un conjunto son de idéntica longitud, y a veces las especies de ácidos nucleicos amplificados en un conjunto son de una longitud diferente. Por ejemplo, una especie de ácido nucleico amplificado puede ser mayor que una o más de otras especies de ácidos nucleicos amplificados en el conjunto en de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nucleótidos (por ejemplo, de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 nucleótidos más larga).

En algunos modos de realización, se puede determinar una proporción para la cantidad de una especie de ácido nucleico amplificado en conjunto con respecto a la cantidad de otra especie de ácido nucleico amplificado en el conjunto (a continuación en el presente documento una "proporción de conjunto"). En algunos modos de realización, la cantidad de una especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto es aproximadamente igual a la cantidad de otra especie de ácido nucleico amplificado en el conjunto (es decir, las cantidades de especies de ácidos nucleicos amplificados en un conjunto son de aproximadamente 1:1), que en general es el caso cuando el número de cromosomas en una muestra que lleva cada especie de secuencia de nucleótidos amplificada es aproximadamente igual. El término "cantidad" como se usa en el presente documento con respecto a la especie de ácido nucleico amplificado se refiere a cualquier medida, incluyendo, pero sin limitarse a, número de copias, peso (por ejemplo, gramos) y concentración (por ejemplo, gramos por unidad de volumen (por ejemplo, mililitro); unidades molares). En determinados modos de realización, la cantidad de una especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto puede diferir de la cantidad de otra especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto, incluso cuando el número de cromosomas en una muestra que lleva cada especie de secuencia de nucleótidos amplificada es aproximadamente igual. En algunos modos de realización, las cantidades especies de ácidos nucleicos amplificados dentro de un conjunto pueden variar hasta un nivel umbral en el que se puede detectar una anomalía cromosómica con un nivel de confianza de aproximadamente un 95 % (por ejemplo, aproximadamente un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o más de un 99 %). En determinados modos de realización, las cantidades de la especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto varían aproximadamente en un 50 % o menos (por ejemplo, aproximadamente en un 45, 40, 35, 30, 25, 20, 10, 5, 4, 3, 2 o 1 %, o menos de un 1 %). Por tanto, en determinados modos de realización, las cantidades de especies de ácidos nucleicos amplificados en un conjunto pueden variar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:1,5. Sin quedar limitados por la teoría, determinados factores pueden dar lugar a la observación de que la cantidad de una especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto puede diferir de la cantidad de otra especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto, incluso cuando el número de cromosomas en una muestra que lleva cada especie de secuencia de nucleótidos amplificada es aproximadamente igual. Dichos factores pueden incluir diferentes tasas de eficacia de amplificación y/o amplificación de un cromosoma no destinado en el diseño de ensayo.

Cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto, en general, se amplifica en condiciones que amplifican estas especies, en un nivel sustancialmente reproducible. El término "nivel sustancialmente reproducible" como se usa en el presente documento se refiere a la consistencia de los niveles de amplificación para una especie de ácido nucleico amplificado particular por unidad de ácido nucleico molde (por ejemplo, por unidad de ácido nucleico molde que contiene la especie de secuencia de nucleótidos particular amplificada). Un nivel sustancialmente reproducible varía en aproximadamente un 1 % o menos en determinados modos de realización, después de tener en cuenta la cantidad de ácido nucleico molde que da lugar a una especie de ácido nucleico de amplificación particular (por ejemplo, normalizado para la cantidad de ácido nucleico molde). En algunos modos de realización, un nivel sustancialmente reproducible varía entre un 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % después de tener en cuenta la cantidad de ácido nucleico molde que da lugar a una especie de ácido nucleico de amplificación particular. De forma alternativa, sustancialmente reproducible quiere decir que cualesquiera dos o más medidas de un nivel de amplificación están dentro de un coeficiente de variación particular ("CV") de una media dada. Dicho CV puede ser de un 20 % o menos, a veces un 10 % o menos y a veces un 5 % o menos. Las dos o más medidas de un nivel de amplificación se pueden determinar entre dos o más reacciones y/o dos o más de los mismos tipos de muestras (por ejemplo, dos muestras normales o dos muestras de trisomía).

Cebadores

Se proporcionan cebadores útiles para la detección, cuantificación, amplificación, secuenciación y análisis de especies de secuencias de nucleótidos. En algunos modos de realización, se usan cebadores en conjuntos, en los que un conjunto contiene al menos un par. En algunos modos de realización, un conjunto de cebadores puede incluir un tercer o un cuarto ácido nucleico (por ejemplo, dos pares de cebadores o conjuntos de cebadores internos, por ejemplo). Una pluralidad de pares de cebadores puede constituir un conjunto de cebadores en determinados modos de realización (por ejemplo, aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 pares). En algunos modos de realización, se puede usar una pluralidad de conjuntos de cebadores, comprendiendo cada conjunto par(es) de cebadores. El término "cebador" como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse a un ácido nucleico diana, en o cerca de (por ejemplo, adyacente a) una región específica de interés. Los cebadores pueden permitir la determinación específica de una secuencia de nucleótidos de ácido nucleico diana o la detección del ácido nucleico diana (por ejemplo, la presencia o ausencia de una secuencia o número de copias de una secuencia), o característica de la misma, por ejemplo. Un cebador puede ser natural o sintético. El término "específico" o "especificidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la unión o hibridación de una molécula a otra molécula, tal como un cebador a un polinucleótido diana. Esto es, "específico" o "especificidad" se refiere al reconocimiento, contacto y formación de un complejo estable entre dos moléculas, en comparación con el reconocimiento, contacto o formación del complejo sustancialmente menor de cualquiera de las dos moléculas con otras moléculas. Como se usa en el presente documento, el término "hibridación" se refiere a la formación de un complejo estable entre dos moléculas. Los términos "cebador", "oligo" u "oligonucleótido" se pueden usar de forma intercambiable en todo el documento, cuando se refieren a cebadores.

Un ácido nucleico de cebador se puede diseñar y sintetizar usando procedimientos adecuados, y puede ser de

cualquier longitud adecuada para hibridarse a una secuencia de nucleótidos de interés (por ejemplo, cuando el ácido nucleico está en fase líquida o unido a un soporte sólido) y realizar los procedimientos de análisis descritos en el presente documento. Se pueden diseñar cebadores en base a una secuencia de nucleótidos diana. Un cebador, en algunos modos de realización, puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 nucleótidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos, o de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nucleótidos de longitud. Un cebador puede estar compuesto de nucleótidos naturales y/o no naturales (por ejemplo, nucleótidos marcados), o una mezcla de los mismos. Los cebadores adecuados para su uso con los modos de realización descritos en el presente documento, se pueden sintetizar y marcar usando técnicas conocidas. Los oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores) se pueden sintetizar químicamente de acuerdo con el procedimiento de fosforamidita-triéster en fase sólida descrito por primera vez por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letts.*, 22:1859-1862, 1981, usando un sintetizador automático, como se describe en Needham-VanDevanter *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12:6159-6168, 1984. La purificación de oligonucleótidos se puede efectuar por electroforesis en gel de acrilamida natural o por cromatografía de líquidos de alto rendimiento con intercambio aniónico (HPLC), por ejemplo, como se describe en Pearson y Regnier, *J. Chrom.*, 255:137-149, 1983.

Toda o una porción de una secuencia de ácido nucleico de cebador (natural o sintético) puede ser sustancialmente complementaria a un ácido nucleico diana, en algunos modos de realización. Como se refiere en el presente documento, "sustancialmente complementaria" con respecto a las secuencias se refiere a secuencias de nucleótidos que se hibridarán entre sí. La restricción de las condiciones de hibridación se puede alterar para tolerar cantidades variables de emparejamiento erróneo de secuencia. Se incluyen regiones de secuencias de nucleótidos homólogos, diana y de captura complementarias entre sí en un 55 % o más, 56 % o más, 57 % o más, 58 % o más, 59 % o más, 60 % o más, 61 % o más, 62 % o más, 63 % o más, 64 % o más, 65 % o más, 66 % o más, 67 % o más, 68 % o más, 69 % o más, 70 % o más, 71 % o más, 72 % o más, 73 % o más, 74 % o más, 75 % o más, 76 % o más, 77 % o más, 78 % o más, 79 % o más, 80 % o más, el 81 % o más, 82 % o más, 83 % o más, 84 % o más, 85 % o más, 86 % o más, 87 % o más, 88 % o más, 89 % o más, 90 % o más, 91 % o más, 92 % o más, 93 % o más, 94 % o más, 95 % o más, 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más o 99 % o más.

Los cebadores que son sustancialmente complementarios con una secuencia de ácidos nucleicos diana también son sustancialmente idénticos al complementario de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Esto es, los cebadores son sustancialmente idénticos a la hebra antisentido del ácido nucleico. Como se refiere en el presente documento, "sustancialmente idéntica" con respecto a las secuencias se refiere a secuencias de nucleótidos que son idénticas entre sí en un 55 % o más, 56 % o más, 57 % o más, 58 % o más, 59 % o más, 60 % o más, 61 % o más, 62 % o más, 63 % o más, 64 % o más, 65 % o más, 66 % o más, 67 % o más, 68 % o más, 69 % o más, 70 % o más, 71 % o más, 72 % o más, 73 % o más, 74 % o más, 75 % o más, 76 % o más, 77 % o más, 78 % o más, 79 % o más, 80 % o más, el 81 % o más, 82 % o más, 83 % o más, 84 % o más, 85 % o más, 86 % o más, 87 % o más, 88 % o más, 89 % o más, 90 % o más, 91 % o más, 92 % o más, 93 % o más, 94 % o más, 95 % o más, 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más o 99 % o más. Una prueba para determinar si dos secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es la de determinar el porcentaje de secuencias de nucleótidos idénticas compartidas.

Las secuencias y la longitud de los cebadores pueden afectar a la hibridación a secuencias de ácidos nucleicos diana. Dependiendo del grado de emparejamiento erróneo entre el cebador y ácido nucleico diana, se pueden usar condiciones de restricción bajas, medias o altas para efectuar la hibridación de cebador/diana. Como se usa en el presente documento, el término "condiciones restrictivas" se refiere a las condiciones para la hibridación y el lavado. Los procedimientos para la optimización de las condiciones de temperatura para la reacción de hibridación son conocidos por los expertos en la técnica, y se pueden encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6 (1989). Los procedimientos acuosos y no acuosos se describen en esa referencia y se puede usar cualquiera. Los ejemplos no limitantes de condiciones de hibridación restrictivas son hibridación en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1 % a 50 °C. Otro ejemplo de condiciones de hibridación restrictivas son hibridación en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1 % a 55 °C. Otro ejemplo de condiciones de hibridación restrictivas es hibridación en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1 % a 60 °C. A menudo, las condiciones de hibridación restrictivas son hibridación en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C. Más a menudo, las condiciones de restricción son fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7 % a 65 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 1 % a 65 °C. Las temperaturas de hibridación restrictivas también se pueden alterar (es decir, reducir) con la adición de determinados disolventes orgánicos, formamida por ejemplo. Los disolventes orgánicos, como formamida, reducen la estabilidad térmica de los polinucleótidos bicatenarios, de modo que la hibridación se puede llevar a cabo a temperaturas más bajas; manteniendo al mismo tiempo las condiciones restrictivas y extendiendo la vida útil de los ácidos nucleicos que puede ser termolábiles.

Como se usa en el presente documento, la expresión "hibridación" o variaciones gramaticales de la misma, se refiere a la unión de una primera molécula de ácido nucleico a una segunda molécula de ácido nucleico en condiciones de restricción bajas, medias o altas, o en condiciones de síntesis de ácidos nucleicos. La hibridación puede incluir casos en los que una primera molécula de ácido nucleico se une a una segunda molécula de ácido

nucleico, en los que la primera y segunda moléculas de ácido nucleico son complementarias. Como se usa en el presente documento, "se hibrida específicamente" se refiere a la hibridación preferente en condiciones de síntesis de ácidos nucleicos de un cebador, a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria con el cebador en comparación con la hibridación a una molécula de ácido nucleico que no tiene una secuencia complementaria. Por ejemplo, la hibridación específica incluye la hibridación de un cebador a una secuencia de ácido nucleico diana que es complementaria con el cebador.

En algunos modos de realización, los cebadores pueden incluir una subsecuencia de nucleótidos que puede ser complementaria a una secuencia de hibridación de cebador y ácido nucleico en fase sólida o sustancialmente complementaria a una secuencia de hibridación de cebador y ácido nucleico en fase sólida (por ejemplo, idéntica aproximadamente en un 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de un 99 % a la secuencia de hibridación de cebador complementaria cuando se alinean). Un cebador puede contener una subsecuencia de nucleótidos no complementaria a o no sustancialmente complementaria a una secuencia de hibridación de cebador y ácido nucleico en fase sólida (por ejemplo, en el extremo 3' o 5' de la subsecuencia de nucleótidos en el cebador complementaria a o sustancialmente complementaria a la secuencia de hibridación de cebador en fase sólida).

Un cebador, en determinados modos de realización, puede contener una modificación tal como inosinas, sitios abásicos, ácidos nucleicos bloqueados, ligandos del surco menor, estabilizantes dobles (por ejemplo, acridina, espermidina), modificadores de Tm o cualquier modificador que cambia las propiedades de unión de los cebadores o sondas.

Un cebador, en determinados modos de realización, puede contener una molécula o entidad detectable (por ejemplo, un fluoróforo, radioisótopo, agente colorimétrico, partícula, enzima y similares). Cuando se desee, el ácido nucleico se puede modificar para incluir un marcador detectable usando cualquier procedimiento conocido para un experto en la técnica. El marcador se puede incorporar como parte de la síntesis, o añadir antes de usar el cebador en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. La incorporación del marcador se puede realizar en fase líquida o bien en fase sólida. En algunos modos de realización, el marcador detectable puede ser útil para la detección de dianas. En algunos modos de realización, el marcador detectable puede ser útil para la cuantificación de ácidos nucleicos diana (por ejemplo, determinando el número de copias de una secuencia o especie particular de ácido nucleico). Cualquier marcador detectable adecuado para la detección de una interacción o actividad biológica en un sistema se puede seleccionar y utilizar de forma apropiada por el experto. Los ejemplos de marcadores detectables son marcadores fluorescentes tales como fluoresceína, rodamina y otros (por ejemplo, Anantha, *et al.*, *Biochemistry* (1998) 37:2709 2714; y Qu & Chaires, *Methods Enzymol.* (2000) 321:353 388); isótopos radioactivos (por ejemplo, 125I, 131I, 35S, 31P, 32P, 33P, 14C, 3H, 7Be, 28Mg, 57Co, 65Zn, 67Cu, 68Ge, 82Sr, 83Rb, 95Tc, 96Tc, 103Pd, 109Cd y 127Xe); marcadores de dispersión de luz (por ejemplo, la patente de los EE. UU. n.º 6.214.560, y comercialmente disponible de Genicon Sciences Corporation, CA); marcadores quimioluminiscentes y sustratos enzimáticos (por ejemplo, dioxetanos y ésteres de acridinio), marcadores enzimáticos o proteínicos (por ejemplo, proteína verde fluorescente (GFP) o variante de color de la misma, luciferasa, peroxidasa); otros marcadores cromogénicos o tintes (por ejemplo, cianina), y otros cofactores o biomoléculas tales como digoxigenina, estreptavidina, biotina (por ejemplo, miembros de un par de unión tal como biotina y avidina, por ejemplo), restos de captura de afinidad y similares. En algunos modos de realización, un cebador se puede marcar con un resto de captura de afinidad. También se incluyen en los marcadores detectables los marcadores útiles para la modificación de masas para la detección con espectrometría de masas (por ejemplo, espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) y espectrometría de masas con electropulverización (ES)).

Un cebador también se puede referir a una secuencia de polinucleótidos que se hibrida con una subsecuencia de un ácido nucleico diana u otro cebador y facilita la detección de un cebador, un ácido nucleico diana o ambos, como con balizas moleculares, por ejemplo. El término "baliza molecular" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula detectable, en la que la propiedad detectable de la molécula es detectable sólo en determinadas condiciones específicas, permitiendo de este modo funcionar como una señal específica e informativa. Los ejemplos no limitantes de propiedades detectables son, propiedades ópticas, propiedades eléctricas, propiedades magnéticas, propiedades químicas y el tiempo o la velocidad a través de una abertura de tamaño conocido.

En algunos modos de realización, una baliza molecular puede ser un oligonucleótido monocatenario que puede formar una estructura tallo-lazo, en la que la secuencia del lazo puede ser complementaria a una secuencia de ácido nucleico diana de interés y se flanquea por brazos complementarios cortos que pueden formar un tallo. Los oligonucleótidos se pueden marcar en un extremo con un fluoróforo y en el otro extremo con una molécula desactivadora. En la conformación tallo-lazo, la energía del fluoróforo excitado se transfiere al desactivador, a través de un acoplamiento dipolo-dipolo de largo alcance similar al observado en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, o FRET, y se libera como calor en lugar de luz. Cuando la secuencia del lazo se hibrida con una secuencia diana específica, los dos extremos de la molécula se separan y la energía del fluoróforo excitado se emite como la luz, generando una señal detectable. Las balizas moleculares ofrecen la ventaja añadida de que la retirada del exceso de sonda es innecesaria debido a la naturaleza autodesactivadora de la sonda no hibridada. En algunos modos de realización, las sondas de balizas moleculares se pueden diseñar para discriminar o bien tolerar emparejamientos erróneos entre las secuencias del lazo y las diana modulando la fuerza relativa de la hibridación lazo-diana y la formación del tallo. Como se refiere en el presente documento, el término "nucleótido con

emparejamiento erróneo" o un "emparejamiento erróneo" se refiere a un nucleótido que no es complementario a la secuencia diana en esa posición o posiciones. Una sonda puede tener al menos un emparejamiento erróneo, pero también puede tener 2, 3, 4, 5, 6 o 7 o más nucleótidos con emparejamiento erróneo.

Detección

5 Las especies de secuencias de nucleótidos o las especies de ácidos nucleicos amplificados o productos detectables preparados a partir de lo anterior, se pueden detectar por un procedimiento de detección adecuado. Los ejemplos no limitantes de procedimientos de detección, cuantificación, secuenciación y similares incluyen detección de masas de amplicones con masa modificada (por ejemplo, espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) y espectrometría de masas con electropulverización (ES)), un procedimiento de extensión de cebadores (por ejemplo, iPLEX™; Sequenom, Inc.), secuenciación de ADN directa, tecnología de sonda de inversión molecular (MIP) de Affymetrix, polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (análisis AFLP), análisis de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO), PCR específica de metilación (MSPCR), análisis de pirosecuenciación, análisis AcycloPrime, inmunotransferencia por puntos inversa, micromatrices GeneChip, hibridación específica de alelo dinámica (DASH), sondas de ácido nucleico peptídico (APN) y ácidos nucleicos bloqueados (ANB), TaqMan, balizas moleculares, tintes de intercalación, cebadores FRET, AlphaScreen, SNPstream, análisis genético de bits (GBA), minisequenciación múltiple, SNaPshot, ensayo GOOD, miniseq. de micromatrices, extensión de cebadores agrupado (APEX), extensión de cebadores en micromatrices, matrices Tag, microesferas codificadas, incorporación dirigida al molde (TDI), polarización fluorescente, ensayo de unión oligonucleotídica colorimétrica (OLA), OLA codificado por secuencia, unión de micromatrices, reacción en cadena de la ligasa, sondas Padlock, ensayo Invader, hibridación usando al menos una sonda, hibridación usando al menos una sonda marcada de forma fluorescente, clonación y secuenciación, electroforesis, el uso de sondas de hibridación y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (QRT-PCR), PCR digital, secuenciación de nanoporos, chips y combinaciones de los mismos. La detección y cuantificación de alelos o parálogos se puede llevar a cabo usando los procedimientos de "tubo cerrado" descritos en la patente de los EE. UU. n.º 11/950.395, que se presentó el 4 de diciembre de 2007. En algunos modos de realización, la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado se determina por espectrometría de masas, extensión del cebadores, secuenciación (por ejemplo, cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo nanoporos o pirosecuenciación), PCR cuantitativa (Q-PCR o QRT-PCR), PCR digital, combinaciones de las mismas, y similares.

30 Un ácido nucleico diana se puede detectar detectando un marcador detectable o "resto generador de señal" en algunos modos de realización. El término "generador de señal" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier átomo o molécula que puede proporcionar un efecto detectable o cuantificable, y que se puede unir a un ácido nucleico. En determinados modos de realización, un marcador detectable genera una única señal lumínica, una señal fluorescente, una señal luminiscente, una propiedad eléctrica, una propiedad química, una propiedad magnética y similares.

35 Los marcadores detectables incluyen, pero no se limitan a, nucleótidos (marcados o no marcados), compómeros, azúcares, péptidos, proteínas, anticuerpos, compuestos químicos, polímeros conductores, restos de unión tales como biotina, marcas de masas, agentes colorimétricos, agentes emisores de luz, agentes quimioluminiscentes, agentes de dispersión de luz, marcas fluorescentes, marcas radiactivas, marcas de carga (eléctrica o magnética) marcas volátiles y marcas hidrófobas, biomoléculas (por ejemplo, miembros de un par de unión anticuerpo/antígeno, anticuerpo/anticuerpo, anticuerpo/fragmento de anticuerpo, anticuerpo/receptor de anticuerpo, anticuerpo/proteína A o proteína G, hapteno/antihapteno, biotina/avidina, biotina/estreptavidina, ácido fólico/proteína de unión a folato, vitamina B12/factor intrínseco, grupo reactivo químico/grupo reactivo químico complementario (por ejemplo, sulfhidrilo/maleimida, sulfhidrilo/derivado haloacetilo, amina/isotriocianato, amina/éster de succinimidilo, y amina/haluros de sulfonilo) y similares, de los que algunos se describen adicionalmente a continuación. En algunos modos de realización, una sonda puede contener un resto generador de señal que se hibrida a una diana y altera el paso del ácido nucleico diana a través de un nanoporos, y puede generar una señal cuando se libera del ácido nucleico diana cuando pasa a través del nanoporos (por ejemplo, altera la velocidad o el tiempo a través de un poro de tamaño conocido).

50 En determinados modos de realización, se introducen marcas de muestra para distinguir entre muestras (por ejemplo, de diferentes pacientes), permitiendo de este modo las pruebas simultáneas de múltiples muestras. Por ejemplo, se pueden introducir marcas de muestra como parte de los cebadores extendidos de modo que los cebadores extendidos se pueden asociar con una muestra particular.

55 Una solución que contiene amplicones producidos por un procedimiento de amplificación, o una solución que contiene productos de extensión producidos por un procedimiento de extensión, se puede someter a procesamiento adicional. Por ejemplo, una solución se puede poner en contacto con un agente que retira los restos fosfato de nucleótidos libres que no se han incorporado en un amplicón o producto de extensión. Un ejemplo de un agente de este tipo es una fosfatasa (por ejemplo, fosfatasa alcalina). Los amplicones y los productos de extensión también se pueden asociar con una fase sólida, se pueden lavar, se pueden poner en contacto con un agente que retira un fosfato terminal (por ejemplo, exposición a una fosfatasa), se pueden poner en contacto con un agente que retira un nucleótido terminal (por ejemplo, exonucleasa), se puede poner en contacto con un agente que escinde (por ejemplo, endonucleasa, ribonucleasa), y similares.

El término "soporte sólido" o "fase sólida" como se usa en el presente documento se refiere a un material insoluble con el que se puede asociar el ácido nucleico. Los ejemplos de soportes sólidos para su uso con procedimientos descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, matrices, perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas, perlas magnéticas, microperlas, nanopérlas) y partículas (por ejemplo, micropartículas, nanopartículas). Se pueden utilizar partículas o perlas que tienen un diámetro nominal, promedio o medio de aproximadamente 1 nanómetro a aproximadamente 500 micrómetros, tales como las que tienen un diámetro nominal, medio o promedio, por ejemplo, de aproximadamente 10 nanómetros a aproximadamente 100 micrómetros; de aproximadamente 100 nanómetros a aproximadamente 100 micrómetros; de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 100 micrómetros; de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 50 micrómetros; de aproximadamente 1, 5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o 900 nanómetros; o de aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500 micrómetros.

Un soporte sólido puede comprender virtualmente cualquier insolubles o material insoluble o sólido, y a menudo se selecciona una composición de soporte sólido que sea insoluble en agua. Por ejemplo, un soporte sólido puede comprender o consistir esencialmente en gel de sílice, vidrio (por ejemplo vidrio de poro controlado (CPG)), nailon, Sephadex®, Sepharose®, celulosa, una superficie metálica (por ejemplo acero, oro, plata, aluminio, silicio y cobre), un material magnético, un material plástico (por ejemplo, polietileno, polipropileno, poliamida, poliéster, difluoruro de polivinilideno (PVDF)) y similares. Las perlas o partículas pueden ser hinchables (por ejemplo, perlas poliméricas tales como resina Wang) o no hinchables (por ejemplo, CPG). Los ejemplos comercialmente disponibles de perlas incluyen, sin limitación, resina Wang, resina Merrifield y Dynabeads® y SoluLink.

Se puede proporcionar un soporte sólido de una colección de soportes sólidos. Una colección de soportes sólidos comprende dos o más especies de soportes sólidos diferentes. El término "especie de soporte sólido" como se usa en el presente documento se refiere a un soporte sólido junto con una especie de ácido nucleico en fase sólida particular o una combinación particular de especies de ácidos nucleicos en fase sólida diferentes. En determinados modos de realización, una colección de soportes sólidos comprende de 2 a 10.000 especies de soportes sólidos, de 10 a 1.000 especies de soportes sólidos o aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o 10000 especies de soportes sólidos únicas. Los soportes sólidos (por ejemplo, perlas) en la colección de soportes sólidos pueden ser homogéneos (por ejemplo, todas son perlas de resina Wang) o heterogéneos (por ejemplo, algunos son perlas de resina Wang y algunos son perlas magnéticas). Cada especie de soporte sólido en una colección de soportes sólidos a veces se marca con una marca de identificación específica. Una marca de identificación para una especie de soporte sólido particular a veces es un ácido nucleico (por ejemplo, "ácido nucleico en fase sólida") que tiene una secuencia única en determinados modos de realización. Una marca de identificación puede ser cualquier molécula que sea detectable y distinguible de las marcas de identificación en otras especies de soportes sólidos.

Las especies de secuencias de nucleótidos, especies de ácidos nucleicos amplificados, o productos detectables generados a partir de las anteriores se pueden someter a análisis de secuencia. El término "análisis de secuencia" como se usa en el presente documento se refiere a la determinación de una secuencia de nucleótidos de un producto de amplificación. Se puede determinar la secuencia completa o una secuencia parcial de un producto de amplificación, y la secuencia de nucleótidos determinada se denomina en el presente documento una "lectura". Por ejemplo, los productos de amplificación lineal se pueden analizar directamente sin amplificación adicional en algunos modos de realización (por ejemplo, usando una metodología de secuenciación de una sola molécula (descrito con mayor detalle a continuación en el presente documento)). En determinados modos de realización, los productos de amplificación lineal se pueden someter a amplificación adicional y a continuación analizarse (por ejemplo, usando metodología de secuenciación por unión o pirosecuenciación (descrito con mayor detalle a continuación en el presente documento)). Las lecturas se pueden someter a diferentes tipos de análisis de secuencia. Se puede utilizar cualquier procedimiento de secuenciación adecuado para detectar, y determinar la cantidad de, especies de secuencias de nucleótidos, especies de ácidos nucleicos amplificados, o productos detectables generados a partir de las anteriores. En un modo de realización, una muestra heterogénea se somete a secuenciación selectiva (o secuenciación selectiva parcial) en la que se secuencian uno o más conjuntos de especies de ácidos nucleicos, y se determina la cantidad de cada especie de ácido nucleico secuenciada en el conjunto, de este modo se identifica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en base a la cantidad de la especie de ácido nucleico secuenciada. Los ejemplos de determinados procedimientos de secuenciación se describen más adelante.

Los términos "aparato de análisis de secuencia" y "componente(s) de análisis de secuencia" usados en el presente documento se refieren a aparato, y uno o más componentes usados junto con dicho aparato, que se pueden usar por un experto para determinar una secuencia de nucleótidos de productos de amplificación que resultan de los procedimientos descritos en el presente documento (por ejemplo, productos de amplificación lineal y/o exponencial). Los ejemplos de plataformas de secuenciación incluyen, sin limitación, la plataforma 454 (Roche) (Margulies, M. *et al.* 2005 Nature 437, 376-380), analizador genómico Illumina (o plataforma Solexa) o sistema SOLID (Applied Biosystems) o la tecnología de secuenciación de ADN de una sola molécula Helicos True (Harris TD *et al.* 2008 Science, 320,106-109), la tecnología en tiempo real de una sola molécula (SMRTTM) de Pacific Biosciences, y secuenciación de nanoporos (Soni GV y Meller A. 2007 Clin Chem 53: 1996-2001). Dichas plataformas permiten la secuenciación de muchas moléculas de ácidos nucleicos aisladas a partir de un espécimen en órdenes altos de

multiplexación de manera paralela (Dear Brief Funct Genomic Proteomic 2003; 1: 397-416). Cada una de estas plataformas permiten la secuenciación de moléculas individuales clonalmente expandidas o no amplificadas de fragmentos de ácido nucleico. Determinadas plataformas implican, por ejemplo, (i) secuenciación por unión de sondas modificadas con tinte (incluyendo unión cíclica y escisión), (ii) pirosecuenciación, y (iii) secuenciación de una sola molécula. Las especies de secuencias de nucleótidos, especies de ácidos nucleicos de amplificación y productos detectables generado a partir de las mismas se pueden considerar un "ácido nucleico de estudio" para los propósitos de analizar una secuencia de nucleótidos por dichas plataformas de análisis de secuencia.

La secuenciación por unión es un procedimiento de secuenciación de ácidos nucleicos que se basa en la sensibilidad de la ADN ligasa de ADN para el emparejamiento de bases con emparejamiento erróneo. La ADN ligasa se une entre sí los extremos de ADN con bases emparejadas correctamente. La combinación de la capacidad de la ADN ligasa para unir entre sí sólo los extremos de ADN con bases emparejadas correctamente, con grupos mezclados de oligonucleótidos o cebadores marcados de forma fluorescente, permite la determinación de la secuencia por detección de fluorescencia. Se pueden obtener lecturas de secuencias más largas incluyendo cebadores que contienen enlaces escindibles que se pueden escindir después de la identificación del marcador. La escisión en el enlazador retira el marcador y regenera el fosfato 5' en el extremo del cebador unido, preparando el cebador para otra tanda de unión. En algunos modos de realización, los cebadores se pueden marcar con más de un marcador fluorescente (por ejemplo, 1 marcador fluorescente, 2, 3 o 4 marcadores fluorescentes).

Un ejemplo de un sistema que se puede usar por un experto basado en la secuenciación por unión, en general, implica las siguientes etapas. Se pueden preparar poblaciones de perlas clonales microrreactores de emulsión que contienen el ácido nucleico de estudio ("molde"), componentes de reacción de amplificación, perlas y cebadores. Después de la amplificación, se desnaturalizan los moldes y se realiza el enriquecimiento de las perlas para separar las perlas con moldes extendidos de las perlas no deseadas (por ejemplo, perlas sin moldes extendidos). El molde en las perlas seleccionadas se somete a una modificación en 3' para permitir la unión covalente al portaobjetos, y las perlas modificadas se pueden depositar sobre un portaobjetos de vidrio. Las cámaras de depósito ofrecen la capacidad de segmentar un portaobjetos en una, cuatro u ocho cámaras durante el procedimiento de carga de perlas. Para el análisis de secuencia, los cebadores se hibridan a la secuencia adaptadora. Un conjunto de cuatro sondas marcadas con tinte de color compite por la unión con el cebador de secuenciación. La especificidad de unión a la sonda se logra interrogando cada 4ª y 5ª base durante la serie de unión. De cinco a siete tandas de unión, detección y escisión registran el color en cada 5ª posición, con el número de tandas determinado por el tipo de colección usado. Después de cada tanda de unión, se fija un nuevo desplazamiento de cebador complementario en una base en la dirección 5' para otra serie de uniones. Las tandas de reinicio y unión de cebador (9-11 ciclos de unión por tanda) se repiten secuencialmente cinco veces para generar 25-35 pares de bases de secuencia para una única marca. Con secuenciación con emparejamiento de pares, se repite este procedimiento para una segunda marca. Un sistema de este tipo se puede usar para amplificar exponencialmente los productos de amplificación generados por un procedimiento descrito en el presente documento, por ejemplo, uniendo un ácido nucleico heterólogo al primer producto de amplificación generado por un procedimiento descrito en el presente documento y realizando la amplificación por emulsión usando el mismo soporte sólido o uno diferente usado originalmente para generar el primer producto de amplificación. Un sistema de este tipo también se puede usar para analizar los productos de amplificación generados directamente por un procedimiento descrito en el presente documento evitando un procedimiento de amplificación exponencial y clasificando directamente los soportes sólidos descritos en el presente documento en el portaobjetos de vidrio.

La pirosecuenciación es un procedimiento de secuenciación de ácidos nucleicos basado en la secuenciación por síntesis, que se basa en la detección de un pirofosfato liberado en la incorporación de nucleótidos. En general, la secuenciación por síntesis implica sintetizar, un nucleótido cada vez, una hebra de ADN complementaria a la hebra cuya secuencia se busca. Los ácidos nucleicos de estudio se pueden inmovilizar en un soporte sólido, hibridar con un cebador de secuenciación, incubar con ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Las soluciones de nucleótidos se añaden secuencialmente y se retiran. La correcta incorporación de un nucleótido libera un pirofosfato, que interacciona con la ATP sulfurilasa y produce ATP en presencia de adenosina 5' fosfosulfato, abastecimiento la reacción de luciferina, lo que produce una señal quimioluminiscente permitiendo la determinación de secuencia.

Un ejemplo de un sistema que se puede usar por un experto basado en la pirosecuenciación, en general, implica las siguientes etapas: unir un ácido nucleico adaptador a un ácido nucleico de estudio e hibridar el ácido nucleico de estudio a una perla; amplificar una secuencia de nucleótidos en el ácido nucleico de estudio en una emulsión; clasificar las perlas usando un soporte sólido multipocillo de picolitros; y secuenciar las secuencias de nucleótidos amplificados por metodología de pirosecuenciación (por ejemplo, Nakano *et al.*, "Single-molecule PCR using water-in-oil emulsion;" Journal of Biotechnology 102: 117-124 (2003)). Un sistema de este tipo se puede usar para amplificar exponencialmente los productos de amplificación generados por un procedimiento descrito en el presente documento, por ejemplo, uniendo un ácido nucleico heterólogo al primer producto de amplificación generado por un procedimiento descrito en el presente documento.

Determinados modos de realización de secuenciación de una sola molécula se basan en el principio de secuenciación por síntesis, y utilizan la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia de un único par (FRET de único par) como mecanismo por el que se emiten fotones como resultado de una incorporación de

nucleótidos exitosa. Los fotones emitidos a menudo se detectan usando dispositivos de acoplamiento de carga enfriada intensifica o de sensibilidad alta junto con microscopía de reflexión interna total (TIRM). Los fotones sólo se emiten cuando la solución de reacción introducida contiene el nucleótido correcto para la incorporación en la cadena de ácido nucleico creciente que se sintetiza como resultado del procedimiento de secuenciación. En la secuenciación de una sola molécula basada en FRET, se transfiere energía entre dos tintes fluorescentes, a veces tintes de polimetina cianina Cy3 y Cy5, a través de interacciones dipolo de largo alcance. El dador se excita a su longitud de onda de excitación específica y se transfiere la energía del estado excitado, de forma no radioactiva al tinte aceptor, que a su vez se queda excitado. El tinte aceptor finalmente vuelve al suelo al estado fundamental por emisión radioactiva de un fotón. Los dos tintes usados en el procedimiento de transferencia de energía representan el "único par", en la FRET de único par. A menudo se usa Cy3 a como fluoróforo dador y a menudo se incorpora como el primer nucleótido marcado. A menudo se usa Cy5 como fluoróforo aceptor y se usa como marcador de nucleótidos para sucesivas adiciones de nucleótidos después de la incorporación de un primer nucleótido marcado con Cy3. En general, los fluoróforos están dentro de los 10 nanómetros de cada para que se produzca la transferencia de energía con éxito.

Un ejemplo de un sistema que se puede usar basado en la secuenciación de una sola molécula en general implica hibridar un cebador a un ácido nucleico de estudio para generar un complejo; asociar el complejo con una fase sólida; extender de forma iterativa el cebador por un nucleótido marcado con una molécula fluorescente; y capturar una imagen de las señales de transferencia de energía de resonancia por fluorescencia después de cada iteración (por ejemplo, patente de los EE. UU. n.º 7.169.314; Braslavsky *et al.*, PNAS 100(7): 3960-3964 (2003)). Un sistema de este tipo se puede usar para secuenciar directamente los productos de amplificación generados por los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, el producto de amplificación lineal liberado se puede hibridar a un cebador que contiene secuencias complementarias a las secuencias de captura inmovilizadas presentes en un soporte sólido, una perla o portaobjetos de vidrio por ejemplo. La hibridación de los complejos del producto de amplificación lineal liberado-cebador con las secuencias de captura inmovilizadas, inmoviliza los productos de amplificación lineal liberados en los soportes sólidos para la secuenciación basada en FRET de único par por síntesis. A menudo, el cebador es fluorescente, de modo que se puede generar una imagen de referencia inicial de la superficie del portaobjetos con los ácidos nucleicos inmovilizados. La imagen de referencia inicial es útil para determinar las posiciones en las que se produce la incorporación de nucleótidos verdadera. Las señales de fluorescencia detectadas en las posiciones de la matriz no identificadas inicialmente en la imagen de referencia "sólo de cebador" se descartan como fluorescencia no específica. Después de la inmovilización de los complejos del producto de amplificación lineal liberado-cebador, los ácidos nucleicos unidos a menudo se secuencian en paralelo por las etapas iterativas de, a) extensión de la polimerasa en presencia de un nucleótido marcado fluorescentemente, b) detección de fluorescencia usando microscopía apropiada, TIRM por ejemplo, c) retirada del nucleótido fluorescente, y d) vuelta a la etapa a con un nucleótido marcado fluorescentemente diferente.

En algunos modos de realización, la secuenciación de nucleótidos puede ser por procedimientos o procesos de secuencias de nucleótidos individuales en fase sólida. Los procedimientos de secuenciación de nucleótidos individuales en fase sólida implican poner en contacto un ácido nucleico de muestra y un soporte sólido en condiciones en las que una única molécula de ácido nucleico de muestra se hibrida con una única molécula de un soporte sólido. Dichas afecciones pueden incluir proporcionar las moléculas de soporte sólido y una única molécula de ácido nucleico de muestra en un "microrreactor". Dichas condiciones también pueden incluir proporcionar una mezcla en la que la molécula de ácido nucleico de muestra se puede hibridar a un ácido nucleico en fase sólida en el soporte sólido. Los procedimientos de secuenciación de nucleótidos individuales útiles en los modos de realización descritos en el presente documento se describen en la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos con número de serie 61/021.871 presentada el 17 de enero de 2008.

En determinados modos de realización, los procedimientos de detección de secuenciación de nanoporos incluyen (a) poner en contacto un ácido nucleico para la secuenciación ("ácido nucleico base", por ejemplo, molécula de sonda unida) con detectores específicos de secuencia, en condiciones en las que los detectores se hibridan específicamente con subsecuencias sustancialmente complementarias del ácido nucleico base; (b) detectar señales de los detectores y (c) determinar la secuencia del ácido nucleico base de acuerdo con las señales detectadas. En determinados modos de realización, los detectores hibridados al ácido nucleico base se disocian del ácido nucleico base (por ejemplo, se disocian secuencialmente) cuando los detectores interfieren con una estructura de nanoporo a medida que el ácido nucleico base pasa a través de un poro, y se detectan los detectores disociados de la secuencia base. En algunos modos de realización, un detector disociado de un ácido nucleico base emite una señal detectable, y el detector hibridado con el ácido nucleico base emite una señal detectable diferente o ninguna señal detectable. En determinados modos de realización, los nucleótidos en un ácido nucleico (por ejemplo, molécula de sonda enlazada) se sustituyen con secuencias de nucleótidos específicas correspondientes a nucleótidos específicos ("representantes nucleotídicos"), dando lugar de este modo a un ácido nucleico expandido (por ejemplo, patente de los EE. UU. n.º 6.723.513), y los detectores se hibridan a los representantes nucleotídicos en el ácido nucleico expandido, que sirve como ácido nucleico base. En dichos modos de realización, los representantes nucleotídicos pueden estar dispuestos en una disposición binaria o de otro orden mayor (por ejemplo, Soni y Meller, *Clinical Chemistry* 53(11): 1996-2001 (2007)). En algunos modos de realización, un ácido nucleico no se expande, no da lugar a un ácido nucleico expandido, y sirve directamente un ácido nucleico base (por ejemplo, una molécula de sonda enlazada sirve como ácido nucleico base no expandido), y los detectores se ponen en contacto directamente

con el ácido nucleico base. Por ejemplo, un primer detector se puede hibridar a una primera subsecuencia y un segundo detector se puede hibridar a una segunda subsecuencia, donde el primer detector y el segundo detector tienen cada uno marcadores detectables que se pueden distinguir entre sí, y donde las señales del primer detector y segundo detector se pueden distinguir entre sí cuando los detectores se disocian del ácido nucleico base. En determinados modos de realización, los detectores incluyen una región que se hibrida con el ácido nucleico base (por ejemplo, dos regiones), que puede ser de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud (por ejemplo, de aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 nucleótidos de longitud). Un detector también puede incluir una o más regiones de nucleótidos que no se hibridan al ácido nucleico base. En algunos modos de realización, un detector es un baliza molecular. Un detector a menudo comprende uno o más marcadores detectables seleccionados independientemente de los descritos en el presente documento. Cada marcador detectable se puede detectar por cualquier procedimiento de detección conveniente que puede detectar una señal generada por cada marcador (por ejemplo, magnética, eléctrica, química, óptica y similares). Por ejemplo, se puede usar una cámara CD para detectar señales de uno o más puntos cuánticos distinguibles enlazados a un detector.

En determinados modos de realización de análisis de secuencia, se pueden usar lecturas para construir una secuencia de nucleótidos más grande, que se puede facilitar identificando secuencias superpuestas en diferentes lecturas y usando las secuencias de identificación en las lecturas. Dichos procedimientos de análisis de secuencia y los programas informáticos para construir secuencias más grandes a partir de lecturas son conocidos por el experto en la técnica (por ejemplo, Venter *et al.*, Science 291: 1304-1351 (2001)). Las lecturas específicas, construcciones de secuencias de nucleótidos parciales y construcciones de secuencias de nucleótidos completas se pueden comparar entre secuencias de nucleótidos dentro de un ácido nucleico de muestra (es decir, comparación interna) o se pueden comparar con una secuencia de referencia (es decir, comparación de referencia) en determinados modos de realización de análisis de secuencia. A veces las comparaciones internas se realizan en situaciones en las que se prepara un ácido nucleico de muestra a partir de múltiples muestras o a partir de una única fuente de muestra que contiene variaciones de secuencia. A veces las comparaciones de referencia se realizan cuando se conoce una secuencia de nucleótidos de referencia y un objetivo es el de determinar si el ácido nucleico de muestra contiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente similar a o la misma que, o diferente de, una secuencia de nucleótidos de referencia. El análisis de secuencia se facilita por el aparato y los componentes de análisis de secuencia conocidos por el experto en la técnica.

La espectrometría de masas es un procedimiento particularmente eficaz para la detección de ácidos nucleicos (por ejemplo, amplicón de PCR, producto de extensión de cebador, sonda de detector escindida de un ácido nucleico diana). La presencia de un ácido nucleico diana se verifica comparando la masa de la señal detectada con la masa esperada del ácido nucleico diana. La fuerza de la señal relativa, por ejemplo, máximo de masa en un espectro, para un ácido nucleico diana particular indica la población relativa del ácido nucleico diana entre los otros ácidos nucleicos, permitiendo así el cálculo de una proporción de diana con respecto a otro ácido nucleico o el número de copias directamente de los datos. Para una revisión de los procedimientos de genotipado usando el ensayo iPLEX™ estándar Sequenom® y la tecnología MassARRAY®, véase Jurinke, C., Oeth, P., van den Boom, D., "MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis." Mol. Biotechnol. 26, 147-164 (2004). Para una revisión de la detección y cuantificación del ácido nucleico diana usando sondas de detector escindibles que se escinden durante el procedimiento de amplificación y se detectan por espectrometría de masas, véase la solicitud de patente de los EE. UU. número 11/950.395, que se presentó el 4 de diciembre de 2007. Dichos enfoques se pueden adaptar a la detección de anomalías cromosómicas por los procedimientos descritos en el presente documento.

En algunos modos de realización, la especie de ácido nucleico amplificado se puede detectar (a) poniendo en contacto la especie de ácido nucleico amplificado (por ejemplo, amplicones) con cebadores de extensión (por ejemplo, cebadores de detección o detectores), (b) preparando cebadores de extensión extendidos, y (c) determinando la cantidad relativa del uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo (por ejemplo, SNP que existen entre secuencias parálogas) analizando los cebadores de detección extendidos (por ejemplo, cebadores de extensión). En determinados modos de realización, uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo se pueden analizar por espectrometría de masas. En algunos modos de realización, la amplificación, usando procedimientos descritos en el presente documento, puede generar entre aproximadamente 1 a aproximadamente 100 conjuntos de amplicones, de aproximadamente 2 a aproximadamente 80 conjuntos de amplicones, de aproximadamente 4 a aproximadamente 60 conjuntos de amplicones, de aproximadamente 6 a aproximadamente 40 conjuntos de amplicones, y de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 conjuntos de amplicones (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o aproximadamente 100 conjuntos de amplicones).

Un ejemplo que usa espectrometría de masas para la detección de conjuntos de amplicones se presenta en el presente documento. Se pueden poner en contacto los amplicones (en solución o en fase sólida) con un conjunto de oligonucleótidos (los mismos cebadores usados para la amplificación o diferentes cebadores representativos de subsecuencias en el cebador o ácido nucleico diana) en condiciones de hibridación, en las que: (1) cada oligonucleótido en el conjunto comprende una secuencia de hibridación que puede hibridarse a un amplicón en las condiciones de hibridación cuando el amplicón está presente en la solución, (2) cada oligonucleótido en el conjunto comprende una marca distinguible situada en dirección 5' de la secuencia de hibridación, (3) una característica de la marca distinguible de un oligonucleótido difiere de forma detectable de las características de las marcas distinguibles

de otros oligonucleótidos en el conjunto; y (4) cada marca distinguible corresponde específicamente a un amplicón específico y, de este modo corresponde específicamente a un ácido nucleico diana específico. El amplicón hibridado y el cebador de "detección" se someten a condiciones de síntesis de nucleótidos que permiten la extensión del cebador de detección por uno o más nucleótidos (marcados con una entidad o resto detectable, o no marcados), donde uno del uno o más nucleótidos puede ser un nucleótido de terminación. En algunos modos de realización, uno o más de los nucleótidos añadidos al cebador puede comprender un agente de captura. En modos de realización en los que la hibridación se produjo en solución, la captura del cebador/amplicón en un soporte sólido puede ser deseable. Los restos o entidades detectables se pueden liberar del cebador de detección extendido, y la detección del resto determina la presencia, ausencia o número de copias de la secuencia de nucleótidos de interés. En determinados modos de realización, la extensión se puede realizar una vez que se proporcione un oligonucleótido extendido. En algunos modos de realización, la extensión se puede realizar múltiples veces (por ejemplo, en condiciones de amplificación) proporcionando múltiples copias del oligonucleótido extendido. En algunos modos de realización, la realización de la extensión múltiples veces puede producir un número suficiente de copias de modo que la interpretación de las señales, que representan el número de copias de una secuencia particular, se puede realizar con un nivel de confianza de un 95 % o más (por ejemplo, un nivel de confianza de un 95 % o más, 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más, 99 % o más, o un nivel de confianza de un 99,5 % o más).

Los procedimientos proporcionados en el presente documento permiten la detección de alto rendimiento de especies de ácidos nucleicos en una pluralidad de ácidos nucleicos (por ejemplo, especies de secuencias de nucleótidos, especies de ácidos nucleicos amplificados y productos detectables generados a partir de las anteriores). Multiplexación se refiere a la detección simultánea de más de una especie de ácido nucleico. Los procedimientos generales para realizar reacciones multiplexadas junto con espectrometría de masas, son conocidos (véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. n.º 6.043.031, 5.547.835 y la solicitud PCT internacional n.º WO 97/37041). La multiplexación proporciona una ventaja de que se pueden identificar una pluralidad de especies de ácidos nucleicos (por ejemplo, algunos que tienen variaciones de secuencia diferentes) en tan solo un único espectro de masas, en comparación con tener que realizar un análisis de espectrometría de masas separado para cada especie de ácido nucleico diana individual. Los procedimientos proporcionados en el presente documento se prestan a procedimientos altamente automatizados de alto rendimiento para analizar variaciones de secuencia con alta velocidad y exactitud, en algunos modos de realización. En algunos modos de realización, los procedimientos en el presente documento se pueden multiplexar a niveles altos en una única reacción.

En determinados modos de realización, el número de especies de ácido nucleico multiplexadas incluyen, sin limitación, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 (por ejemplo, aproximadamente 1-3, 3-5, 5-7, 7-9, 9-11, 11-13, 13-15, 15-17, 17-19, 19-21, 21-23, 23-25, 25-27, 27-29, 29-31, 31-33, 33-35, 35-37, 37-39, 39-41, 41-43, 43-45, 45-47, 47-49, 49-51, 51-53, 53-55, 55-57, 57-59, 59-61, 61-63, 63-65, 65-67, 67-69, 69-71, 71-73, 73-75, 75-77, 77-79, 79-81, 81-83, 83-85, 85-87, 87-89, 89-91, 91-93, 93-95, 95-97, 97-101, 101-103, 103-105, 105-107, 107-109, 109-111, 111-113, 113-115, 115-117, 117-119, 121-123, 123-125, 125-127, 127-129, 129-131, 131-133, 133-135, 135-137, 137-139, 139-141, 141-143, 143-145, 145-147, 147-149, 149-151, 151-153, 153-155, 155-157, 157-159, 159-161, 161-163, 163-165, 165-167, 167-169, 169-171, 171-173, 173-175, 175-177, 177-179, 179-181, 181-183, 183-185, 185-187, 187-189, 189-191, 191-193, 193-195, 195-197, 197-199, 199-201, 201-203, 203-205, 205-207, 207-209, 209-211, 211-213, 213-215, 215-217, 217-219, 219-221, 221-223, 223-225, 225-227, 227-229, 229-231, 231-233, 233-235, 235-237, 237-239, 239-241, 241-243, 243-245, 245-247, 247-249, 249-251, 251-253, 253-255, 255-257, 257-259, 259-261, 261-263, 263-265, 265-267, 267-269, 269-271, 271-273, 273-275, 275-277, 277-279, 279-281, 281-283, 283-285, 285-287, 287-289, 289-291, 291-293, 293-295, 295-297, 297-299, 299-301, 301-303, 303-305, 305-307, 307-309, 309-311, 311-313, 313-315, 315-317, 317-319, 319-321, 321-323, 323-325, 325-327, 327-329, 329-331, 331-333, 333-335, 335-337, 337-339, 339-341, 341-343, 343-345, 345-347, 347-349, 349-351, 351-353, 353-355, 355-357, 357-359, 359-361, 361-363, 363-365, 365-367, 367-369, 369-371, 371-373, 373-375, 375-377, 377-379, 379-381, 381-383, 383-385, 385-387, 387-389, 389-391, 391-393, 393-395, 395-397, 397-401, 401-403, 403-405, 405-407, 407-409, 409-411, 411-413, 413-415, 415-417, 417-419, 419-421, 421-423, 423-425, 425-427, 427-429, 429-431, 431-433, 433-435, 435-437, 437-439, 439-441, 441-443, 443-445, 445-447, 447-449, 449-451, 451-453, 453-455, 455-457, 457-459, 459-461, 461-463, 463-465, 465-467, 467-469, 469-471, 471-473, 473-475, 475-477, 477-479, 479-481, 481-483, 483-485, 485-487, 487-489, 489-491, 491-493, 493-495, 495-497, 497-501).

Los procedimientos de diseño para lograr resolver los espectros de masas con ensayos multiplexados pueden incluir procedimientos de diseño de cebadores y oligonucleótidos y procedimientos de diseño de reacciones. Para el diseño de cebadores y oligonucleótidos en ensayos multiplexados, se aplican las mismas directrices generales para el diseño de cebadores que para reacciones uniplexadas, tales como evitar falsa sensibilización y dímeros de cebadores, sólo que están implicados más cebadores para las reacciones multiplexadas. Para aplicaciones de espectrometría de masas, los máximos de analitos en los espectros de masas para un ensayo se resuelven suficientemente a partir de un producto de cualquier ensayo con el que se multiplexa ese ensayo, incluyendo máximos de pausa y cualquier otro máximo de subproducto. Además, los máximos de analito entran de forma óptima dentro del margen de masas especificado por el usuario, por ejemplo, dentro de un intervalo de 5.000-8.500 Da. En algunos modos de realización, los análisis múltiples se pueden adaptar para la detección por espectrometría de masas de anomalías cromosómicas, por ejemplo. En determinados modos de realización, los análisis múltiples se pueden adaptar a diversos procedimientos de secuenciación basados en nanoporos o

nucleótidos individuales descritos en el presente documento. Se pueden usar cámaras o dispositivos o matrices o chips de microrreacción producidos comercialmente para facilitar el análisis múltiple, y están disponibles comercialmente.

Procesamiento de datos e identificación de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica

El término "detección" de una anomalía cromosómica como se usa en el presente documento se refiere a la identificación de un desequilibrio de cromosomas por el procesamiento de datos que surge de la detección de especies de ácidos nucleicos, especies de secuencias de nucleótidos, o un producto detectable generado a partir de las anteriores (conjuntamente "producto detectable"). Se puede usar cualquier dispositivo y procedimiento de detección adecuados para distinguir uno o más conjuntos de productos detectables, como se trata en el presente documento. Un resultado que se refiere a la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica se puede expresar de cualquier forma adecuada, incluyendo, sin limitación, probabilidad (por ejemplo, cociente de probabilidades, valor p), verosimilitud, porcentaje, valor por encima de un valor umbral, o factor de riesgo, asociado con la presencia de una anomalía cromosómica para un sujeto o muestra. Se puede proporcionar un resultado con uno o más de sensibilidad, especificidad, desviación estándar, coeficiente de variación (CV) y/o nivel de confianza, o combinaciones de los anteriores, en determinados modos de realización.

La detección de una anomalía cromosómica en base a uno o más conjuntos de productos detectables se puede identificar en base a una o más variables calculadas, incluyendo, pero sin limitarse a, sensibilidad, especificidad, desviación estándar, coeficiente de variación (CV), un valor umbral, nivel de confianza, puntuación, probabilidad y/o una combinación de los mismos. En algunos modos de realización, (i) el número de conjuntos para un procedimiento de diagnóstico, y/o (ii) la especie de secuencia de nucleótidos particular de cada conjunto seleccionado para un procedimiento de diagnóstico, se determina en parte o en su totalidad de acuerdo con una o más de dichas variables calculadas.

En determinados modos de realización, uno o más de sensibilidad, especificidad y/o nivel de confianza se expresan como un porcentaje. En algunos modos de realización, el porcentaje, independientemente para cada variable, es mayor de aproximadamente un 90 % (por ejemplo, aproximadamente un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %, o mayor de un 99 % (por ejemplo, aproximadamente un 99,5 %, o mayor, aproximadamente un 99,9 % o mayor, aproximadamente un 99,95 % o mayor, aproximadamente un 99,99 % o mayor)). El coeficiente de variación (CV) en algunos modos de realización se expresa como un porcentaje, y en ocasiones el porcentaje es de aproximadamente un 10 % o menos (por ejemplo, aproximadamente un 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, o 1 %, o menos de un 1 % (por ejemplo, aproximadamente un 0,5 % o menos, aproximadamente un 0,1 % o menos, aproximadamente un 0,05 % o menos, aproximadamente un 0,01 % o menos)). Un probabilidad (por ejemplo, que un resultado particular determinado por un algoritmo no se debe a una casualidad) en determinados modos de realización se expresa como un valor p, y en ocasiones, el valor p es de aproximadamente 0,05 o menos (por ejemplo, aproximadamente 0,05, 0,04, 0,03, 0,02 o 0,01, o menos de 0,01 (por ejemplo, aproximadamente 0,001 o menos, aproximadamente 0,0001 o menos, aproximadamente 0,00001 o menos, aproximadamente 0,000001 o menos)).

Un baremo o puntuación se refiere a calcular la probabilidad de que una anomalía cromosómica particular esté en realidad presente o ausente en un sujeto/muestra, en algunos modos de realización. El valor de una puntuación se puede usar para determinar, por ejemplo, la variación, diferencia, o proporción de producto detectable nucleico amplificado que puede corresponder a la anomalía cromosómica real. Por ejemplo, calcular una puntuación positiva a partir de productos detectables puede dar lugar a una identificación de una anomalía cromosómica, lo que es particularmente relevante para el análisis de muestras individuales.

En determinados modos de realización, los datos simulados (o de simulación) pueden ayudar en el procesamiento de datos por entrenamiento de un algoritmo o prueba de un algoritmo. Los datos simulados pueden implicar hipotéticamente, por ejemplo, diversas muestras de diferentes concentraciones de ácido nucleico fetal y materno en suero, plasma y similares. Los datos simulados se pueden basar en lo que se podría esperar de una población real o se pueden sesgar para probar un algoritmo y/o para asignar una clasificación correcta basada en un conjunto de datos simulados. Los datos simulados también se denominan en el presente documento datos "virtuales". Las contribuciones fetal/materna dentro de una muestra se pueden simular como una tabla o matriz de números (por ejemplo, como una lista de máximos correspondiente a las señales de masas de productos de escisión de una biomolécula de referencia o secuencia de ácido nucleico amplificado), como un espectro de masas, como un patrón de bandas en un gel, o como una representación de cualquier técnica que mida la distribución de masas. Las simulaciones se pueden realizar en la mayoría de los casos por un programa de ordenador. Una posible etapa en el uso de un conjunto de datos simulados es la de evaluar la confianza de los resultados identificados, es decir lo bien que coinciden los positivos/negativos seleccionados con la muestra y si existen variaciones adicionales. Un enfoque común es el de calcular el valor de probabilidad (valor p) que estima la probabilidad de que una muestra aleatoria tenga mejor puntuación que la seleccionada. Como los cálculos del valor p pueden ser prohibitivos en determinadas circunstancias, se puede evaluar un modelo empírico, en el que se supone que al menos una muestra coincide con una muestra de referencia (con o sin variaciones resueltas). De forma alternativa se pueden usar otras distribuciones tales como la distribución de Poisson para describir la distribución de probabilidad.

En determinados modos de realización, un algoritmo puede asignar un valor de confianza a los positivos verdaderos,

negativos verdaderos, positivos falsos y negativos falsos calculados. La asignación de una probabilidad de la aparición de una anomalía cromosómica también puede estar basada en un determinado modelo de probabilidad.

A menudo, los datos simulados se generan en un procedimiento *in silico*. Como se usa en el presente documento, el término "*in silico*" se refiere a la investigación y los experimentos realizados usando un ordenador. Los procedimientos *in silico* incluyen, pero no se limitan a, estudios de modelado molecular, cariotipado, cálculos genéticos, experimentos de acoplamiento biomolecular, y representaciones virtuales de estructuras moleculares y/o procedimientos, tales como interacciones moleculares.

Como se usa en el presente documento, un "una rutina de procesamiento de datos" se refiere a un procedimiento, que se puede realizar en un programa informático, que determina la significación biológica de los datos adquiridos (es decir, los resultados finales de un ensayo). Por ejemplo, una rutina de procesamiento de datos puede determinar la cantidad de cada especie de secuencia de nucleótidos en base a los datos recogidos. Una rutina de procesamiento de datos también puede controlar un instrumento y/o una rutina de recogida de datos basada en los resultados determinados. A menudo se integran una rutina de procesamiento de datos y una rutina de recogida de datos y proporcionan una retroalimentación para la adquisición de datos de funcionamiento por el instrumento, y por tanto proporcionan procedimientos de valoración basados en ensayos proporcionados en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, programa informático se refiere a instrucciones de programa legibles por ordenador que, cuando se ejecutan por un ordenador, realizan operaciones de ordenador. Típicamente, el programa informático se proporciona en un producto de programa que contiene instrucciones de programa grabadas en un medio legible por ordenador, incluyendo, pero sin limitarse a, medios magnéticos incluyendo discos flexibles, discos duros y cinta magnética; y medios ópticos incluyendo discos CD-ROM, discos DVD, discos magneto-ópticos, y otros de dichos medios en los que se pueden grabar las instrucciones de programa.

Diferentes procedimientos de predicción de anomalía o normalidad pueden producir diferentes tipos de resultados. Para cualquier predicción dada, existen cuatro posibles tipos de resultados: positivo verdadero, negativo verdadero, positivo falso o negativo falso. El término "positivo verdadero" como se usa en el presente documento se refiere a un sujeto diagnosticado correctamente que tiene una anomalía cromosómica. El término "positivo falso" como se usa en el presente documento se refiere a un sujeto identificado erróneamente que tiene una anomalía cromosómica. El término "negativo verdadero" como se usa en el presente documento se refiere a un sujeto identificado correctamente que no tiene una anomalía cromosómica. El término "negativo falso" como se usa en el presente documento se refiere a un sujeto identificado erróneamente que no tiene una anomalía cromosómica. Se pueden calcular dos medidas de rendimiento para cualquier procedimiento dado en base a las proporciones de estos casos: (i) un valor de sensibilidad, la fracción de positivos predichos que se identifican correctamente como positivos (por ejemplo, la fracción de conjuntos de secuencias de nucleótidos correctamente identificada por comparación del nivel de detección/determinación como indicativo de anomalía cromosómica, con relación a todos los conjuntos de secuencias de nucleótidos identificados como tal, correcta o incorrectamente), reflejando de este modo la exactitud de los resultados en la detección de la anomalía cromosómica; y (ii) un valor de especificidad, la fracción de negativos predichos identificados correctamente como negativos (la fracción de conjuntos de secuencias de nucleótidos identificados correctamente por comparación del nivel de detección/determinación como indicativo de normalidad cromosómica, con relación a todos los conjuntos de secuencias de nucleótidos identificados como tal, correcta o incorrectamente), reflejando de este modo la exactitud de los resultados en la detección de la anomalía cromosómica.

El término "sensibilidad" como se usa en el presente documento se refiere al número de positivos verdaderos dividido entre el número de positivos verdaderos más el número de negativos falsos, donde sensibilidad (sens) puede estar en el intervalo de $0 \leq \text{sens} \leq 1$. De forma ideal, los modos de realización de procedimiento en el presente documento tienen el número de negativos falsos igual a cero o casi igual a cero, de modo que ningún sujeto se identifica erróneamente como que no tiene al menos una anomalía cromosómica cuando, de hecho, tienen al menos una anomalía cromosómica. A la inversa, a menudo se realiza una evaluación de la capacidad de un algoritmo de predicción para clasificar negativos correctamente, una medida complementaria a la sensibilidad. El término "especificidad" como se usa en el presente documento se refiere al número de negativos verdaderos dividido entre el número de negativos verdaderos más el número de positivos falsos, donde especificidad (spec) puede estar en el intervalo de $0 \leq \text{spec} \leq 1$. De forma ideal, los modos de realización de procedimientos en el presente documento tienen el número de positivos falsos igual a cero o casi igual a cero, de modo que ningún sujeto se identifica erróneamente como que tiene al menos una anomalía cromosómica cuando no tienen la anomalía cromosómica que se está evaluando. Por tanto, a veces se selecciona un procedimiento que tiene sensibilidad y especificidad igual a uno, o un 100 %.

Se puede usar uno o más algoritmos de predicción para determinar la significación o para dar significado a los datos de detección recogidos en condiciones variables que se pueden ponderar independientemente o dependientemente entre sí. El término "variable" como se usa en el presente documento se refiere a un factor, cantidad o función de un algoritmo que tiene un valor o conjunto de valores. Por ejemplo, una variable puede ser el diseño de un conjunto de especies de ácidos nucleicos amplificados, el número de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, porcentaje de contribución genética fetal sometida a prueba, porcentaje de contribución genética materna sometida a prueba, tipo de anomalía cromosómica sometida a ensayo, tipo de anomalías ligadas al sexo sometidas a ensayo, la

edad de la madre y similares. El término "independiente" como se usa en el presente documento se refiere a que no está influenciado o que no está controlado por otro. El término "dependiente" como se usa en el presente documento se refiere a que está influenciado o que está controlado por otro. Por ejemplo, un cromosoma particular y un acontecimiento de trisomía que se produce para ese cromosoma particular que da como resultado un ser viable son variables que son dependientes entre sí.

Un experto en la técnica puede usar cualquier tipo de procedimiento o algoritmo de predicción para dar significación a los datos de la presente tecnología dentro de una sensibilidad y/o especificidad aceptable. Por ejemplo, se pueden usar algoritmos de predicción tales como prueba de la χ^2 , prueba de la z, prueba de la t, ANOVA (análisis de varianza), análisis de regresión, redes neuronales, lógica difusa, modelos Markov ocultos, estimación de estado de modelos múltiples, y similares. Se puede determinar uno o más procedimientos o algoritmos de predicción para dar significación a los datos que tienen diferentes variables independientes y/o dependientes de la presente tecnología. Y se puede determinar uno o más procedimientos o algoritmos de predicción para no dar significación a los datos que tienen diferentes variables independientes y/o dependientes de la presente tecnología. Se puede diseñar o cambiar parámetros de las diferentes variables de los procedimientos descritos en el presente documento en base a los resultados de uno o más algoritmos de predicción (por ejemplo, número de conjuntos analizados, tipos de especies de nucleótidos en cada conjunto). Por ejemplo, aplicar la prueba de la χ^2 a los datos de detección puede sugerir que intervalos específicos de la edad materna se correlacionan con una mayor probabilidad de tener una descendencia con una anomalía cromosómica específica, por tanto, la variable de la edad materna se puede ponderar de forma diferente frente a ponderarse igual que otras variables.

En determinados modos de realización, se pueden elegir varios algoritmos para someter a prueba. Estos algoritmos se pueden entrenar después con los datos de partida. Para cada nueva muestra de datos de partida, los algoritmos entrenados asignarán una clasificación a esa muestra (es decir, trisomía o normal). Basándose en las clasificaciones de las nuevas muestras de datos de partida, se puede evaluar el rendimiento de los algoritmos entrenados en base a la sensibilidad y especificidad. Finalmente, se puede identificar un algoritmo con la mayor sensibilidad y/o especificidad o combinación de los mismos.

En algunos modos de realización, se espera que una proporción de especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto sea de aproximadamente 1,0:1,0, lo que puede indicar que las especies de secuencias de nucleótidos en el conjunto están en cromosomas diferentes presentes en el mismo número en el sujeto. Cuando las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto están en los cromosomas presentes en diferentes números en el sujeto (por ejemplo, en trisomía 21) la proporción de conjunto que se detecta es menor o mayor de aproximadamente 1,0:1,0. Cuando se utiliza ácido nucleico extracelular como ácido nucleico molde, a menudo la proporción de conjunto medida no es 1,0:1,0 (euploide) o 1,0:1,5 (por ejemplo, trisomía 21), debido a una variedad de factores. Aunque, la proporción medida esperada puede variar, siempre que dicha variación sea sustancialmente reproducible y detectable. Por ejemplo, un conjunto particular podría proporcionar una proporción medida reproducible (por ejemplo, de máximos en un espectrógrafo de masas) de 1,0:1,2 en una medida euploide. La medida aneuploide para un conjunto de este tipo podría entonces ser, por ejemplo, de 1,0:1,3. Por ejemplo, la medida de 1,3 frente a 1,2 es el resultado de medir el ácido nucleico fetal frente a un historial de ácido nucleico materno, que disminuye la señal que se proporcionaría de otro modo por un muestra fetal "pura", tal como de líquido amniótico o de una célula fetal.

Como se destaca anteriormente, se pueden utilizar algoritmos, programas informáticos, procesadores y/o máquinas, por ejemplo, para (i) procesar los datos de detección relativos a las especies de secuencias de nucleótidos y/o especies de ácidos nucleicos amplificados de conjuntos, y/o (ii) identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden: (a) proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; (b) detectar la información de señal derivada de determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en el que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; (c) recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal; (d) avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y (e) organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de

una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan procedimientos múltiples para identificar la presencia o ausencia de una anomalía de un cromosoma diana en un sujeto, que comprenden: (a) proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; (b) detectar la información de señal derivada de determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada uno de tres o más conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en el que los tres o más conjuntos se preparan amplificando tres o más conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) una secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en un cromosoma diana y al menos una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto está presente en uno o más cromosomas de referencia, (iii) el cromosoma diana es común para todos los conjuntos; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (v) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (vi) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vii) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; c) recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal; (d) detectar la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos; (e) avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a una disminución o incremento del cromosoma diana con relación al uno o más cromosomas de referencia en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y (e) organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta a haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden: (a) proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; (b) detectar la información de señal derivada de determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en el que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; (c) recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal; (d) avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados; y (e) organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta a haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden: (a) proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; (b) detectar la información de señal derivada de determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en el que los conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; (c) recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal; (d) avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y (e) organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta a haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden obtener una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados preparados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; analizando un archivo de configuración en datos de definición que especifica: la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado; recibir, por el módulo de procesamiento lógico, los datos de definición; avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especie de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta a haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden preparar una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; analizando un archivo de configuración en datos de definición que especifica: la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado; recibir, por el módulo de procesamiento lógico, los datos de definición; avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especie de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta a haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden proporcionar la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal; avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y organizar, por el

modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan procedimientos múltiples para identificar la presencia o ausencia de una anomalía de un cromosoma diana en un sujeto que comprenden proporcionar la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada uno de tres o más conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que los tres o más conjuntos se preparan amplificando tres o más conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) una secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en un cromosoma diana y al menos una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto está presente en uno o más cromosomas de referencia, (iii) el cromosoma diana es común para todos los conjuntos; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (v) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (vi) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vii) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal; avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden proporcionar la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal; avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados; y organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden proporcionar la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal; avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y organizar, por el

modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; (por favor, revísese qué módulos se necesitan, o si se necesitan más etapas/descripción) recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en el que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan procedimientos múltiples para identificar la presencia o ausencia de una anomalía de un cromosoma diana en un sujeto que comprenden proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada uno de tres o más conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, donde los tres o más conjuntos se preparan amplificando tres o más conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) una secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en un cromosoma diana y al menos una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto está presente en uno o más cromosomas de referencia, (iii) el cromosoma diana es común para todos los conjuntos; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (v) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (vi) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vii) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto que comprenden proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en el que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados; y organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber

sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto que comprenden proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en el que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

Por "proporcionar la información de señal" se quiere decir cualquier manera de proporcionar la información, incluyendo, por ejemplo, medios de comunicación informáticos desde un sitio local, o remoto, entrada humana de datos, o cualquier otro procedimiento de transmisión de la información de señal. La información de señal se puede generar en una ubicación y se puede proporcionar a otra ubicación.

Por "obtener" o "recibir" la información de señal se quiere decir recibir la información de señal por medios de comunicación de ordenador desde un sitio local, o remoto, entrada humana de datos, o cualquier otro procedimiento de recepción de la información de señal. La información de señal se puede generar en la misma ubicación en la que se recibe, o se puede generar en una ubicación diferente y transmitirse a la ubicación de recepción.

Por "indicando" o "representando" la cantidad se quiere decir que la información de señal se relaciona con, o se correlaciona con, la cantidad de, por ejemplo, especies de ácidos nucleicos amplificados. La información puede ser, por ejemplo, los datos calculados asociados a la cantidad de ácido nucleico amplificado obtenida, por ejemplo, después de convertir los datos de partida obtenidos por espectrometría de masas del ácido nucleico amplificado. La información de señal puede ser, por ejemplo, los datos de partida obtenidos del análisis del ácido nucleico amplificado por procedimientos tales como, por ejemplo, espectrometría de masas.

También se proporcionan productos de programas de ordenador, tales como, por ejemplo, un producto de programas de ordenador que comprende un medio utilizable por ordenador que tiene un código de programa legible por ordenador incorporado en el mismo, el código de programa legible por ordenador adaptado para ejecutarse para implementar un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, comprendiendo el procedimiento: (a) proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; (b) detectar la información de señal derivada de determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en el que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; (c) recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal; (d) avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y (e) organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan productos de programas de ordenador que comprenden un medio utilizable por ordenador

que tiene un código de programa legible por ordenador incorporado en el mismo, el código de programa legible por ordenador adaptado para ejecutarse para implementar un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, comprendiendo el procedimiento: procedimientos múltiples para identificar la presencia o ausencia de una anomalía de un cromosoma diana en un sujeto, que comprenden: (a) proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; (b) detectar la información de señal derivada de determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada uno de tres o más conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en el que los tres o más conjuntos se preparan amplificando tres o más conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) una secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en un cromosoma diana y al menos una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto está presente en uno o más cromosomas de referencia, (iii) el cromosoma diana es común para todos los conjuntos; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (v) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (vi) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vii) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; c) recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal; (d) detectar la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos; (e) avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a una disminución o incremento del cromosoma diana con relación al uno o más cromosomas de referencia en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y (e) organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta a haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan productos de programas de ordenador que comprenden un medio utilizable por ordenador que tiene un código de programa legible por ordenador incorporado en el mismo, el código de programa legible por ordenador adaptado para ejecutarse para implementar procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto que comprenden: (a) proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; (b) detectar la información de señal derivada de determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en el que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; (c) recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal; (d) avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados; y (e) organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta a haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan productos de programas de ordenador que comprenden un medio utilizable por ordenador que tiene un código de programa legible por ordenador incorporado en el mismo, el código de programa legible por ordenador adaptado para ejecutarse para implementar procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto que comprenden: (a) proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; (b) detectar la información de señal derivada de determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en el que los conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de

nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; (c) recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal; (d) avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y (e) organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta a haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporciona un producto de programas de ordenador que comprenden un medio utilizable por ordenador que tiene un código de programa legible por ordenador incorporado en el mismo, dicho código de programa legible por ordenador adaptado para ejecutarse para implementar un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento: proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; analizar un archivo de configuración en datos de definición que especifica: la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto; recibir, por el módulo de procesamiento lógico, los datos de definición; avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico; y organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta a haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporciona un producto de programa informático, que comprende un medio utilizable por ordenador que tiene un código de programa legible por ordenador incorporado en el mismo, dicho código de programa legible por ordenador adaptado para ejecutarse para implementar un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, comprendiendo el procedimiento proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; recibir la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en el que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico; y organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan productos de programas de ordenador que comprenden un medio utilizable por ordenador que tiene un código de programa legible por ordenador incorporado en el mismo, el código de programa legible por ordenador adaptado para ejecutarse para implementar un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, comprendiendo el procedimiento: procedimientos múltiples para identificar la presencia o ausencia de una anomalía de un cromosoma diana en un sujeto, que comprenden: (a) proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; (b) recibir la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada uno de tres o más conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en el que los tres o más conjuntos se preparan amplificando tres o más conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) una secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en un cromosoma diana y al menos una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto está presente en uno o más cromosomas de referencia, (iii) el cromosoma diana es común para todos los conjuntos; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (v) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (vi) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vii) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico; y organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber

sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan productos de programas de ordenador que comprenden un medio utilizable por ordenador que tiene un código de programa legible por ordenador incorporado en el mismo, el código de programa legible por ordenador adaptado para ejecutarse para implementar procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto que comprenden: (a) proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; (b) recibir la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en el que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico; y organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan productos de programas de ordenador que comprenden un medio utilizable por ordenador que tiene un código de programa legible por ordenador incorporado en el mismo, el código de programa legible por ordenador adaptado para ejecutarse para implementar procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto que comprenden: (a) proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; (b) recibir la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en el que los conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico; y organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto que comprenden: (a) detectar la información de señal, en los que la información de señal representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; (b) transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y (c) presentar los datos de identificación.

La información de señal puede ser, por ejemplo, datos de espectrometría de masas obtenidos a partir de espectrometría de masas del ácido nucleico amplificado. Los datos de espectrometría de masas pueden ser datos de partida, tales como, por ejemplo, un conjunto de números, o, por ejemplo, una presentación bidimensional del

espectro de masas. La información de señal se puede convertir o transformar en cualquier forma de datos que se pueda proporcionar para, o recibir por, un sistema de ordenador. La información de señal, por ejemplo, también se puede convertir, o transformar en datos de identificación o información que represente el número de cromosomas en las células. Cuando el número de cromosomas es mayor o menor que en células euploides, se puede identificar la presencia de una anomalía cromosómica.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden: (a) detectar la información de señal, en los que la información de señal representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; (b) transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y (c) presentar los datos de identificación.

También se proporcionan procedimientos múltiples para identificar la presencia o ausencia de una anomalía de un cromosoma diana en un sujeto, que comprenden: (a) detectar la información de señal, en los que la información de señal representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada uno de tres o más conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que los tres o más conjuntos se preparan amplificando tres o más conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) una secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en un cromosoma diana y al menos una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto está presente en uno o más cromosomas de referencia, (iii) el cromosoma diana es común para todos los conjuntos; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (v) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (vi) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; (b) detectar la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos; (c) en base a la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos, transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y (c) presentar los datos de identificación.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden: (a) detectar la información de señal, en los que la información de señal representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; (b) transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados; y (c) presentar los datos de identificación.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden: (a) detectar la información de señal, en los que la información de señal representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de

ácidos nucleicos amplificados, en los que los conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; (b) transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y (c) presentar los datos de identificación.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden preparar una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y obtener un conjunto de datos de valores que representan la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto; transformar el conjunto de datos de valores que representan la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y presentar los datos identificados.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden proporcionar la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y presentar los datos de identificación.

También se proporcionan procedimientos múltiples para identificar la presencia o ausencia de una anomalía de un cromosoma diana en un sujeto, que comprenden: proporcionar la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada uno de tres o más conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que los tres o más conjuntos se preparan amplificando tres o más conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) una secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en un cromosoma diana y al menos una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto está presente en uno o más cromosomas de referencia, (iii) el cromosoma diana es común para todos los conjuntos; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (v) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (vi) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vii) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; detectar la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos; en base a la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada

especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos, transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y presentar los datos de identificación.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden: proporcionar la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados; y presentar los datos de identificación.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden: proporcionar la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que los conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y presentar los datos de identificación.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden recibir la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y presentar los datos de identificación.

También se proporcionan procedimientos múltiples para identificar la presencia o ausencia de una anomalía de un cromosoma diana en un sujeto, que comprenden: recibir la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada uno de tres o más conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que los tres o más conjuntos se preparan amplificando tres o más conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) una secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en un cromosoma diana y al menos una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto está presente en uno o más cromosomas de

referencia, (iii) el cromosoma diana es común para todos los conjuntos; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (v) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (vi) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vii) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; detectar la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos; en base a la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos, transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y presentar los datos de identificación.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden: recibir la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados; y presentar los datos de identificación.

También se proporcionan procedimientos para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprenden: recibir la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que los conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y presentar los datos de identificación.

Para los propósitos de estos modos de realización, y similares, el término "información de señal" indica la información legible por cualquier medio electrónico, incluyendo, por ejemplo, ordenadores que representan los datos derivados usando los presentes procedimientos. Por ejemplo, "información de señal" puede representar la cantidad de especies de ácidos nucleicos amplificados en un conjunto de especies de ácidos nucleicos amplificados. O, por ejemplo, puede representar la presencia o ausencia de una disminución o un incremento de una o más especies de ácidos nucleicos amplificados. La información de señal, tal como en estos ejemplos, que representa sustancias físicas se puede transformar en datos de identificación, tales como una presentación visual, que representa otras sustancias físicas, tales como, por ejemplo, una anomalía cromosómica. Los datos de identificación se pueden presentar de cualquier manera apropiada, incluyendo, pero sin limitarse a, en una presentación visual en ordenador, codificando los datos de identificación en medios legibles por ordenador que, por ejemplo, se pueden transferir a otro dispositivo electrónico, o creando una copia impresa de la presentación, tal como una impresión de la información. La información también se puede presentar por señal auditiva o cualquier otro medio de comunicación de información.

En algunos modos de realización, la información de señal pueden ser datos de detección obtenidos usando procedimientos para detectar las especies de ácidos nucleicos amplificados de la presente tecnología, tales como,

por ejemplo, sin limitación, datos obtenidos a partir de extensión de cebadores, secuenciación, reacción en cadena de la polimerasa digital (PCR), PCR cuantitativa (Q-PCR) y espectrometría de masas. En algunos modos de realización, las especies de ácidos nucleicos amplificados se detectan: (i) poniendo en contacto la especie de ácido nucleico amplificado con cebadores de extensión, (ii) preparando cebadores de extensión extendidos, y (iii) determinando la cantidad relativa del uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo analizando los cebadores de extensión extendidos. El uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo se analizan por espectrometría de masas, en algunos modos de realización. Cuando la información de señal son datos de detección, la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados en un conjunto de especies de ácidos nucleicos amplificados, o la presencia o ausencia de una disminución o un incremento de una o más especies de ácidos nucleicos amplificados se puede determinar por el módulo de procesamiento lógico.

Una vez que se detecta la información de señal, se puede pasar al módulo de procesamiento lógico. El módulo de procesamiento lógico pueden "avisar de" o "identificar" la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica analizando la cantidad de ácido nucleico amplificado en dos, o tres, conjuntos. O, se puede avisar de o identificar la anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico en base a una disminución o incremento del cromosoma diana en relación con el uno o más cromosomas de referencia en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos.

También se proporcionan procedimientos para transmitir de información genética prenatal a una paciente humana embarazada, que comprenden identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto; de este modo se determina la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y transmitir la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada.

También se proporcionan procedimientos para transmitir de información genética prenatal a una paciente humana embarazada, que comprenden identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado por un procedimiento múltiple amplificando tres o más conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) una secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en un cromosoma diana y al menos una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto está presente en uno o más cromosomas de referencia, (iii) el cromosoma diana es común para todos los conjuntos; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (v) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (vi) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vii) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; detectar la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos; en base a la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos, transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; transmitir la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada.

También se proporcionan procedimientos para transmitir de información genética prenatal a una paciente humana embarazada, que comprenden identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con

emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados; y transmitir la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada.

También se proporcionan procedimientos para transmitir de información genética prenatal a una paciente humana embarazada, que comprenden identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y transmitir la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada.

También se proporcionan procedimientos para transmitir de información genética prenatal a una paciente humana embarazada, que comprenden identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto; de este modo se determina la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y transmitir información genética prenatal que representa el número de cromosomas en las células en el feto a la paciente embarazada.

También se proporcionan procedimientos para transmitir de información genética prenatal a una paciente humana embarazada, que comprenden identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado por un procedimiento múltiple amplificando tres o más conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) una secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en un cromosoma diana y al menos una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto está presente en uno o más cromosomas de referencia, (iii) el cromosoma diana es común para todos los conjuntos; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (v) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (vi) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vii) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; detectar la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos; en base a la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos, transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto

en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; transmitir información genética prenatal que representa el número de cromosomas en las células en el feto a la paciente embarazada.

También se proporcionan procedimientos para transmitir de información genética prenatal a una paciente humana embarazada, que comprenden identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que representan la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados; y transmitir información genética prenatal que representa el número de cromosomas en las células en el feto a la paciente embarazada.

También se proporcionan procedimientos para transmitir de información genética prenatal a una paciente humana embarazada, que comprenden identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, en los que: el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y transmitir información genética prenatal que representa el número de cromosomas en las células en el feto a la paciente embarazada.

El término "identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier procedimiento para obtener dicha información, incluyendo, sin limitación, obtener la información de un archivo de laboratorio. Un archivo de laboratorio se puede generar por un laboratorio que llevó a cabo un ensayo para determinar la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica. El laboratorio puede estar en la misma ubicación o en una ubicación diferente (por ejemplo, en otro país) que el personal que identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica desde el archivo de laboratorio. Por ejemplo, el archivo de laboratorio se puede generar en una ubicación y se transmite a otra ubicación en la que la información en el mismo se transmitirá a la paciente embarazada. El archivo de laboratorio puede estar en forma tangible o en forma electrónica (por ejemplo, forma legible por ordenador), en determinados modos de realización.

El término "transmitir la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada" como se usa en el presente documento se refiere a comunicar la información a la paciente, o miembro de su familia, tutor o designado de la misma, en un medio adecuado, incluyendo, sin limitación, en forma verbal, documento, o archivo.

También se proporcionan procedimientos para proporcionar a una paciente humana embarazada una receta médica basada en información genética prenatal, que comprenden identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con

relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto; de este modo se determina la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y proporcionar una receta médica basada en la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada.

También se proporcionan procedimientos para proporcionar a una paciente humana embarazada una receta médica basada en información genética prenatal, que comprenden identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado por un procedimiento múltiple amplificando tres o más conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) una secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en un cromosoma diana y al menos una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto está presente en uno o más cromosomas de referencia, (iii) el cromosoma diana es común para todos los conjuntos; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (v) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (vi) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vii) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; detectar la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos; en base a la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos, transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; proporcionar una receta médica basada en la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada.

También se proporcionan procedimientos para proporcionar a una paciente humana embarazada una receta médica basada en información genética prenatal, que comprenden identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados; y proporcionar una receta médica basada en la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada.

También se proporcionan procedimientos para proporcionar a una paciente humana embarazada una receta médica basada en información genética prenatal, que comprenden identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de

ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y proporcionar una receta médica basada en la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada.

El término "proporcionar una receta médica basada en información genética prenatal" se refiere a comunicar la receta a la paciente, o miembro de su familia, tutor o designado de la misma, en un medio adecuado, incluyendo, sin limitación, en forma verbal, documento o archivo.

También se proporcionan procedimientos para proporcionar a una paciente humana embarazada una receta médica basada en información genética prenatal, que comprenden informar a una paciente embarazada de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto; de este modo se determina la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y proporcionar una receta médica basada en la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada.

También se incluyen en el presente documento procedimientos para proporcionar a una paciente humana embarazada una receta médica basada en información genética prenatal, que comprenden informar a una paciente embarazada de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado amplificando tres o más conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) una secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en un cromosoma diana y al menos una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto está presente en uno o más cromosomas de referencia, (iii) el cromosoma diana es común para todos los conjuntos; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (v) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (vi) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vii) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; detectar la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos; en base a la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos, transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; proporcionar una receta médica basada en la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada.

También se proporcionan procedimientos para proporcionar a una paciente humana embarazada una receta médica basada en información genética prenatal, que comprenden informar a una paciente embarazada de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de

identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados; y proporcionar una receta médica basada en la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada.

También se proporcionan procedimientos para proporcionar a una paciente humana embarazada una receta médica basada en información genética prenatal, que comprenden informar a una paciente embarazada de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y proporcionar una receta médica basada en la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada.

La receta médica puede ser para cualquier línea de acción determinada por, por ejemplo, un profesional sanitario tras revisar la información genética prenatal. Por ejemplo, la receta puede ser para que la paciente embarazada se someta a un procedimiento de amniocentesis. O, en otro ejemplo, la receta médica puede ser para que la paciente embarazada se someta a otra prueba genética. Aún en otro ejemplo, la receta médica puede ser un dictamen médico para que no se someta a pruebas genéticas adicionales.

También se proporcionan archivos, tales como, por ejemplo, un archivo que comprende la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de una paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto; de este modo se determina la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos.

También se proporcionan archivos, tales como, por ejemplo, un archivo que comprende la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de una paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado amplificando tres o más conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) una secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en un cromosoma diana y al menos una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto está presente en uno o más cromosomas de referencia, (iii) el cromosoma diana es común para todos los conjuntos; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (v) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (vi) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vii) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; detectar la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos; en base a la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos, transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos

amplificados de dos o más conjuntos.

También se proporcionan archivos, tales como, por ejemplo, un archivo que comprende la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de una paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados.

También se proporcionan archivos, tales como, por ejemplo, un archivo que comprende la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de una paciente embarazada, en los que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos.

El archivo puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse a, un archivo legible por ordenador, un archivo en papel, o un archivo de historia clínica.

Los productos de programas informáticos incluyen, por ejemplo, cualquier medio de almacenamiento electrónico que se pueda usar para proporcionar instrucciones a un ordenador, tal como, por ejemplo, un dispositivo de almacenamiento extraíble, CD-ROM, un disco duro instalado en una unidad de disco duro, señales, cinta magnética, DVD, discos ópticos, unidades flash, RAM o disquete, y similares.

Los sistemas analizados en el presente documento pueden comprender además componentes generales de sistemas de ordenador, tales como, por ejemplo, servidores de red, sistemas portátiles, sistemas de escritorio, sistemas de bolsillo, agendas electrónicas, quioscos informáticos, y similares. El sistema informático puede comprender uno o más medios de entrada tales como un teclado, pantalla táctil, ratón, reconocimiento de voz u otros medios para permitir que el usuario introduzca datos en el sistema. El sistema puede comprender además uno o más medios de salida tales como una pantalla de visualización CRT o LCD, altavoz, máquina de fax, impresora por impacto, impresora por chorro de tinta, impresora láser en blanco y negro o en color u otros medios para proporcionar una salida visual, auditiva o impresa de la información. En determinados modos de realización, un sistema incluye una o más máquinas. Los medios de entrada y salida pueden estar conectados a una unidad central de procesamiento que puede comprender entre otros componentes, un microprocesador para ejecutar instrucciones de programa y memoria para almacenar el código de programa y datos. En algunos modos de realización, los procedimientos se pueden implementar como un único sistema de usuario situado en un único sitio geográfico. En otros modos de realización, se pueden implementar procedimientos como un sistema multiusuario. En el caso de una implementación multiusuario, se pueden conectar múltiples unidades centrales de procesamiento por medio de una red. La red puede ser local, englobando un único departamento en una parte de un edificio, todo un edificio, abarcar múltiples edificios, abarcar una región, abarcar todo un país o ser mundial. La red puede ser privada, siendo propiedad y estando controlada por el proveedor o se puede implementar como un servicio basado en internet en el que el usuario accede a una página web para introducir y recuperar información.

Los diversos módulos informáticos asociados con la implementación de los presentes productos y procedimientos se pueden cargar de forma adecuada en el sistema informático según se desee, o el código de programa informático se

puede almacenar en un medio legible por ordenador tal como un disquete, cinta magnética, o un disco óptico, o similares. En una implementación en internet, se puede configurar un servidor y un sitio web mantenido por una organización para proporcionar descargas informáticas a usuarios remotos. Como se usa en el presente documento, "módulo", incluyendo variaciones gramaticales del mismo, quiere decir una unidad funcional autónoma que se usa con un sistema más grande. Por ejemplo, un módulo informático es parte de un programa que realiza una tarea particular.

Los presentes procedimientos se pueden implementar usando equipos informáticos, programas informáticos o una combinación de los mismos y se pueden implementar en un sistema informático u otro sistema de procesamiento. Un ejemplo de sistema informático puede incluir uno o más procesadores. Un procesador se puede conectar a un bus de comunicación. El sistema informático puede incluir una memoria principal, a menudo memoria de acceso aleatorio (RAM), y también puede incluir una memoria secundaria. La memoria secundaria puede incluir, por ejemplo, una unidad de disco duro y/o una unidad de almacenamiento extraíble, que representa una unidad de disquete, una unidad de cinta magnética, una unidad de disco óptico, tarjeta de memoria, etc. La unidad de almacenamiento extraíble lee desde y/o escribe en una unidad de almacenamiento extraíble de manera bien conocida. Una unidad de almacenamiento extraíble incluye, pero no se limita a, un disquete, cinta magnética, disco óptico, etc., que se lee por y se escribe en, por ejemplo, una unidad de almacenamiento extraíble. Como se apreciará, la unidad de almacenamiento extraíble incluye un medio de almacenamiento utilizable por ordenador que tiene almacenada en su interior programas informáticos y/o datos.

En modos de realización alternativos, la memoria secundaria puede incluir otros medios similares para permitir que los programas informáticos u otras instrucciones se carguen en un sistema informático. Dichos medios pueden incluir, por ejemplo, una unidad de almacenamiento extraíble y un dispositivo de interfaz. Los ejemplos de estos pueden incluir un cartucho de programa y una interfaz de cartucho (tal como la que se encuentra en dispositivos de videojuegos), un chip de memoria extraíble (tal como un EPROM, o PROM) y conector asociado, y otras unidades de almacenamiento extraíbles e interfaces que permiten que los programas informáticos y datos se transfieran desde la unidad de almacenamiento extraíble a un sistema informático.

El sistema informático también puede incluir una interfaz de comunicaciones. Una interfaz de comunicaciones permite que programas informáticos y datos se transfieran entre el sistema informático y los dispositivos externos. Los ejemplos de interfaces de comunicaciones pueden incluir un módem, una interfaz de red (tal como una tarjeta Ethernet), un puerto de comunicaciones, una tarjeta y ranura de PCMCIA, etc. Los programas informáticos y datos transferidos por medio de la interfaz de comunicaciones están en forma de señales, que pueden ser electrónicas, electromagnéticas, ópticas u otras señales que se puedan recibir por las interfaces de comunicaciones. Estas señales se proporcionan a la interfaz de comunicaciones por medio de un canal. Este canal lleva señales y se puede implementar usando alambre o cable, fibra óptica, una línea de teléfono, una conexión de teléfono móvil, un enlace de RF y otros canales de comunicaciones. Por tanto, en un ejemplo, se puede usar una interfaz de comunicaciones para recibir información de señal que se va a detectar por el módulo de detección de señal.

En un aspecto relacionado, la información de señal se puede introducir por una variedad de medios, incluyendo pero sin limitarse a, de entrada manual o dispositivos de entrada de datos directa (DDE). Por ejemplo, los dispositivos manuales pueden incluir, teclados, teclados conceptuales, pantallas táctiles, lápices ópticos, ratón, ratón de bola, *joysticks*, tabletas gráficas, escáneres, cámaras digitales, digitalizadores de video y dispositivos de reconocimiento de voz. Los DDE pueden incluir, por ejemplo, lectores de códigos de barras, códigos de bandas magnéticas, tarjetas inteligentes, reconocimiento magnético de caracteres de tinta, reconocimiento óptico de caracteres, reconocimiento óptico de marcas y documentos de respuesta. En un modo de realización, una salida de un lector de genes o chips puede servir como señal de entrada.

Ensayos de diagnóstico de combinación

Los resultados de los ensayos de especies de nucleótidos descritos en las secciones anteriores se pueden combinar con los resultados de uno o más de otros ensayos, denominados en el presente documento "ensayos secundarios", y los resultados de la combinación de los ensayos se pueden utilizar para identificar la presencia o ausencia de aneuploidia. Los resultados de un ensayo de especies de nucleótidos no invasivo descrito anteriormente se pueden combinar con los resultados de uno o más de otros ensayos no invasivos y/o uno o más ensayos invasivos. En determinados modos de realización, los resultados de un ensayo secundario se combinan con los resultados de un ensayo de especies de nucleótidos descrito anteriormente cuando una muestra contiene una cantidad de ácido nucleico fetal por debajo de una determinada cantidad umbral. Una cantidad umbral de ácido nucleico fetal a veces es de aproximadamente un 15 %, en determinados modos de realización.

En algunos modos de realización, un ensayo de especies de nucleótidos descrito en las secciones anteriores se puede combinar con un ensayo de recuento de alelos basado en ácido nucleico secundario. Los procedimientos basados en alelos para diagnosticar, monitorizar o predecir anomalías cromosómicas se basan en la determinación de la proporción de los alelos encontrados en la muestra materna que comprende ácido nucleico fetal libre. La proporción de alelos se refiere a la proporción de la población de un alelo y la población del otro alelo en una muestra biológica. En algunos casos, es posible que en trisomías un feto pueda ser triplicado para un locus particular, y se pueden detectar estos acontecimientos triplicados para diagnosticar la aneuploidia. En algunos modos de

realización, un ensayo secundario detecta un alelo paterno, y en determinados modos de realización, la madre es homocigótica en el sitio polimorfo y el feto es heterocigótico en el sitio polimorfo detectado en el ensayo secundario. En un modo de realización relacionado, la madre se somete a genotipado en primer lugar (por ejemplo, usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de una muestra de sangre completa materna) para determinar el alelo no diana que se seleccionará por el agente de escisión en un ensayo secundario.

En determinados modos de realización, un ensayo de especies de nucleótidos descrito anteriormente se puede combinar con un procedimiento de diagnóstico basado en ARN secundario. Los procedimientos basados en ARN para diagnosticar, monitorizar o predecir anomalías cromosómicas a menudo se basan en el uso de la especificidad en el embarazo de transcritos expresados en el feto para desarrollar un procedimiento que permita la determinación genética de aneuploidia cromosómica fetal y, por tanto, el establecimiento de su diagnóstico no invasivo. En un modo de realización, los transcritos expresados en el feto son los expresados en la placenta. Específicamente, un ensayo secundario puede detectar uno o más polimorfismos mononucleotídicos (SNP) a partir de los transcritos de ARN con patrones de expresión específicos de tejido que se codifican por genes en el cromosoma de aneuploidia. Otros polimorfismos también se pueden detectar por un ensayo secundario, tal como un polimorfismo de inserción/delección y polimorfismo de repetición en tándem sencillo, por ejemplo. El estado del locus se puede determinar a través de la evaluación de la proporción entre los SNP informativos en el ARN transcrito a partir de los locus genéticos de interés en un ensayo secundario. Los locus genéticos de interés pueden incluir, pero no se limitan a, COL6A1, SOD1, COL6A2, ATP50, BTG3, ADAMTS1, BACE2, ITS1, APP, ATP5J, DSCR5, PLAC4, LOC90625, RPL17, SERPIN62 o COL4A2, en un ensayo secundario.

En algunos modos de realización, un ensayo de especies de nucleótidos descrito en las secciones anteriores se puede combinar con un ensayo basado en metilación secundario. Las pruebas basadas en metilación a veces se refieren a detectar un marcador de metilación de ADN específico fetal para la detección en el plasma materno. Se ha demostrado que el ADN fetal y materno se puede distinguir por diferencias en el estado de metilación de (véase la patente de los EE. UU. n.º 6.927.028, concedida el 9 de agosto de 2005). La metilación es un fenómeno epigenético, que se refiere a procedimientos que alteran un fenotipo sin implicar cambios en la secuencia de ADN. Poon *et al.* mostraron además que se pueden usar marcadores epigenéticos para detectar la secuencia de ADN maternalmente heredada derivada del feto a partir de plasma materno (Clin. Chem. 48:35-41, 2002). Se pueden usar marcadores epigenéticos para el diagnóstico prenatal no invasivo determinando el estado de metilación de al menos una porción de un gen diferencialmente metilado en una muestra de sangre, en el que la porción del gen diferencialmente metilado del feto y la porción de la mujer embarazada están metiladas diferencialmente, distinguiendo de este modo el gen de la mujer y el gen del feto en la muestra de sangre; determinando el nivel de gen fetal; y comparando el nivel de gen fetal con un control estándar. En algunos casos, un incremento del control estándar indica la presencia o progresión de un trastorno asociado al embarazo. En otros casos, una disminución del control estándar indica la presencia o la progresión de un trastorno asociado al embarazo.

En determinados modos de realización, un ensayo de especies de nucleótidos descrito en las secciones anteriores se puede combinar con otro ensayo molecular secundario. Otros procedimientos moleculares para el diagnóstico de aneuploidias también son conocidos (Hulten *et al.*, 2003, Reproduction, 126(3):279-97; Armour *et al.*, 2002, Human Mutation 20(5):325-37; Eiben y Glaubitz, J Histochem Cytochem. 2005 Mar; 53(3):281-3; y Nicolaidis *et al.*, J Matern Fetal Neonatal Med. 2002 Jul; 12(1):9-18)). Los procedimientos moleculares alternativos incluyen procedimientos basados en PCR tales como QF-PCR (Verma *et al.*, 1998, Lancet 352(9121):9-12; Pertl *et al.*, 1994, Lancet 343(8907): 1197-8; Mann *et al.*, 2001, Lancet 358(9287): 1057-61; Adinolfi *et al.*, 1997, Prenatal Diagnosis 17(13): 1299-311), hibridación de sonda amplificable múltiple (MAPH) (Armour *et al.*, 2000, Nucleic Acids Res 28(2):605-9), ensayo de unión a sonda múltiple (MPLA) (Slater *et al.*, 2003, J Med Genet 40(12):907-12; Schouten *et al.*, 2002 30(12):e57). Las tecnologías no basadas en PCR tales como la hibridación de genoma comparativo (CGH) ofrecen otro enfoque a la detección de la aneuploidia (Veltman *et al.*, 2002, Am J Hum Genet 70(5):1269-76; Snijders *et al.*, 2001 Nat Genet 29(3):263-4).

En algunos modos de realización, un ensayo de especies de nucleótidos descrito en las secciones anteriores se puede combinar con una prueba de cromosomas no basada en ácido nucleico secundaria. Los ejemplos no limitantes de pruebas no basadas en ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, amniocentesis invasiva o prueba basada en biopsia de vellosidades coriónicas, una prueba basada en la edad materna, una prueba de cribado de biomarcadores, y una prueba basada en ecografía. Se puede realizar una prueba de cribado de biomarcadores en la que se detecta ácido nucleico (por ejemplo, fetal o materno). Sin embargo, como se usa en el presente documento "pruebas de biomarcadores" se consideran una prueba no basada en ácido nucleico.

La amniocentesis y las pruebas basadas en biopsia de vellosidades coriónicas (CVS) ofrecen un diagnóstico prenatal relativamente definitivo de las aneuploidias fetales, pero requieren un muestreo invasivo por amniocentesis o biopsia de vellosidades coriónicas (CVS). Estos procedimientos de muestreo están asociados con un riesgo de aborto relacionado con el procedimiento de un 0,5 % a un 1 % (D'Alton, M. E., Semin Perinatol 18(3):140-62 (1994)).

Aunque se han empleado diferentes enfoques en relación con aneuploidias específicas, en el caso del síndrome de Down, inicialmente el cribado se basó totalmente en la edad materna, usando un valor de corte arbitrario de 35 años para definir una población de mujeres con un riesgo suficientemente alto para justificar el ofrecimiento de pruebas fetales invasivas.

Los biomarcadores maternos ofrecen otra estrategia para la prueba del síndrome de Down fetal y otras aneuploidias cromosómicas, en base al perfil proteínico de un líquido biológico materno. "Biomarcadores maternos" como se usa en el presente documento se refiere a biomarcadores presentes en una mujer embarazada con un nivel de ARNm transcrito o nivel de una proteína traducida que se detecta y se puede correlacionar con la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica.

Se introdujeron técnicas de cribado de suero en el segundo trimestre para mejorar la tasa de detección y para reducir la tasa de pruebas invasivas. Un tipo de cribado para el síndrome de Down requiere ofrecer a las pacientes una prueba de suero de triple marcador entre las 15 y 18 semanas de gestación, que, junto con la edad materna (MA), se usa para el cálculo del riesgo. Esta prueba somete a ensayo la alfa-fetoproteína (AFP), gonadotropina coriónica humana (beta-hCG) y estriol no conjugado (uE3). Esta "triple criba" para el síndrome de Down se ha modificado como "prueba cuádruple", en la que el marcador sérico inhibina-A se somete a prueba en combinación con los otros tres analitos. Se han identificado concentraciones en el primer trimestre de una variedad de proteínas y hormonas asociadas al embarazo que difieren en embarazos cromosómicamente normales y anómalos. Los dos marcadores séricos en el primer trimestre que se pueden someter a prueba para determinar el síndrome de Down y el síndrome de Edwards son PAPP-A y .beta.hCG libre (Wapner, R., *et al.*, N Engl J Med 349(15):1405-1413 (2003)). Se ha informado de que los niveles séricos en el primer trimestre de PAPP-A son significativamente menores en el síndrome de Down, y esta disminución es independiente del grosor de translucidez nuchal (NT) (Brizot, M. L., *et al.*, Obstet Gynecol 84(6):918-22 (1994)). Además, se ha demostrado que los niveles séricos en el primer trimestre de .beta.hCG tanto total como libre son mayores en el síndrome de Down fetal, y este incremento también es independiente del grosor de NT (Brizot, M. L., Br J Obstet Gynaecol 102(2): 127-32 (1995)).

Las pruebas basadas en ecografía proporcionan un enfoque no molecular para diagnosticar anomalías cromosómicas. Determinadas anomalías estructurales fetales están asociadas con incrementos significativos en el riesgo de síndrome de Down y otras aneuploidias. Se han realizado trabajos adicionales que evalúan el papel de los marcadores ecográficos de aneuploidia, que no son anomalías estructurales *per se*. Dichos marcadores ecográficos empleados en el cribado del síndrome de Down incluyen quistes en plexo coroideo, intestino ecogénico, fémur corto, húmero corto, hidronefrosis mínima, y pliegue nuchal engrosado. Se ha informado de una tasa de detección de un 80 % para el síndrome de Down por una combinación de cribado de MA y evaluación con ultrasonidos en el primer trimestre del feto (Pandya, P. P. *et al.*, Br J Obstet Gynaecol 102(12):957-62 (1995); Snijders, R. J., *et al.*, Lancet 352(9125):343-6 (1998)). Esta evaluación se basa en la medida del espacio translúcido entre la parte posterior del cuello fetal y la piel suprayacente, que se ha informado que está incrementado en fetos con síndrome de Down y otras aneuploidias. Esta medida de la translucidez nuchal (NT) se obtiene según los informes por ecografía transabdominal o transvaginal entre las 10 y 14 semanas de gestación (Snijders, R. J., *et al.*, Ultrasound Obstet Gynecol 7(3):216-26 (1996)).

Kits

Los kits a menudo comprenden uno o más recipientes que contienen uno o más componentes descritos en el presente documento. Un kit comprende uno o más componentes en cualquier número de recipientes separados, paquetes, tubos, viales, placas de multipocillos y similares, o los componentes se pueden combinar en varias combinaciones en dichos recipientes. Uno o más de los siguientes componentes, por ejemplo, se pueden incluir en un kit: (i) uno o más cebadores de amplificación para amplificar una especie de secuencia de nucleótidos de un conjunto, (ii) uno o más cebadores de extensión para discriminar entre especies de ácidos nucleicos amplificados o especies de secuencias de nucleótidos de cada conjunto, (iii) un soporte sólido para la detección múltiple de especies de ácidos nucleicos amplificados o especies de secuencias de nucleótidos de cada conjunto (por ejemplo, un soporte sólido que incluye una matriz para espectrometría de masas de desorción ionización láser asistida por matriz (MALDI); (iv) reactivos para detectar especies de ácidos nucleicos amplificados o especies de secuencias de nucleótidos de cada conjunto; (v) un detector para detectar las especies de ácidos nucleicos amplificados o especies de secuencias de nucleótidos de cada conjunto (por ejemplo, espectrómetro de masas); (vi) reactivos y/o equipo para cuantificar el ácido nucleico fetal en ácido nucleico extracelular de una mujer embarazada; (vii) reactivos y/o equipo para enriquecer el ácido nucleico fetal a partir de ácido nucleico extracelular de una mujer embarazada; (ix) programa informático y/o una máquina para analizar señales que resultan de un procedimiento para detectar especies de ácidos nucleicos amplificados o especies de secuencias de nucleótidos de los conjuntos; (x) información para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica (por ejemplo, una tabla o archivo que convierte la información de señal en o proporciones en resultados), (xi) equipo para la extracción de sangre; (xii) equipo para generar sangre libre de células; (xiii) reactivos para aislar el ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN) del plasma, suero u orina; (xiv) reactivos para estabilizar el suero, plasma, orina o ácido nucleico para su envío y/o procesamiento.

A veces un kit se utiliza junto con un procedimiento, y puede incluir instrucciones para realizar uno o más procedimientos y/o una descripción de una o más composiciones. Un kit se puede utilizar para llevar a cabo un procedimiento (por ejemplo, usando un soporte sólido) descrito en el presente documento. Las instrucciones y/o descripciones pueden estar en forma tangible (por ejemplo, papel y similares) o formato electrónico (por ejemplo, archivo legible por ordenador en un medio tangible (por ejemplo, disco compacto) y similares) y se pueden incluir en un prospecto del kit. Un kit también puede incluir una descripción escrita de una dirección de internet que proporciona dichas instrucciones o descripciones (por ejemplo, una URL para internet).

Por tanto, se proporciona en el presente documento un kit que comprende uno o más cebadores de amplificación para amplificar una especie de secuencia de nucleótidos de uno o más conjuntos. En algunos modos de realización, se seleccionan uno o más cebadores en el kit de entre los descritos en el presente documento. El kit también comprende una tabla de conversión, programas informáticos, instrucciones ejecutables, y/o una dirección de internet que proporciona lo anterior, en determinados modos de realización, cuando se puede utilizar una tabla de conversión, programas informáticos y/o instrucciones ejecutables para convertir los datos que resultan de la detección de especies de ácidos nucleicos amplificados o especies de secuencias de nucleótidos en proporciones y/o resultados (por ejemplo, probabilidad o riesgo de una anomalía cromosómica), por ejemplo. Un kit también puede comprender uno o más cebadores de extensión para discriminar entre especies de ácidos nucleicos amplificados o especies de secuencias de nucleótidos de cada conjunto, en determinados modos de realización. En algunos modos de realización, un kit comprende reactivos y/o componentes para realizar una reacción de amplificación (por ejemplo, polimerasa, nucleótidos, solución tampón, termociclador, aceite para generar una emulsión).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente como ilustración y no son limitantes. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que se pueden cambiar o modificar para proporcionar esencialmente resultados similares.

Ejemplo 1: Uso de parálogos y el problema de la varianza con muestras que comprenden un molde de ácido nucleico extracelular heterogéneo

Las aneuploidias tales como el síndrome de Down (DS) son trastornos cromosómicos asociados genotípicamente con la duplicación grave o completa de un cromosoma dando como resultado tres (3) copias del cromosoma. En el caso de trisomía 21, la determinación del número de copias de ADN genómico del cromosoma 21 es la etapa principal en el diagnóstico de la T21. Las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento proporcionan una técnica de recuento de cromosomas basada en PCR que utiliza secuencias de nucleótidos genómicas altamente homólogas que se encuentran al menos en dos cromosomas diferentes.

Las secuencias altamente homólogas a menudo son un tipo de duplicación segmentaria genómica que varía de entre uno a cientos de kilobases que presentan un alto grado de homología de secuencia entre múltiples regiones genómicas. Estas secuencias se pueden clasificar como intracromosómicas, dentro del mismo cromosoma, o bien intercromosómicas, dentro de cromosomas diferentes. En determinadas porciones de regiones intercromosómicas altamente homólogas, pueden darse casos en los que sólo existen dos regiones de homología alta en dos cromosomas diferentes, tales como cromosoma 21 y cromosoma 14 como se representa en la figura 1.

Por tanto, se proporcionan especies altamente homólogas de secuencias de nucleótidos que comparten un grado de similitud de secuencia que permite la coamplificación de las secuencias especies. Más específicamente, las secuencias de hibridación de cebadores en el molde de secuencia de nucleótidos, en general, son sustancialmente idénticas y un único par de cebadores de amplificación amplifica de forma reproducible las especies de un conjunto. Cada especie del conjunto comprende una o más diferencias o emparejamientos erróneos de secuencia (en el presente documento también denominados "marcadores") que son identificables, y las cantidades relativas de cada emparejamiento erróneo (o marcador) se pueden cuantificar. Los procedimientos de detección que son altamente cuantitativos pueden determinar con exactitud la proporción entre los cromosomas. Por tanto, la proporción de la primera y segunda secuencia de nucleótidos es proporcional a la dosis de la primera (diana) y la segunda (referencia) secuencias en la muestra. En el caso de más de dos especies en un conjunto, la proporción de las dos o más secuencias de nucleótidos es proporcional a la dosis de las dos o más secuencias diana y de referencia en la muestra.

Debido a su alto grado de similitud de secuencias de hibridación de cebadores, las secuencias de nucleótidos proporcionadas a menudo son moldes útiles para las reacciones de amplificación útiles para determinar dosis relativas del cromosoma y/o región cromosómica en la que se sitúan estas secuencias.

Varianza

Antes de iniciar los experimentos de viabilidad de marcadores, se realizaron una serie de experimentos de investigación y simulaciones para ayudar a calibrar y evaluar el alcance y diseño de este plan de viabilidad de marcadores. Los experimentos teóricos y reales que se usaron para conformar el plan de viabilidad de marcadores incluyeron:

- 1) Simulaciones de la relación entre el porcentaje fetal y la calidad/cantidad de los marcadores sobre la sensibilidad y selectividad de T21
- 2) Experimentos que investigan cómo afecta el formato de 96 pocillos y 384 pocillos a la varianza en el ensayo de marcadores
- 3) Experimentos que investigan cómo se propaga la varianza en el ensayo de marcadores a través de un protocolo estándar TypePLEX®

- 4) Experimentos que investigan cómo afectan los procedimientos experimentales (por ejemplo, día a día, placa a placa) a la varianza en los ensayos de marcadores
- 5) Experimentos que investigan cómo afecta el nivel múltiple a la varianza en el ensayo de marcadores
- 6) Experimentos que investigan cómo afectan las técnicas de amplificación de genoma completo a la varianza en el ensayo de marcadores

Objetivo

Se inició una serie de simulaciones para comprobar la interacción entre la señal de ADN CCF fetal en el historial materno y el número y la calidad de los marcadores en cuestión así como el impacto tanto sobre la sensibilidad como sobre la selectividad de la clasificación de T21.

Resumen experimental

Usando un intervalo dado de contribución de ADN de historial materno y ADN fetal de 1500 copias de ADN total y una contribución fetal de un 15 % y una variación en el ensayo TypePLEX estándar de un 3 % (CV = 3 %), se realizaron simulaciones para determinar el efecto del incremento en el número de marcadores sobre la clasificación de muestras fetales euploides y aneuploides de T21. Manteniendo constantes estos valores se permitió una evaluación general del número y calidad de los marcadores necesarios para lograr diversos puntos de clasificación usando métricas de sensibilidad y selectividad.

Conclusiones

Las simulaciones dieron como resultado una serie de observaciones:

- 1) Un único o unos pocos marcadores es insuficiente para clasificar las muestras aneuploides de T21 a un nivel aceptable (véase la figura 2)
- 2) El incremento en el número de marcadores mejora la clasificación de muestras aneuploides de T21 (véase la figura 2)
- 3) Los marcadores de calidad, aquellos que presentan el CV más bajo, tienen un impacto mayor que el incremento en el número de marcadores (véase la figura 3)
- 4) Un incremento en el porcentaje de ADN fetal de un 10 a un 20 % tiene un gran impacto sobre la sensibilidad y selectividad de los marcadores (véase la figura 3)

Estas simulaciones indicaron unos pocos axiomas que se llevarán a cabo a lo largo de todo el estudio de viabilidad: En primer lugar, la viabilidad de los marcadores debe generar un conjunto muy grande de marcadores de modo que se identifiquen suficientes marcadores de calidad. Específicamente esto quiere decir que los marcadores de todos los demás cromosomas, con la excepción de los cromosomas de determinación sexual X e Y, se incluirán en el procedimiento de cribado. Adicionalmente, las métricas de calidad de los marcadores incluyendo el CV serán fundamentales en el procedimiento de selección de marcadores durante el estudio de viabilidad de FH.

Propagación de la varianza del procedimiento usando bioquímica Sequenom® TypePLEX®

Objetivos

Puesto que el enfoque de ADN altamente homólogo requiere discriminar entre pequeñas diferencias entre las muestras de T21 y normales, es imperativo minimizar la variabilidad de la medida para tener un ensayo con éxito. El propósito de este primer experimento fue el de determinar empíricamente la contribución de cada etapa en el procedimiento TypePLEX (PCR, SAP, extensión de cebador, MALDI-TOF MS) a la variabilidad de medida global. La bioquímica TypePLEX se describe adicionalmente en el ejemplo 3 a continuación.

Resumen experimental

Se creó una placa de PCR de 96 pocillos que consistía en replicados de una sola muestra de ADN_g y un solo múltiple. Se agruparon los pocillos y se volvieron a alicuotar en varias fases del procedimiento post-PCR para medir la varianza de cada etapa de forma secuencial.

Visión general de los resultados

Los diagramas de cajas en la figura 4 muestran la frecuencia de alelos de dos conjuntos diferentes de marcadores con varianza aislada en diferentes etapas en el procedimiento de medida. En ambos casos, las varianzas de las etapas post-PCR son todas muy similares y todas considerablemente menores que la varianza de PCR.

Conclusiones

La etapa de PCR es la que más contribuye a la variabilidad de medida global. Este estudio preliminar sobre la varianza del procedimiento, acoplada con el estudio de 96 frente a 384 pocillos sobre la varianza, indica que minimizar la varianza de marcadores se logra mejor en la etapa de PCR. Como resultado, en esta viabilidad se realizará la PCR en una alícuota mayor de muestra, minimizando la varianza de la muestra, y reduciendo el volumen de reacción de PCR a 96 pocillos de 50 µl la varianza de la reacción. Además, se pueden emplear procedimientos que reducen la variabilidad de amplificación (por ejemplo, se realiza la amplificación en muchos replicados) o que no tienen una etapa de amplificación (por ejemplo, secuenciación y recuento de conjuntos de secuencias altamente homólogas).

Varianza en procedimientos experimentales

10 Objetivos

Medir la variabilidad del procedimiento día a día del mismo conjunto de datos y, en un experimento separado, determinar la variabilidad de la medida del mismo analito durante varios días y varias semanas.

Resumen experimental

15 Durante el transcurso de cuatro días consecutivos, se creó la misma placa de PCR de 96 pocillos que consistía en una sola muestra y solo múltiple, una placa por día. Las cuatro placas se sometieron al procesamiento post-PCR usando los mismos procedimientos y reactivos, pero cada placa se procesó en un día diferente.

Para el segundo experimento, se generó una sola placa de PCR y se procesó siguiendo la PCR. Una vez estuvo listo para detectarse por medidas MALDI, se detectó durante cuatro días por semana hasta cuatro semanas consecutivas, almacenando los productos de extensión a 4 °C entre cada medida.

20 Visión general de los resultados

Se determinó la frecuencia de dos ensayos a partir del experimento de variabilidad día a día. La mediana de frecuencia durante cuatro días consecutivos fue esencialmente la misma para el ensayo 21_13_2FH_13_E3, mientras que el ensayo 21_13_2FH_2_E3 muestra diferencias significativas durante el mismo periodo de tiempo. En otro experimento, se determinó la reproducibilidad de la detección de la misma placa repetidamente durante cuatro semanas. El ensayo 18_13_2FH_28bB_E3 muestra una varianza de frecuencia baja durante el experimento, mientras que un ensayo diferente en la misma placa, 21_13_2FH_2_E3, muestra un rendimiento de variabilidad alto.

Conclusiones

30 Ambos experimentos de variabilidad día a día y reproducibilidad de detección muestran que las medidas de varios ensayos son estables con el tiempo mientras que las medidas de los demás varían muy significativamente, dependiendo del día en que se miden los analitos. En lo que respecta al estudio de viabilidad, se sabe que variabilidad del procedimiento se correlaciona con las propiedades inherentes de los marcadores específicos; por lo tanto, los marcadores que presentan una variabilidad alta se retirarán durante el procedimiento de cribado de marcadores.

Ejemplo 2: Identificación de especies de secuencias de nucleótidos útiles para detectar anomalías cromosómicas

35 Procedimientos

Tras identificar las fuentes de variabilidad en el procedimiento, se identificaron los marcadores adecuados, se cribaron (*in silico*) y se multiplexaron. En primer lugar, se desarrolló un conjunto de programas y comandos para buscar todas las secuencias parálogas (altamente homólogas) del cromosoma diana (por ejemplo, Chr 21) y cromosomas de referencia (por ejemplo, todos los demás cromosomas autosómicos no diana). Se cribaron las secuencias del genoma a partir del ensamblaje Human March 2006 (hg18, NCBI build 36). Para identificar la (s) base(s) polimorfa(s) en las secuencias, se usó se usó dbSNP build 129 (seguido de dbSNP build 130 cuando estuvo disponible).

45 A continuación, se dividió el cromosoma 21 (Chr 21) en fragmentos más pequeños como sondas. Puesto que los ensayos deseados dirigen típicamente longitudes de secuencia de 80-120 pares de bases (pb), se dividió el Chr 21 en fragmentos de 150 pb con 50 pb coincidentes entre fragmentos adyacentes. Este ajuste funcionó bien para el cribado de ensayo manual en el que se añadieron más de 100 pares de bases adicionales de cada extremo a cada tramo de regiones homólogas encontradas. Para capturar las posibles secuencias parálogas cerca del borde de cada región de búsqueda en el cribado de ensayo automático, se usaron todos los fragmentos de 150 pb con 75 pb coincidentes, los fragmentos de 100 pb con 50 pb coincidentes, y finalmente los fragmentos de 100 pb con 75 pb coincidentes. En base a estas diferentes estrategias de cribado y una longitud de amplicón óptima de 100 para ensayos TypePLEX, parecía que la mejor estrategia era dividir el Chr 21 en fragmentos de 100 pb con 75 pb coincidentes.

Se disimularon las secuencias de repetición en cada cromosoma en minúsculas en el genoma y se indicaron las secuencias desconocidas con N. Los fragmentos que contenían sólo secuencias de repetición o N no generaron

secuencias parálogas útiles; por lo tanto, se identificaron y se omitieron.

Se identificaron regiones parálogas únicas del cromosoma 21 en otros cromosomas alineando fragmentos de Chr21 con todos los cromosomas en el genoma (incluyendo Chr21) usando BLAT (herramienta de alineación de tipo BLAST). Se agruparon todos los fragmentos que tienen parálogos con una puntuación de homología de más de un 85 % y una longitud de alineamiento mayor de 75. Se seleccionaron los fragmentos diana que se emparejan con un único cromosoma de referencia. No se incluyeron los fragmentos con múltiples (más de 1) emparejamientos.

A continuación, se identificaron los marcadores de las secuencias parálogas usando el paquete Biostrings en R. Algunas secuencias parálogas derivadas del análisis anterior contenían inserciones grandes en las regiones de homología alta en el cromosoma de referencia. Se filtraron, por tanto, estos tipos de secuencias con el límite de rango de 500 pb en el cromosoma de referencia. A continuación, se fusionaron los segmentos parálogos en una única secuencia si coincidían o estaban cerca entre sí (≤ 100 pb) tanto en el cromosoma Chr 21 (diana) como en el 2nd (referencia). Se identificaron las regiones RepeatMask y SNP de dbSNP 130 en las secuencias de cromosoma y se ocultaron como "N" antes de la alineación. A continuación, se alinearon por pares las secuencias parálogas del cromosoma 21 y del cromosoma de referencia para localizar las ubicaciones exactas de los emparejamientos erróneos. Se pueden encontrar varios emparejamientos erróneos de una única región paráloga. Se preparó cada emparejamiento erróneo como un SNP simulado (o nucleótido con emparejamiento erróneo) en la secuencia para el formato de entrada correcto del programa de diseño de ensayo, y se ocultaron todas las demás posiciones de emparejamiento erróneo en la misma región paráloga como "N" para evitar o reducir la aparición de cebadores de PCR o que el cebador de extensión se diseñe sobre la misma.

Se separaron las secuencias inadecuadas y se agruparon las secuencias restantes en conjuntos de SNP. Los marcadores iniciales contenían todos los sitios de emparejamiento erróneo potenciales dentro de las regiones parálogas, independientemente del contexto de secuencia. La mayoría de las secuencias no se pudieron usar debido a la falta de cebadores de PCR o ubicaciones para el cebador de extensión. Se separaron usando el Assay Designer de Sequenom con parámetros estándar IPLEX® para uniplex. A continuación, los ensayos exitosos para diseños uniplex se pasaron a través programas adicionales (RealSNP PleXTEND de Sequenom) para garantizar que los cebadores de PCR y extensión tuvieran una alta especificidad por las secuencias diana y de referencia. A continuación, se clasificaron las secuencias en primer lugar por el segundo cromosoma y a continuación, por la posición de variación de secuencia en el Chr 21. Se generaron los ID de secuencia por la siguiente convención: 2FH[letra de versión]_21_[número 2º chr]_[índice de secuencia], donde [letra de versión] es una letra que indica la versión para el esfuerzo de cribado, [número 2º chr] es el número del segundo cromosoma en dos dígitos e [índice de secuencia] es el índice de secuencia reiniciado para cada cromosoma en formato de tres o cuatro dígitos completado con ceros.

En otra consideración, los marcadores que no estaban muy próximos entre sí no se plexaron en el mismo pocillo debido a la amplificación cruzada. En primer lugar, se clasificaron todas las secuencias por la posición del marcador posición en el cromosoma 21. A cada secuencia se le asignó un ID de conjunto de SNP (SNP set ID), y a los marcadores dentro de una distancia de menos de 1000 pb se les asignó el mismo ID de conjunto de SNP. Los ID de conjunto de SNP se pudieron comprobar por Assay Designer para garantizar que los ensayos con el mismo ID de conjunto de SNP se colocarían en pocillos diferentes. Es posible que los marcadores separados más de 1000 pb del cromosoma 21 se asignen a otro cromosoma con una distancia menor de 1000 pb. Sin embargo, si sucede que se diseñan en el mismo pocillo, la realización de los ensayos a través de PleXTEND podrá identificarlos exitosamente.

Resultados

La tabla 3 resume los resultados del cribado de marcadores para el cromosoma 21. Inicialmente se usaron sondas de fragmentos de 150 pb con 50 pb coincidentes del cromosoma 21. Esta estrategia proporcionó 3057 regiones homólogas, de las que se descubrieron 7278 marcadores (secuencias con emparejamiento erróneo de nucleótidos o "SNP simulados") para el cromosoma 21 frente a otro cromosoma autosómico. Las consideraciones del diseño de ensayo uniplex para estas secuencias mostró que se pudieron diseñar 1903 secuencias mientras que 5375 no pudieron (73,9 %), principalmente debido a la falta de cebadores de PCR o cebador de extensión adecuados.

A continuación, se realizó el cribado con sondas de 150 pb con 75 pb coincidentes, sondas de 100 pb con 50 pb coincidentes y finalmente sondas de 100 pb con 75 pb coincidentes. Las sondas de 100 pb con 75 pb coincidentes proporcionaron una cobertura casi completa de todas las regiones homólogas del cromosoma 21 frente al genoma completo. Con estas sondas, se descubrió que 2738 secuencias fueron exitosas para el diseño uniplex con SNP de dbSNP 129 anotados en las secuencias. Puesto que dbSNP 130 contiene más SNP de dbSNP 129, se descubrió que sólo 2648 secuencias fueron exitosas para el diseño uniplex con esta nueva base de datos. Se realizaron 2648 ensayos uniplex a través de PleXTEND de realSNP. Se descubrió que tres ensayos tienen extensiones falsas (diana inválida para el cebador de extensión de amplicones producidos por el par de cebadores), y 216 ensayos tienen 3 o más resultados positivos por el par de cebadores de PCR. 2429 ensayos tienen 2 resultados positivos buscados en el genoma (uno en el cromosoma 21 y uno en otro cromosoma autosómico)

Las sondas más cortas y las coincidencias más largas dieron como resultado dianas de ensayo más exitosas. Véase la tabla 3. Sin embargo, las sondas más largas y las coincidencias más cortas produjeron algunas secuencias

exitosas adicionales que no estaban presentes en la criba final con sondas de 100 pb y 75 pb coincidentes. Estas secuencias se añadieron al conjunto de secuencias final. El número final de marcadores únicos para el cromosoma 21 y el cromosoma autosómico de referencia fue de 2785. Excluyendo los resultados positivos falsos y resultados positivos de 3+, hubo 1877 marcadores disponibles para la criba del ensayo de T21. Estos 1877 marcadores transfirieron para un diseño de ensayo MassEXTEND de Sequenom adicional.

En la tabla 3, las diferentes versiones (A, B, C, etc.) se refieren a diferentes longitudes de sonda con respecto a coincidencia. Se proporciona el número de secuencias que cumplen los criterios para cada versión así como el número que no los cumplen.

TABLA 3 – Resultados de identificación de especies de secuencias de nucleótidos

	versión	A	B	C	E	F	2FH21F
Criba de marcadores	Chr21 longitud fragmento/ coincidencia	150/50	150/75	100/50	100/75 repetición dbSNP 129	100/75 repetición dbSNP 130	Secuencias finales (100/75 repetición más adicionales de la criba anterior)
	región de entrada	3057	3697	6096	12606	12606	
	sec. SNP simulado de salida	7278	8082	9150	12650	12533	
Criba de ensayo diseñable	Fallo por Assay Designer	5375	6060	6922	9912	9885	
	% fallo	73,9 %	75,0 %	75,7 %	78,4 %	78,9 %	
	Diseño uniplex	1903	2022	2228	2738	2648	2785
	Adicionales	76	48	13	/	/	
PleXTEND	Número de resultados positivos	1	1	1	3	3	
	Número de 0 resultados positivos	0	0	0	0	0	
	Número de 1 resultado positivo	44	66	69	0	0	
	Número de 2 resultados positivos	1788	1875	2047	2519	2429	1877 (excl H.PCR > 300)
	Número de 3+ resultados positivos	70	80	111	216	216	

Ejemplo 3: Diseño de ensayo para especies de secuencias de nucleótidos útiles para detectar anomalías cromosómicas

Introducción

A continuación se muestra una explicación detallada del procedimiento usado para diseñar ensayos MassEXTEND® para someter a prueba la trisomía del cromosoma 21 (fetal), realizado en la plataforma MassARRAY® de Sequenom.

La sección de *Antecedentes* analizará en primer lugar los problemas del diseño de ensayo generales y sus soluciones semiautomáticas usando un programa informático desarrollado en Sequenom. A continuación, se analizará la similitud y las diferencias en la aplicación de estas soluciones con respecto a la cuantificación de señales de marcadores para regiones altamente homólogas (parálogas). La sección *Procedimientos* analizará en primer lugar el procedimiento de diseño general, como se desarrolló para el panel de prueba inicial usando ensayos 'mix-1', y cómo el análisis de los resultados experimentales dio lugar a parametrización adicional. A continuación, se detallarán los procedimientos específicos de los procedimientos de diseño usados para generar los ensayos TypePLEX. La sección *Resultados* presenta un resumen de los diseños de ensayo TypePLEX 2FH de T21.

Antecedentes

Los ensayos MassEXTEND típicos se diseñan y se realizan para analizar polimorfismos mononucleotídicos (SNP) en muestras de ADN. Con respecto al diseño de ensayo, la primera tarea es la amplificación de una región corta que flanquea el sitio del SNP usando PCR. A continuación, un cebador de sonda específico (alias *cebador de extensión*) se hibrida a la secuencia amplificada adyacente al sitio de SNP y se extiende por incorporación de una especie de nucleótido que lee (complementa) el nucleótido específico en ese sitio. Los cebadores de sondas extendidos resultantes (analitos) se identifican posteriormente por la intensidad de su señales de masa esperada (máximos) en un espectro de masas de los productos de reacción MassEXTEND cristalizados. Un ensayo de fenotipado típico

buscará uno de dos nucleótidos alternativos (alelos) en ADN diploide de modo que se identifique un único máximo, para una muestra homocigótica, o se identifican dos máximos de igual intensidad, para una muestra heterocigótica. Más en general, las intensidades de señal se pueden usar como una medida de la frecuencia relativa de los alelos, por ejemplo, cuando se consideran muestras agrupadas, y la variación de secuencia puede ser más compleja, por ejemplo, un SNP trialélico, INDEL (inserción/delección) o MNP (polimorfismo mononucleotídico múltiple), siempre que los alelos individuales se puedan distinguir únicamente por una única extensión de base (SBE) de la sonda. Para el resto de este informe, el término 'SNP' se usará más en general, para referirse a cualquier variación de secuencia específica ente secuencias homólogas.

Para un único diseño de ensayo MassEXTEND la principal preocupación es con el diseño de cebadores oligonucleotídicos. Cada secuencia de cebador se debe hibridar a su diana específicamente y con suficiente fuerza, como se estima por su temperatura predecida de hibridación (T_m). En particular, debe haber pocas posibilidades de un *extensión falsa*, es decir, que los cebadores se puedan dirigir a un sitio de extensión alternativo o extenderse frente a ellos a través de subestructuras de horquilla o de cebador-dímero relativamente estables. Sin embargo, es relativamente ineficaz y poco económico analizar múltiples SNP en pocillos separados de una placa MassARRAY, y por tanto el problema más general para el diseño de ensayo es crear conjuntos de ensayos de SNP que se puedan realizar en paralelo en el mismo espacio de reacción. Este procedimiento se denomina diseño de ensayo *multiplexado*.

El primer reto para el diseño de ensayo multiplexado es el de garantizar que todas las señales de masa esperadas de los ensayos individuales en un pocillo, incluyendo los de analitos, sondas no extendidas y subproductos previstos tales como aductos de sal, se resuelvan suficientemente bien en un intervalo de masas limitado de un espectro de masas individual. Puesto que el cebador de sonda se debe hibridar adyacente al sitio de SNP, la libertad para diseñar ensayos para multiplexación de masa está restringido al ajuste de las longitudes de cebadores y, en la mayoría de los casos, al diseño en el sentido directo o inverso de la secuencia de SNP dada. Se pueden usar opciones de diseño adicionales, tales como añadir identificadores de masa en 5' variables, para incrementar esta libertad. Una consideración igualmente importante es el potencial adicional para una extensión falsa de los cebadores de ensayo individual con respecto a seleccionar como diana cualquier otro cebador o producto de amplificación de los ensayos con los que se multiplexan. Estos problemas se pueden evitar o minimizar considerando combinaciones alternativas de secuencias de SNP para someter a ensayo en el mismo pocillo. Otros factores usados para evaluar (es decir, puntuar) diseños de ensayos multiplexados alternativos ayudan a evitar efectos competitivos que podrían sesgar de forma adversa el rendimiento de algunos ensayos sobre otros, por ejemplo, favorecer multiplexos en los que la longitud del amplicón y los valores de T_m del cebador de PCR tienen al menos una variación entre ensayos. Por lo tanto, dadas cantidades mayores de SNP, el objetivo típico para el diseño de ensayo multiplexado es el de crear el menor número de pocillos que contengan el mayor número de ensayos posible, asegurando al mismo tiempo que cada pocillo es una alternativa de alta puntuación con respecto a las características del diseño de ensayo individual y multiplexado.

Se ha realizado de forma rutinaria el diseño de ensayo multiplexado automático usando el programa informático MassARRAY Assay Design desde 2001. Hasta la fecha, se han validado de forma experimental una gran cantidad de diseños de ensayo producidos por el programa informático. Las mejoras en el programa informático, química y todos los aspectos del procedimiento experimental y análisis de los datos, permiten en la actualidad que la plataforma MassARRAY de Sequenom mida proporciones de alelos con alta exactitud a niveles de multiplexación de ensayo relativamente altos. El uso de un programa de ordenador para diseñar ensayos elimina todo el potencial de error humano y garantiza que se eviten muchos problemas presuntos y observados del diseño de ensayo MassEXTEND multiplexado. Sin embargo, aún es bastante común que una fracción de los ensayos presente un rendimiento relativamente malo en aplicación. Los ensayos individuales pueden mostrar señales de alelos heterocigóticos altamente sesgadas, pérdida inesperada de heterocigosis o incluso no producir ningún producto de extensión. En la mayoría de los casos, se cree que el motivo para un mal rendimiento de ensayo es biológico, es decir, debido a la validez general de las secuencias de SNP dadas más que a una limitación en su diseño de ensayo posterior. Por ejemplo, una secuencia dada puede ser inexacta cuando se compara con el ensamblaje del genoma actual o la región de interés puede contener otros SNP que no estaban demarcados, evitando así que el programa informático Assay Design diseñe cebadores de forma involuntaria sobre estas ubicaciones. Se puede diseñar cualquiera o ambos cebadores de PCR para las regiones que no son específicas para el genoma debido a que, por ejemplo, coinciden con una secuencia alu, se someten al polimorfismo en el número de copias o son paralogas a otras regiones en el genoma.

El procedimiento de diseño de ensayo está asistido por validación bioinformática adicional; en particular el uso del conjunto eXTEND Tool en el sitio web de Sequenom RealSNP para preparar secuencias de SNP de entrada y validar el diseño de ensayo multiplexado frente al genoma humano (Oeth P *et al.*, *Methods Mol Biol.* 2009;578:307-43). La primera fase de la validación de la secuencia de SNP de entrada usa la aplicación ProxSNP para comparar por BLAST las secuencias frente a la secuencia Golden Path actual (ensamblaje del genoma humano consenso). Las secuencias que tienen una homología alta exactamente con una región del genoma se reformatean para incluir los códigos de carácter de la IUPAC en sitios en los que se registran otros SNP (proximales) o 'N' para indicar emparejamientos erróneos con la secuencia genómica o bases desconocidas. Se recomienda que las secuencias de SNP reformateadas se proporcionen a continuación a la aplicación PreXTEND para validación adicional y el diseño de cebadores de PCR frente al genoma. Esta aplicación usa en primer lugar el mismo procedimiento para

seleccionar pares de cebadores de PCR que el programa informático Assay Design pero genera, por defecto, 200 de los diseños de amplicón con mejor puntuación en lugar de sólo el diseño de puntuación superior. A continuación se someten a prueba usando la herramienta eXTEND que busca tripletes de cebador; dos cebadores de PCR y la secuencia directa o bien inversa adyacente al SNP de ensayo. Si un triplete de cebador coincide con el genoma exactamente una vez con las orientaciones de sentido y posiciones relativas esperadas, la secuencia de SNP de entrada se reformatea de modo que las secuencias de cebadores de PCR alineadas se demarcan para el diseño de ensayo constreñido posterior. En este caso, típicamente, todas o la mayoría de las elecciones de cebadores de PCR alternativas también se alinean frente a la misma región del genoma, y así se selecciona el par de cebadores de PCR de mayor puntuación. El criterio de puntuación está dominado por la consideración del número y tipos de coincidencias cambiantes encontradas para los cebadores de PCR individuales. Típicamente, las secuencias de SNP que tienen problemas para el diseño de cebadores de PreXTEND se eliminan del grupo de SNP de entrada. Las secuencias reformateadas restantes se procesan por el programa informático de diseño de ensayo usando una opción que garantice que el diseño de cebadores de PCR se toma directamente de las secuencias anotadas. De esta manera, se asegura la especificidad de los diseños de ensayo de MassEXTEND con respecto a la selección como diana de una única región del genoma, aunque el polimorfismo en el número de copias, que no está representado en el Golden Path por una secuencia repetida, podría seguir siendo un problema para las regiones seleccionadas como diana. Los diseños de ensayo producidos se pueden validar adicionalmente frente al genoma humano usando la aplicación PleXTEND, que usa la misma herramienta eXTEND que prueba los tripletes de cebadores específicos. Para los ensayos en los que se procesaron por medio de validación PreXTEND, las alineaciones de tripletes de cebador individuales con el genoma deben ser idénticas. Sin embargo, PleXTEND también valida todas las combinaciones de tripletes de cebador posibles en cada multiplexo de ensayos para garantizar que los productos de amplificación no deseados o las dianas de cebadores de sonda no sean un problema significativo.

El diseño de ensayo para detectar diferencias de nucleótidos en secuencias de ADN parálogas es funcionalmente equivalente al diseño de ensayo para SNP en una única región de ADN. Esto es, la secuencia (común) es única con respecto al diseño de cebador seleccionado y la variación en la posición equivalente en esta secuencia se representa por el formato de SNP de Sequenom. En lugar de amplificar una única región de ADN (diploide) que contiene el SNP seleccionado por sonda, dos regiones parálogas en diferentes cromosomas se amplifican de forma equivalente por los mismos cebadores de PCR y el cebador de sonda selecciona como diana de forma equivalente el sitio específico de variación (secuencias con emparejamiento erróneo de nucleótidos) en cada una de las regiones amplificadas. Para las regiones parálogas sometidas a ensayo, el sitio de variación es un marcador específico para el cromosoma particular amplificado, estando siempre una región diana en el cromosoma 21 para el estudio actual. Por tanto, al contrario que con los ensayos de SNP tradicionales, siempre se espera que estos ensayos den resultados heterocigóticos y se denominan ensayos 'heterocigóticos fijos' o '2FH', en los que el '2' se refiere a la selección como diana exactamente de dos regiones parálogas que son únicas para (dos) cromosomas diferentes. Las regiones parálogas no tienen que ser completamente homólogas en las regiones que flanquean la variación seleccionada siempre que los cebadores diseñado sean específicos para estas regiones, y la amplificación se produce de manera sustancialmente reproducible con una eficacia sustancialmente igual usando un único par de cebadores para todos los miembros del conjunto. Otros sitios de variación entre secuencias parálogas, y cualquier otro SNP dentro de cualquier región, se deben indicar como SNP proximales de modo que los cebadores no se diseñen sobre estas ubicaciones. De hecho, las regiones parálogas típicamente tienen varios sitios adecuados para dichos marcadores, y las secuencias de SNP correspondientes proporcionadas para cada región paróloga del cromosoma 21 son idénticas excepto por el sitio de marcador particular formateado como el ensayo SNP.

Debido a que las regiones seleccionadas no son únicas para el genoma, el conjunto de herramientas eXTEND actual (ProxSNP y PreXTEND) no se puede usar para anotar secuencias de 'SNP' 2FH. En su lugar, estas secuencias se preparan como se describe anteriormente en el ejemplo 2. Sin embargo, la herramienta PleXTEND eXTEND es de mayor importancia para validación de modo que los ensayos multiplexados diseñados por el programa informático seleccionan específicamente de forma exacta las dos regiones parálogas destinadas y se detectan esos problemas de amplificación cruzada potenciales debido a la multiplexación de los cebadores de PCR. La aplicación PleXTEND, en combinación con el programa informático de diseño de ensayo, también se usa en la selección del conjunto de secuencias de SNP parálogas usadas para el diseño de ensayo, como se describe en la sección de *Procedimientos* a continuación.

Al igual que con la detección de un caso de SNP heterocigótico en un par de cromosomas autosómico, se asume que las regiones que contienen la variación de marcador se coamplifican y producen señales de masa de intensidades idénticas, admitiendo una cierta variación estadística debido al procedimiento experimental. En la práctica, los mismos problemas que provocan las variaciones de las proporciones de intensidad de señal 1:1 observadas para los ensayos de SNP de muestras heterocigóticas se aplican a los ensayos de 2FH, con la posibilidad adicional de sesgo específico de cromosoma. Para el diseño de ensayo 2FH de T21 (trisomía de cromosoma 21), los requisitos para la sensibilidad y especificidad son mayores que para un experimento de alelotipado de MassEXTEND estándar. En particular, la medida de proporciones de alelo debe ser lo suficientemente exacta para detectar la contribución de alelos heterocigóticos aneuploides (trisómicos) del ADN fetal superpuesta sobre las señales de alelos 2FH del ADN materno. Por tanto, los criterios de diseño para los efectos que podrían dar como resultado posiblemente un sesgo de alelos (específico de muestra) se establecen para que sean más

restrictivos que para el diseño de ensayo multiplexado estándar. El uso de restricciones de diseño de ensayo más rigurosas es viable debido a que el número de secuencias de SNP paralogas proporcionadas por el diseño de ensayo inicial (~2000) es considerablemente mayor que el número requerido para la validación experimental inicial (~250).

- 5 Adicionalmente, se prevé que parte (la mayoría) de los ensayos de funcionamiento pueden que no cumplan aún los requisitos de sensibilidad y especificidad o sean de otro modo menos adecuados. Por tanto, a partir de una prueba inicial de un gran número de ensayos TypePLEX (por ejemplo 10x25plexos) los 'mejores' ensayos se seleccionarán y se rediseñarán por el programa informático usando una opción de 'replexado' para crear el número seleccionado de ensayos. El objetivo final es el de crear de 50 a 60 ensayos validados en tres pocillos para someter a prueba la trisomía del cromosoma 21. Este número de ensayos es para incrementar la sensibilidad de detección de variaciones de alelos fraccionados en un historial de experimentación, y quizás variaciones biológicas.

Procedimientos

- 15 Se concibió el procedimiento actual para la selección de secuencias paralogas 2FH de T21, el diseño de ensayo y la validación de ensayo sobre una serie de iteraciones que culminaron en la prueba de 250 ensayos frente a un ADN de muestra y un panel de 56 ensayos frente a muestras de plasma euploides y aneuploides. Estas pruebas emplearon una mezcla de terminador SBE (extensión de base individual) ligeramente diferente para el panel final basado en ensayos TypePLEX de Sequenom. La viabilidad de estos ensayos se analizó y las clasificaciones de ensayo posteriores se consideraron para las correlaciones para los criterios de diseño de ensayo determinables. Como consecuencia, algunas restricciones del diseño de ensayo adicionales se especificaron para el diseño de ensayo TypePLEX. Un resumen de los procedimientos generales usados para crear el panel de ensayo "mix-1" original y las conclusiones relevantes de este estudio se presentan en el presente documento, seguido de una explicación más detallada de los procedimientos usados para el diseño de ensayo TypePLEX.

Resumen del diseño de panel de prueba "mix-1" 2FH y evaluación

- 25 Se crearon los diseños de ensayo 2FH originales usando una versión modificada de la versión más reciente del programa informático Assay Design (v4.0.0.4). Esta versión modificada del programa informático (v4.0.50.4) permitió un diseño de ensayo para la química SBE "mix-1", que usa una mezcla de desoxi-nucleótido-trifosfatos (dNTP) y aciclo-nucleótido-trifosfatos (acNTP) estándar. Además, esta versión se modificó para permitir el diseño de ensayo de SNP sólo de A/G y C/T. Esto fue para garantizar que un par de alelos no requiriera extensiones de sondas tanto de dNTP como acNTP, lo que sería una fuente probable de sesgo alélico. La restricción impuesta también rechazó un pequeño número de las secuencias 2FH de entrada que eran variaciones paralogas de INDEL o MNP.

- 35 Los esfuerzos iniciales en el diseño de ensayo para los marcadores 2FH seleccionados dio como resultado ensayos multiplexados que no dieron la especificidad esperada para el genoma humano cuando se validó usando la herramienta de internet PleXTEND. Algunos de los ensayos seleccionaron más o menos regiones que las dos esperadas para las secuencias 2FH. Como resultado, el cribado inicial para las secuencias paralogas adecuadas implicó una etapa de filtración adicional que empleaba la versión modificada del programa informático para diseñar ensayos uniplex que se cribaron adicionalmente usando PleXTEND. Todas las secuencias que tenían ensayos que no asignaron exactamente las dianas de cromosomas esperadas se desearon del conjunto de marcadores 2FH. Se desearon de forma similar los marcadores para los ensayos que dieron resultados positivos nulos para el genoma, es decir, ensayos que amplificarían una región que contenía una secuencia diana de sonda adecuada. Para garantizar la especificidad del cebador de PCR para el genoma, se redujeron adicionalmente los marcadores seleccionados a los que sólo tenían ambos cebadores de PCR que individualmente dieron 300 o menos coincidencias para el genoma. Los ajustes por defecto para una prueba PleXTEND usan criterios poco precisos para la alineación de cebadores de PCR: Se registra una coincidencia para un cebador dado usando las 16 bases más cercanas a 3°, que contiene hasta un emparejamiento erróneo de bases después de las primeras 3 bases más cercanas a 3°. La realización de PleXTEND usando las 18 bases más cercanas a 3° de los cebadores de PCR (sin emparejamientos erróneos) confirmó que los cebadores de PCR diseñados para las secuencias de 2FH restantes eran bastante específicos para las regiones amplificadas, devolviendo pocos ensayos más de 2 resultados positivos para ambos cebadores de PCR.

- 50 Se proporcionó un total de 1877 secuencias de SNP paralogas para el diseño de ensayo compuestas de la criba 2FH21F final más 56 secuencias de cribas anteriores (véase el ejemplo 2). Posteriormente se retiraron cinco secuencias, todas de las cribas previas, como resultado del cribado para ensayos que podían seleccionar como diana preferencialmente una región paraloga del genoma debido a variaciones de secuencia, dependiendo de la dirección del diseño de ensayo seleccionada. De las 1872 secuencias paralogas usadas para diseño de ensayo, sólo 1015 fueron diseñables para los ensayos mix-1. La mayoría de las secuencias 2FH que fracasaron en el diseño de ensayo (817 de 857) lo hicieron debido a la restricción de la secuencia de entrada para los SNP [A/G] o bien [C/T].

El objetivo para esta parte del procedimiento de diseño de ensayo inicial fue el de crear tantos ensayos 25-plexos como fuera posible usando ajustes de diseños estándar con restricciones adicionales, como se usa y se describe en detalle para la creación de ensayos TypePLEX en la siguiente sección. En particular, la opción para extender las secuencias de sondas usando bases sin molde se inhabilitó para evitar la posibilidad de una adición de bases sin

molde que se produjo al coincidir en realidad un SNP o variación paróloga en un sitio diana, como se identificó previamente como una excepción rara para diseños previos que dieron como resultado valores verdaderos de PleXTEND inesperados (<2). A pesar del incremento en las restricciones en cuanto al diseño de ensayo, se creó un rendimiento relativamente alto de ensayos mix-1 25-plexos para las secuencias diseñables debido a la diferencia de masa pequeña entre las masas de los analitos A/G y C/T (15 Da y 16 Da respectivamente).

Un criterio importante para el diseño de ensayo 2FH es que ningún diseño de pocillo múltiple debe tener más de un ensayo que seleccione una región paróloga del cromosoma 21 particular. Para cada par de regiones parálogas existen típicamente múltiples sitios de variación de secuencia que son adecuados para el diseño de ensayo MassEXTEND. Si se diseñaron dos ensayos en el mismo pocillo para la misma región, entonces podría haber una competición entre los cebadores de PCR que intentan amplificar dentro de estas regiones pequeñas del genoma. Para evitar esto, cada región paróloga del cromosoma 21 se indica con un único valor de SNP_SET. El archivo de grupo SNP proporcionado incluye un campo SNP_SET y es tal que cada variación paróloga para el mismo valor de SNP_SET se da un único SNP_ID y selecciona sólo una variación de secuencia paróloga. Cada sitio de variación específico está indicado por el formato SNP de ensayo, con todas las demás variaciones demarcadas como SNP proximales ('N'). La exclusión de ensayos en multiplexos en base a su valor SNP_SET se logra a continuación usando el programa informático Assay Design 4.0 con la característica *SNP Representation: Once per well (Una vez por pocillo)*.

Una preocupación secundaria inicial fue la de garantizar que algunos diseños múltiples dieran tanta cobertura de cromosomas parálogos como fuera posible. Para lograr esto, se edita una copia del archivo de grupo de SNP para usar el ID de cromosoma parólogo como los valores SNP_SET. Se usó esta entrada para producir diseños de pocillo de hasta 21-plexos en los que cada ensayo de miembro selecciona una región paróloga en un cromosoma diferente (1-20, 22). Los primeros 10 pocillos se retuvieron en una copia del diseño de grupo de ensayo resultante y a continuación se 'superplexaron' hasta el nivel de 25-plexos en una serie de segundo diseño de ensayo frente al archivo de grupo de SNP original, que contiene los índices chr21 como los valores SNP_SET. El diseño de ensayo superplexado es la opción de programa informático para diseñar nuevas secuencias de SNP de entrada para añadir a los diseños de ensayo existentes, según sea posible, o para crear nuevos diseños de pocillo adicionales. Puesto que la definición de la agrupación SNP_SET sólo se especifica por el archivo de grupo de SNP, el resultado neto es un conjunto de diseños de pocillo que contiene 25 (o menos) ensayos, que cada uno debe seleccionar una región paróloga del cromosoma 21 diferente (SNP_SET) y en el que los primeros 10 multiplexos tienen el número máximo de ensayos que seleccionan regiones en cromosomas parálogos diferentes.

La estrategia de diseño de dos pasos permite una mayor elección cuando se escoge un número limitado de diseños de pocillo para someter a prueba. Para los diseños mix-1, se crearon treinta y un pocillos 25-plexos, de los que se seleccionaron 10 incluyendo los primeros cuatro pocillos que contenían al menos un ensayo que seleccionó cada uno de los 21 cromosomas parálogos (1-21, 22). El análisis de los resultados experimentales para estos diez 25-plexos para muestras euploides dio lugar a una clasificación de calidad de los ensayos individuales. Se eligieron tres pocillos para ensayar frente a muestras de tejido de plasma, incluyendo los primeros 25-plexos y 19-plexos diseñados empleando la opción de diseño re-multiplexo repleto del programa informático Assay Design de los ensayos para los 50 ensayos de modelo mejor clasificados.

El análisis de RMS simple que usa clasificaciones de curvas del ensayo de modelo frente a varias características del diseño de ensayo mostró algunas tendencias esperadas muy generales, pero no una correlación significativa en base a los valores de R^2 . Las características de diseño consideradas incluyeron T_m de hibridación de sonda predecida; longitud de sonda; porcentaje de contenido de secuencia GC en ambas secuencias de sonda y amplicón; el número y la gravedad de las advertencias del diseño de ensayo individual; longitud de amplicón y variación de la longitud de amplicón parólogo; el número de variaciones parálogas tanto en los amplicones como en la región SNP_SET; y la masa de sonda. La falta de correlación del rendimiento de ensayo para someter a ensayo las características de diseño indicó que no fue necesario ninguna restricción adicional en cuanto al diseño de ensayo 2FH futuro con respecto a estas características. En particular, no fue necesario reducir el límite de masa superior (8.500 Da) para el diseño de analito de ensayo, lo que podría ocasionar una reducción en los niveles de multiplexación alcanzables.

También se observó una falta de correlación para el rendimiento de ensayo cuando se consideraron las cantidades (en exceso) de resultados positivos de los cebadores de PCR para el genoma, como se informó por el análisis PleXTEND en varios ajustes coincidentes de cebador de PCR y sonda. La mayoría de estos datos se recopilaron para todos los treinta y uno diseños 25-plexos y se proporcionaron para ayudar en la selección de los ensayos del conjunto de modelo inicial. Sin embargo, esta información no proporcionó una métrica clara para elegir entre diferentes multiplexos y por lo tanto, no se consideró en la selección de los 10 pocillos de modelo. La posterior falta de correlación para la especificidad relativa de las secuencias de PCR p./sds3fdrimer indica que la filtración inicial de secuencias 2FH para el diseño de ensayo no requiere restricciones adicionales en base al número de alineaciones de cebadores de PCR para el genoma. El análisis PleXTEND de los diseños de pocillos candidatos reveló que tres pocillos 25-plexos tenían posibilidad de tener problemas de amplificación cruzada entre pares de ensayos. La amplificación cruzada se puede producir cuando los cebadores de PCR de dos ensayos diferentes en el mismo pocillo podrían amplificar una región no deseada que puede contener o no una diana para una sonda en cualquier ensayo. Los ensayos que tuvieron este problema eran de SNP_SET que estaban cerca del valor del índice. Aunque

la separación entre estas regiones parálogas está relativamente lejos del cromosoma 21 (pocillo con exceso de 1.000 bases), las regiones parálogas en los segundos cromosomas resultaron ser considerablemente menores (solo 100-500 bases) de modo que se detectó una superposición de los diseños de amplicón deseados por PleXTEND. No se seleccionó ninguno de los tres pocillos que contenían estos ensayos para el ensayo de modelo. Sin embargo, un problema similar que se produjo en los ensayos replexados que seleccionaron el mismo SNP_SET parecía que mostraba pruebas de que la amplificación cruzada era un problema.

La mayor correlación del rango de rendimiento de ensayo para características de diseño se indicó para la puntuación de confianza de PCR (UP_CONF) y la T_m mínima predecida (para hibridación diana) para cualquiera de los cebadores de PCR de un ensayo, que es un componente clave del cálculo de UP_CONF. Esta correlación fue mayor cuando la T_m mínima predecida para los cebadores de PCR se representó gráficamente frente al rendimiento de extensión de sonda y tasa de aviso para los ensayos. No estaba previsto que algunos de estos cebadores de PCR se diseñaran con T_m de hasta 20 °C por debajo del valor diana óptimo de 60 °C y fue el resultado de una elección limitada para el diseño de cebadores en algunas hebras de entrada debido a una densidad relativamente alta de demarcaciones de SNP proximales. En consecuencia, los ajustes para la T_m de diseño de cebadores de PCR mínima se estableció a 50 °C para el diseño de ensayo TypePLEX.

Se observó otra correlación aparente del rango de rendimiento de ensayo con respecto al índice SNP_SET. Los ensayos del índice SNP_SET de 1 a 44 parecían clasificaciones más consistentemente moderadas o malas. Estas regiones fueron las más próximas al extremo telomérico 5' del cromosoma 21 e incluyeron todas las regiones parálogas al cromosoma 22. Los ensayos del conjunto de modelo que seleccionaron el cromosoma 22, y también posiblemente los cromosomas 20, 17 y 16, parecían tener clasificaciones más consistentemente moderadas o malas, y puede ser una indicación de la degradación específica de cromosoma. Sin embargo, un 25 % de las secuencias parálogas de 2FH fueron miembros de los SNP_SET del índice 1 a 44, y un diseño de prueba sin estas secuencias en el conjunto de entrada dio como resultado una pérdida correspondiente de aproximadamente un 25 % de los diseños de ensayo. Para los diseños de ensayo TypePLEX se decidió mantener estas secuencias de marcadores de 2FH para el diseño e indicar esta observación cuando se consideró el conjunto final de ensayos seleccionados para el panel T21-2FH de TypePLEX.

Diseño de ensayo 2FH TypePLEX

Se crearon los ensayos TypePLEX usando la versión más reciente del programa informático de Assay Design de Sequenom (4.0.0.4), empleando nucleótidos de terminación TypePLEX estándar (formalmente iPLEX) sin restricción en los SNP particulares. Se siguió el mismo procedimiento de diseño de ensayo y validación que se usó para la serie de pruebas mix-1 pero con la modificación de tres ajustes de diseño en el programa informático Assay Design indicado del análisis de los resultados de las pruebas mix-1, como se describe a continuación.

Inicialmente se usó el mismo conjunto de entrada de 1.872 secuencias 2FH para crear diseños de ensayo TypePLEX. Sin embargo, el análisis PleXTEND mostró que cuatro ensayos tuvieron 3 resultados positivos para el genoma. Se eliminaron las correspondientes secuencias 2FH del grupo de SNP para dejar 1.868 secuencias de entrada. A pesar de las restricciones de diseño TypePLEX adicionales, la falta de restricción en los SNP permitidos significó que más de las secuencias 2FH de entrada eran diseñables para los ensayos (1.749 *cf.* 1.015). (De hecho, todas las secuencias de entrada son diseñables para los ensayos TypePLEX en los ajustes de diseño estándar.) Sin embargo, puesto que los ensayos TypePLEX individuales pueden tener diferencias de masas de alelos de hasta 79.9 Da, se pueden crear menos diseños multiplexo-alto (25 frente a 31). Con la adición de la separación de masa mínima de 10 Da de señales de sonda no extendidas, se crearon tantos como menos de la mitad de pocillos 25-plexos TypePLEX en comparación con los diseños mix-1 (15 frente a 31). Por tanto, para el conjunto inicial de diseños de ensayos candidatos, se consideraron todos los diseños de pocillos TypePLEX que contenían 20 o más ensayos para someter a prueba. Se validaron estos diseños de ensayo frente al uso de la herramienta de internet PleXTEND en Genome Build 36 (Marzo, 2006) en el sitio web RealSNP de Sequenom, como se detalla en la sección de Resultados a continuación.

De nuevo se realizó el diseño de ensayo TypePLEX en dos etapas para controlar qué secuencias de conjuntos de 2FH se dejaron multiplexar juntas en el mismo pocillo. El primer paso diseñó ensayos multiplexados usando un ajuste *Max. Multiplex Level* de 21 y el conjunto de opción *SNP Set Restriction* en *Once per well* para crear pocillos en los que cada ensayo seleccionó un cromosoma parálogo diferente (1-20, 22). Todos los ensayos en los pocillos por debajo de un determinado tamaño se desecharon para permitir que se rediseñaran las correspondientes secuencias 2FH. Los ensayos restantes se superplexaron con las secuencias 2FH originales, con la región del cromosoma 21 como el valor SNP_SET, usando un ajuste *Max. Multiplex Level* de 25. Aparte de los cambios para los ajustes de *Max. Multiplex Level* y *Assay Type* (iPLEX después *Superplex*), todos los ajustes de diseño de ensayo fueron los mismos para ambos pasos de diseño. Los ajustes más importantes sobre las características de diseño de ensayo se detallan a continuación con respecto a los tres componentes principales del diseño de ensayo; diseño de amplicón (cebador de PCR), diseño de cebador de extensión (sonda) y diseño de ensayo multiplexado. Algunos ajustes relacionados con opciones de diseño que no son relevantes para el diseño de ensayo TypePLEX estándar, o de naturaleza más algorítmica, no se detallan aquí.

En las siguientes secciones, se proporcionan los números de ensayos o multiplexos afectados por el cambio en el

ajuste de diseño particular. Estos son con respecto a todos los demás ajustes de diseño que están en sus valores finales pero estos números sólo se deben considerar como una cuantificación aproximada de las restricciones de diseño individual, puesto que la combinación de múltiples restricciones de características no se representa como efecto de la suma de la aplicación de restricciones individuales.

5 Ajustes de diseño de amplicón

El término 'amplicón' se refiere a la secuencia de ADN bicatenario que es la región amplificada seleccionada por una reacción de PCR. El diseño del amplicón es un procedimiento de elección del par de cebadores de PCR más adecuados frente a las secuencias de entrada de modo que contenga la variación de secuencia (SNP) de interés y esté dentro de los requisitos de longitud especificados. Para los diseños de ensayo 2FH, se usaron los ajustes estándar para las longitudes de amplicón mínima, óptima y máxima; para los valores 80, 100 y 120 respectivamente. Esta longitud incluye las marcas hME-10 10-meras de cebadores de PCR 5' no seleccionados usadas en el diseño de ensayo MassEXTEND estándar, como se especifica en la ventana de diálogo *Assay Designer Amplicons Settings*. El uso de marcas de cebadores de PCR universales, y una pequeña variación en longitudes de amplicones pequeñas, se sabe que potencia y ayuda en el equilibrio de las tasas de amplificación en reacciones PCR multiplexadas. Una marca 10-mera universal ejemplar usada con los diseños de ensayo proporcionados en la tabla 4 es la siguiente: ACGTTGGATG. La opción *Sequence Annotation* se fija en su ajuste por defecto de *Scan and Restrict*. Esta opción afecta a cómo se eligen de forma preferente los cebadores si se anota la secuencia SNP usando caracteres de tipo mayúsculas y minúsculas. La opción particular elegida no es eficaz para las secuencias 2FH puesto que se proporcionan todas con caracteres en mayúsculas. Esta opción permite evitar cualquier repetición de secuencia 10-mera que afecte al diseño de cebadores de PCR, aunque se asume que dichas repeticiones son poco probables debido a la preparación del conjunto de secuencias 2FH proporcionado.

El diseño de cebadores de PCR consiste en evaluar las secuencias seleccionadas en cada lado del SNP de ensayo, a continuación elegir el par adecuado de secuencias que mejor cumplen con los requisitos de longitud de amplicón. La secuencia de cebadores debe ser específica y puede que no seleccione una región que contiene variaciones de secuencia demarcadas, por ejemplo otros SNP de ensayo, SNP proximales indicados por códigos de la IUPAC u ocultos por caracteres 'N'. La ocultación de las variaciones proximales para el diseño de secuencias 2FH contribuyeron a la mayoría (95 %) de los fallos de diseño en combinación con restricciones en el diseño de cebadores de PCR y sonda.

Las restricciones en el diseño de cebadores y ponderaciones en las características de diseños individuales, que afectan a cómo se selecciona en último término el mejor par de cebadores, son configurables para el programa informático de diseño de ensayo. Estas se dejan típicamente en sus valores por defecto estándar para el diseño de ensayo puesto que ha demostrado que son eficaces. La longitud del cebador de PCR seleccionado está constreñida entre 18 y 24 bases, con una longitud óptima diana de 20 bases. El contenido de bases G.C fraccionada óptima de la secuencia seleccionada se fija en un 50 % y la Tm de hibridación predicha óptima para la secuencia, usando la regla 4+2, se fija en 60 °C. Las secuencias SNP típicas tienen un alcance suficiente para la selección de secuencia de cebador que a menudo cumplen las tres de estas condiciones óptimas, dando como resultado un diseño de cebador específico y termodinámicamente adecuado. Sin embargo, este puede no ser el caso cuando las secuencias tienen un alto contenido de bases A.T o se restringen debido a la presencia de códigos de bases no específicos. Para tratar una observación de una posible correlación entre el rendimiento de ensayo y las Tm predichas para cebadores de PCR para los diseños de ensayo 2FH mix-1, la Tm mínima para el diseño de cebador se fijó en 50 °C, con el máximo mantenido en su valor estándar de 80 °C. La aplicación de esta limitación de Tm mínima dio como resultado la pérdida de 58 diseños de ensayo 2FH. Los ajustes de ponderación de puntuación que ajustan cómo el diseño de cebadores cumple eficazmente los valores óptimos para estas restricciones no se alteró de sus valores predeterminados (1,0).

Otros ajustes relevantes para el diseño de cebadores de PCR incluyen consideraciones para los números de bases G secuenciales, falsa sensibilización de los cebadores de PCR para la misma región de amplicón y falsa extensión de los cebadores frente a los mismos debido a la fuerte formación de subestructuras de horquilla o dímeros. el potencial moderado para la falsa extensión de cebadores de PCR, que da como resultado que se vuelvan inútiles para la amplificación, se considera típicamente que sólo tiene un efecto menor en el rendimiento de la PCR y estos ajustes se dejan en sus valores predeterminados. Sin embargo, como resultado de la observación de una posible correlación entre un rendimiento de ensayo mix-1 y puntuación de confianza del diseño de PCR (UP_CONF), se permitió la opción de incluir las marcas hME-10 en el análisis horquilla/homodímero. Esto tiene el efecto de excluir algunos diseños de cebadores que pueden tener un gran potencial para la extensión 3° frente a toda la secuencia 5° y dio como resultado la pérdida de 11 diseños de ensayo 2FH TypePLEX.

Otros ajustes de diseños de ensayo disponibles para controlar el diseño de amplicón de un solo ensayo, tales como ponderaciones de puntuación para longitud de amplicón óptima y potencial de heterodímero entre el par de cebadores de PCR, se mantuvieron en sus valores predeterminados.

Ajustes del diseño de sonda extendida

Las restricciones en el diseño de cebadores de sonda (de extensión) son similares a las de los cebadores de PCR

pero la longitud y composición se elige en último término en base a la masa y otros problemas de diseño de ensayo multiplexado. De nuevo, la mayoría de los ajustes de diseño disponibles se mantuvieron en sus valores predeterminados para el diseño de ensayo SBE (IPLEX) de nivel de multiplexación moderado, ya que se ha demostrado que es altamente exitoso para el diseño de ensayo multiplexado en la práctica.

- 5 La longitud del cebador de sonda se controla por los ajustes *Oligo Length*, que se fijaron en valores mínimos y máximos de 17 y 30 bases respectivamente. El valor mínimo limita el tamaño de los cebadores de extensión menores diseñados y se puede fijar de forma eficaz a tan solo 15 bases, puesto que estas secuencias sólo necesitan ser específicas para hebras cortas de ADN (los amplicones que resultan de la amplificación por PCR). El valor mayor de 17 se usa para garantizar la especificidad, tasas de extensión y debido a que para este ajuste se ha realizado mucha más química de iPLEX. El valor máximo rige la longitud de extensión máxima de las sondas, es decir, para los analitos de alelo previstos. La longitud oligonucleotídica (*Oligo Length*) es el principal grado de libertad para el diseño de ensayo MassEXTEND, junto con la libertad de diseño de ensayos en sentido directo o inverso para seleccionar la hebra correspondiente del amplicón.

- 15 Las restricciones sobre la T_m seleccionada predecida para el diseño de cebador de sonda se fijan en un mínimo de 45 °C y un máximo de 100 °C, como se calcula por el procedimiento Nearest Neighbor (vecino más cercano), que es la opción por defecto. Los valores predichos por el programa informático Assay Design usando este procedimiento son conocidos porque son de aproximadamente 10 °C demasiado bajos ya que el cálculo no considera el efecto de los iones Mg sobre la estabilización de ADN bicatenario. El valor mínimo por defecto se eligió inicialmente para dar aproximadamente los mismos diseños de sonda que los creados por las versiones previas del programa informático usando la regla 4+2 (contenido G.C), donde se ha recomendado un requisito de temperatura mínima de 60 °C en base a los hallazgos de un experimento de diseño de ensayo hME previo. Los hallazgos no indicaron la necesidad de un límite superior para la T_m del cebador de sonda y se elige el valor por defecto de 100 °C para que sea significativamente mayor que la T_m predecida para cualquier sonda típicamente diseñable por el programa informático. Estos límites se han validado sobre muchas series de ensayos y se usan para todos los diseños de ensayo iPLEX. La posterior selección de secuencias de sonda para el diseño de ensayo no son dependientes del valor de T_m predicho, aunque un componente de la puntuación del diseño de sonda interno sí considera el contenido en G.C fraccionado con relación a un valor óptimo de un 50 %. Esto sólo es una consideración menor para el diseño de sonda (alternativo) y el factor de ponderación para este componente se dejó como su valor por defecto (1,0).

- 30 El diseño de ensayo estándar permite que las secuencias de sonda se extiendan en el extremo 5° con un pequeño número de bases que no coinciden con la secuencia de ADN diana, por motivos de multiplexación de masa. Esta opción se inhabilitó para el diseño de ensayo 2FH fijando el valor *Non-templated 5° Base Addition: Maximum Allowed* en 0. Esta restricción se eligió principalmente de modo que la secuencia sin molde no se diseñara sobre una variación proximal, dando lugar de este modo a una hibridación de cebador diferencial para las dos regiones parálogas amplificadas. Al no permitir extensiones de bases de sondas sin molde se restringe el diseño de sonda sólo a la secuencia específica que flanquea el SNP de ensayo. Para los ensayos 2FH TypePLEX, el cambio de este ajuste del valor por defecto redujo el número de 25-plexos diseñados en un 67 %.

- 40 El potencial de falsa extensión del cebador de sonda proporciona una ponderación más interna que para el diseño de cebadores de PCR. Dichas extensiones dar lugar directamente a resultados de fenotipado positivos falsos o frecuencias de alelos significativamente sesgadas. El potencial de falsa extensión se estima por emparejamiento de la secuencia de cebador con una diana deslizante de modo que el cebador se pueda extender (en el extremo 3°). Las dianas de extensión alternativas incluyen la propia cola 5° de la molécula de cebador (horquilla), otra molécula de cebador (homodímero) o bien la hebra de amplicón (falsa sensibilización). El algoritmo considera emparejamientos erróneos de una única base, bucles de emparejamiento erróneo de múltiples bases y opciones alternativas de bucles abiertos y fijos. Se usa el mayor valor de ΔG (más negativo) para someter a prueba las alineaciones de hibridación para estimar el potencial para la extensión. Esta estimación también incluye una contribución basada en el número de bases en la sujeción 3° de la estructura hibridada, para representar la falta de correlación general de las predicciones de ΔG con casos asumidos de falsa extensión. Los ajustes disponibles en el programa informático relacionados con la termodinámica de Nearest Neighbor y el potencial de hibridación de extensión no se cambiaron de sus valores predeterminados.

- 50 El potencial de falsa sensibilización de una sonda con su amplicón diana se puntúa de modo que una predicción de ΔG relativamente alta para la hibridación de secuencia 3° parcial existe en un sitio de unión alternativo relacionado con el de la unión en el sitio diana. Típicamente, esto es una aparición rara, que requiere un emparejamiento complementario exacto de 8 a 10 bases de cebador en el extremo 3°. Para los diseños de ensayo 2FH la ponderación de puntuación para *False Primer Potential* de sonda se fijó en 1,2. Usando un valor de ponderación de puntuación de característica de 1,2 se garantiza que la característica particular se penalice más fuertemente durante la selección de diseños de sonda alternativos e inhabilita el diseño de ensayo que produciría de otro modo una advertencia alta-moderada para la característica medida en ajustes estándar (potencial de característica > 0,416). Para ensayos 2FH TypePLEX, ninguna secuencia falló en el diseño debido al cambio de este valor del valor por defecto (1,0).

- 60 La extensión de un cebador de sonda a través de hibridación de homodímero o de horquilla se analiza de forma similar. El potencial para la extensión de horquilla se considera típicamente que es moderadamente fuerte para una

alineación complementaria de cuatro o más bases 3°, con un bucle de horquilla de 3 o más bases. El potencial para la extensión de dímero se considera típicamente que es moderadamente fuerte para una alineación complementaria de cinco o más bases 3°, o mayores alineaciones incluyendo uno o más emparejamientos erróneos de pares de bases. Para los diseños de ensayo 2FH la ponderación de puntuación para *Hairpin/Dimer Extension Potential* de sonda también se fijó en 1,2, para evitar los diseños de sonda de extensión que darían una advertencia moderada en el valor por defecto (1,0). Para ensayos 2FH TypePLEX, el cambio de este valor del valor por defecto dio como resultado 51 secuencias que fallan en el diseño de ensayo TypePLEX.

Ajustes de diseño de multiplexación

Debido a la varianza técnica a menudo un único marcador no es suficiente para la clasificación de estados de enfermedad; por lo tanto, se requieren múltiples marcadores para reducir la varianza y mejorar la exactitud. Por tanto, la invención proporciona, en parte, ensayos multiplexados para la detección de anomalías cromosómicas a partir de muestras maternas que comprenden ácido nucleico fetal (preferentemente adquiridas por medio de medios no invasivos). Una muestra de plasma materno típica de una mujer embarazada tiene entre un 4-32 % (+ -2 %) de ácido nucleico fetal libre de células. Para detectar de forma fiable y precisa una anomalía cromosómica fetal, con especificidad y/o sensibilidad suficientes adecuadas para un alto grado de utilidad clínica, en un historial de ácido nucleico materno, se necesitan procedimientos cuantitativos sensibles que se pueden aprovechar del incremento en la potencia proporcionada por el uso de múltiples marcadores (por ejemplo, múltiples conjuntos (de 2-1000) de especies de nucleótidos). Al incrementar tanto el número de conjuntos y el número de especies por conjunto, la especificidad y sensibilidad del procedimiento puede ser lo suficientemente alta para una fuerte utilidad clínica como prueba de cribado o prueba de diagnóstico (incluso en una muestra que comprende una mezcla de ácido nucleico fetal y materno). Además, se puede usar el ensayo de determinación sexual para determinar la cantidad de ácido nucleico fetal presente en la muestra. Asimismo, otros ensayos para determinar la cantidad o concentración de ácido nucleico fetal presente en una muestra se pueden incorporar en el ensayo de detección de aneuploidia.

Cuando se diseñan ensayos MassEXTEND multiplexados, la principal preocupación es que las señales de analitos de cebadores de extensión se resuelvan bien en el espectro de masas resultante. Las masas moleculares de cebadores de sonda y sus productos de extensión se calculan fácilmente y se limitan a la ventana de masas más conservadora recomendada. Los valores de *Lower Limit* y *Upper Limit* para el intervalo de masas se fijaron a 4,500 Da y 8,500 Da respectivamente. Este límite de masa superior limita eficazmente la longitud máxima para secuencias de analitos a 28 bases y prohíbe la superposición de señales de masa para especies con cargada única (masa baja) y para especies con posible carga doble y triple (masa alta). El ajuste de *Min Peak Separation* para máximos de masa de analito se mantuvo en su valor por defecto (30 Da). Este valor garantiza que las secuencias de analitos de cualquier ensayo en un diseño múltiple no se superponen con cualquier máximo anticipado de cualquier otro ensayo con el que se multiplexan. También se garantiza que los máximos de analito están separados al menos 8 Da de los máximos de aductos de iones de sodio y potasio, que son los máximos de aductos salinos observados con mayor frecuencia en los espectros de masas TypePLEX. Se pueden especificar que las señales de subproducto adicionales específicos y contaminantes con masa fija se deben evitar en el diseño de ensayo multiplexado pero no se usan para los diseños de ensayo 2FH. El ajuste *Min Peak Separation* para cebadores de extensión de masas (sondas) se fijó a 10 Da, el ajuste recomendado para multiplexación baja. Esto evita que las señales de sondas no extendidas en el espectro de masas se solapen, garantizando de este modo que la medida de la tasa de extensión se pueda estimar de forma exacta para todos los ensayos. (Se usó el valor por defecto de 0 para diseños de ensayo mix-1). La adición de esta restricción de multiplexación en los diseños de ensayo 2FH TypePLEX redujo el número de pocillos 25-plexos creados a partir de 26 a 15 pocillos.

El valor de ponderación de puntuación *False Priming Potential* para el diseño del cebador multiplexado se fijó en 1,2 para la diseños de secuencias 2FH. Esto reduce la probabilidad de que la sonda o los cebadores de PCR de un ensayo se extiendan en un sitio alternativo en cualquier secuencia de amplicón monocatenario de otro ensayo con el que se multiplexa. Esta es una aparición con muy poca frecuencia en ajustes de diseño estándar y el uso de ponderación mayor aquí garantiza que incluso los potenciales moderados para falsa sensibilización entre ensayos están desfavorecidos. Para ensayos 2FH TypePLEX, el cambio de este valor del valor por defecto (1,0) no tuvo un efecto significativo sobre los diseños de ensayo.

El valor de ponderación de puntuación *Primer-Dimer Potential* para el diseño del cebador multiplexado se fijó en 1,2 para la diseños de secuencias 2FH. Esto reduce la probabilidad de que un cebador de sonda de un ensayo se pueda extender de un cebador de sonda de otro ensayo que se multiplexa por medio de hibridación de heterodímero. Como con homodímeros y horquillas de sonda, se ha observado una extensión falsa aparente en Sequenom para hibridaciones de bases 3° como tan solo 4 bases emparejadas y es el principal motivo por el que los conjuntos pequeños de secuencias de entrada pueden fallar en el diseño multiplexado para el mismo pocillo. Cuando el conjunto de secuencias de entrada es grande en comparación con el nivel de multiplexación, como con los diseños 2FH, normalmente es posible distribuir las secuencias de sondas para permitir un mayor número de multiplexos de alto nivel, pero las advertencias por una extensión potencial cebador-dímero moderada son más comunes. Usando una mayor ponderación aquí se garantiza que se evitan incluso los potenciales moderados para una extensión de sonda falsa. Para ensayos 2FH TypePLEX, el cambio de este valor del valor por defecto (1,0) eliminó 465 de dichas advertencias pero redujo el número de pocillos 25-plexos diseñados de 28 a 15.

Otros ajustes de diseño relativos a la multiplexación se mantuvieron en sus valores predeterminados. Estas opciones de diseño no se usan para el diseño de ensayo TypePLEX estándar o no se consideran de particular significación para el diseño de ensayo 2FH. En particular, se usó la opción de uso de replexación de intercambio para el diseño de ensayo *de novo* y se mantuvo la opción la *Superplex with new SNPs* para el diseño de ensayo superplexado. Se fijó el ajuste *Minimum Multiplexing Level* en su valor por defecto de 1, puesto que no había motivos para restringir los pocillos a un tamaño mínimo en la fase de diseño.

Resultados

El conjunto de entrada de 1.868 secuencias 2FH se diseñó inicialmente para 1.749 ensayos procesados en 347 pocillos usando el ID de cromosoma como la agrupación SNP_SET. Los cuatro diseños de ensayo 21-plexos, dos diseños de ensayo 20-plexos y cinco diseños de ensayo 19-plexos se mantuvieron para el diseño de ensayo superplexo. Se superplexaron con las 1.868 secuencias 2FH originales en el nivel de multiplexación máximo de 25, usando la región de cromosoma (índice) como la agrupación SNPJSET, para crear 1.749 ensayos en 95 pocillos. A partir de estos diseños, se mantuvieron quince pocillos 25-plexos, trece pocillos 24-plexos, nueve pocillos 23-plexos, siete pocillos 22-plexos, cuatro pocillos 21-plexos y seis pocillos 20-plexos como diseños de ensayo potenciales. Los primeros 11 pocillos enumerados son pocillos de 21, 20 y 19 ensayos originales superplexados con secuencias 2FH adicionales para tamaños de pocillo de 25, 23, 23, 25, 24, 24, 22, 23, 22, 21 y 25 ensayos respectivamente.

Los 54 pocillos, que contienen 1.252 ensayos en pocillos de tamaño de 20 a 25 ensayos, se validaron por la herramienta PleXTEND dando todos exactamente 2 los tripletes de alineaciones de cebadores de ensayo para el genoma humano, para las regiones de cromosoma 21 y cromosoma parálogo esperadas. El análisis PleXTEND también reveló que dos pocillos (W27 y W53) contenían pares de ensayos que produjeron resultados positivos de amplificación cruzada para el genoma. Los ensayos 2FH21F_01_046 y 2FH21F_01_071 se eliminaron para evitar posibles problemas de amplificación cruzada en los pocillos correspondientes, dejando el pocillo W27 como 23-plexo y el pocillo W53 como 19-plexo. Los 54 pocillos restantes, que contenían 1.250 ensayos, se proporcionaron para el desarrollo del ensayo 2FH TypePLEX inicial. Estos ensayos se proporcionan a continuación en la tabla 4A.

En la tabla 4A, cada "Marker_ID" (ID de marcador) representa un ensayo de un conjunto de especies de secuencias de nucleótidos, en el que el conjunto incluye una primera especie de secuencia de nucleótidos y una segunda especie de secuencia de nucleótidos. La tabla 4 proporciona detalles de ensayo para cada uno de los 1252 conjuntos de secuencias de nucleótidos. Como se describe en el presente documento, los conjuntos de secuencias comprenden secuencias altamente homólogas (por ejemplo, parálogas) de un cromosoma diana (por ejemplo, Ch21) y un cromosoma de referencia (por ejemplo, todos los demás cromosomas autosómicos no diana). Cada conjunto de secuencia tiene un Marker_ID, que proporciona los números de cromosomas diana y de referencia. Para el cromosoma diana, se proporcionan el número de cromosoma número (CHR_1), la posición de emparejamiento erróneo de nucleótidos genómico (Marker_POS1), la especificidad de hebra genómica (SENSE1 – F (forward (directo)) o R (reverse (inverso))), la base de emparejamiento erróneo de nucleótidos genómico (Marker_1), y la longitud de amplicón (AMP_LEN1). Se proporciona la información correspondiente para el cromosoma de referencia correspondiente: el número de cromosoma número (CHR_2), la posición de emparejamiento erróneo de nucleótidos genómico (Marker_POS2), la especificidad de hebra genómica (SENSE2 – F (forward (directo)) o R (reverse (inverso))), la base de emparejamiento erróneo de nucleótidos genómico (Marker_2), y la longitud de amplicón (AMP_LEN2). Las posiciones de marcadores se basan en Human Genome 19 de The University of California Santa Cruz (Assembly GRCh37). Las secuencias de cebadores PCR1 y PCR2 amplifican las secuencias de nucleótidos tanto diana como de referencia del conjunto, y las bases de nucleótidos de los marcadores se estudian en las posiciones de los marcadores por la secuencia de cebador de extensión. Las secuencias de cebadores PCR1 y PCR2 también pueden comprender una secuencia de cebador universal 5' (por ejemplo, la siguiente secuencia 10-mera se usó en los ejemplos proporcionados en el presente documento: ACGTTGGATG). En determinados modos de realización, la variante de nucleótidos en la columna "Marker_1" y "Marker_2" para un ensayo es el primer nucleótido extendido desde el extremo 3' de un cebador de extensión mostrado.

TABLA 4A

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21F_01_003	21	17601	F	G	90	1	91102	R	T	90	GTTTGGATGA TGTGTTC	CCTTGAGAAC TAAGTGACC	TAAGTGACCTG CTTCTAGCTGT
2FH21F_01_006	21	17811	R	A	91	1	52326	F	C	91	TGATGATGGG CAGGAATG	GCTGTCTAATA GAAGCTTAC	TGTTACAGCCAA TATTTAAGGA
2FH21F_01_007	21	17811	R	C	80	1	52326	F	T	90	ATTGGCTGTAA AAATGCTG	CAGTCAAGTTT CCCTCTTGC	CTCTGCTGTCT AATAGAAGCTTA
2FH21F_01_009	21	17811	F	C	119	1	52326	R	A	119	ATACCTCTCTG CATGCTTAG	TCCAAGTCTC TTAAGGAG	TTTACCAGTGC TCGCC
2FH21F_01_010	21	17811	F	T	119	1	52326	R	G	121	CAGCAAGGTG AAATTGGGA	GGCCAGTAC CATTTCTAG	ATAGAATGCC ATTGTG
2FH21F_01_011	21	17811	R	C	117	1	52326	F	T	119	GGCCAGTACC ATTTCATAG	GCAAGGTTGA AATTGGGATG	TCAGAAGAAAT AGGCCA
2FH21F_01_012	21	17811	R	C	107	1	52326	F	C	109	TCATAGAATGCC CATTTGTG	TTGAGCAAGGT TGAAATTGG	CAAGGTTGAAAT TGGGAATGT
2FH21F_01_013	21	17811	F	G	98	1	52326	R	G	98	GCTTATCTCTG ATCCTAGC	CATTCCCAAT TCAACCTTGC	TTCAACCTTGT GAAAA
2FH21F_01_014	21	17811	R	A	100	1	52325	F	C	100	TCCCAATTTCAA CCTTGTG	TGCCAGCCTTA TCTGTATC	TGTATCTAGCT GTCTTAA
2FH21F_01_015	21	17811	F	A	118	1	52325	R	G	121	TGTAAGTTTG TTCCCTC	GCTAGCTATTC CAGTTTGAA	TTGAAATCTACC AAACTGTAA
2FH21F_01_017	21	17811	R	T	100	1	52325	F	T	100	CACCTAGCTTG AGAAGGATG	TGAGGGGAACA AAATCTTAC	GGAAACAAATCT TACAAAGG
2FH21F_01_018	21	17811	F	T	100	1	52325	R	T	100	CACCTAGCTTG AGAAGGATG	TGAGGGGAACA AAATCTTAC	GGGATAGGCA CTCGCT
2FH21F_01_020	21	17812	R	G	103	1	52325	F	G	103	AAGAAGTTCTTC TGGGTCTG	CTTCATGCTGG AGTAATGGG	GGGTAACATAT CTTTGGTATGGT
2FH21F_01_021	21	17812	F	C	91	1	52325	R	A	91	TTTTCATACACT TCTCTGG	CCCATTAACCTC AGCATGAAG	GTGGCAAAATA CCTCAAGA
2FH21F_01_022	21	17812	R	C	118	1	52325	F	A	118	CAGTGGCAAAA TACCTCAAG	TTTTACATTA GTGGTTG	ATTTTTCATACA CTCTCTGG
2FH21F_01_023	21	17812	R	G	118	1	52325	F	T	118	CAGTGGCAAAA TACCTCAAG	TTTTACATTA GTGGTTG	ACCATTAGTGGT TTGATTTTAA
2FH21F_01_025	21	17812	F	T	118	1	52325	R	G	118	CTCCCTCCCA GTAGAATA	ATCCAAGATAC TCACITTC	ACTCACITTTCCA TTAATCTGTGT
2FH21F_01_026	21	17812	R	A	118	1	52325	F	C	116	ATCCAAGATAC CACITTC	CTCCCTCCCA AGTAGAATA	TTTGTACTTTT CTTTTCCCTC
2FH21F_01_027	21	21493	R	A	115	1	47924	R	G	116	CTTCATGCAAA AATGTTTC	CATTCAAAAT CTCTGGCCC	GTATTAATGTC AGAGCTCTC
2FH21F_01_029	21	22448	F	A	84	1	33174	F	G	85	AGATTCCTCTGT CACAGG	TATCTGGTAAG AAATTGTG	TCTCAGAATTTT CCTGG
2FH21F_01_030	21	27518	F	T	97	1	95897	F	C	97	GAGGCAACTAG GACITTAAGG	GTACTCAATC AAATTGGC	TACTCAATCAA ATTGGCTTACTT

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21F_01_031	21	27518	R	T	97	1	9697	R	C	97	GTACTCAATCA	GAGGCACTA	GCCAACTCCA
2FH21F_01_033	21	29350	F	A	116	1	14514	F	C	117	GGTGAAGGCTG	CCAGCCAAGA	CCAGCCAAGA
2FH21F_01_034	21	29350	R	T	116	1	14514	R	G	117	TATTTGTAG	ATACAAACAC	ATACAAACAC
2FH21F_01_036	21	29350	R	G	119	1	14514	R	A	120	CCAGCCAAGA	GTAGGTGAAG	GGTGAAGGCTG
2FH21F_01_037	21	29355	F	G	93	1	14514	F	C	108	ATTAAGAAGTTT	CATTGGCCTTA	GCCTTAACCTCA
2FH21F_01_038	21	29355	R	G	96	1	14514	R	A	109	GCTGAGGC	ACTCCAGAG	GAGTTTCT
2FH21F_01_039	21	29356	R	G	90	1	14514	R	A	90	CATTGGCCTTA	GCTATTGAAG	TTTGAAGCTATT
2FH21F_01_040	21	29357	R	G	87	1	14514	R	A	87	AGAACCTTTGAA	GCTCTACAGA	CATAGAAAGGG
2FH21F_01_041	21	29357	F	G	120	1	14514	F	A	120	GTATTGCTGAT	AATGAAGAGC	GTCTGCACITTT
2FH21F_01_043	21	29361	R	G	91	1	14514	R	A	91	ACTGGTGC	CATGCTGC	GCACCTGTGA
2FH21F_01_044	21	28381	F	T	106	1	14514	F	C	108	GGACAGTGT	CACCAATATCA	CAATAGCTTTGA
2FH21F_01_045	21	29361	R	A	106	1	14514	R	G	106	AGCTGGCCAG	GAACTCTATC	CATCTCTCTTC
2FH21F_01_046	21	29361	R	G	109	1	14514	R	A	109	AAATCTTC	TCTACTCG	GTACCTC
2FH21F_01_049	21	31679	R	T	120	1	93519	F	G	134	GCAGAAAGCT	GTACGAAGTA	GAAGTAGAGAT
2FH21F_01_050	21	31679	F	G	120	1	93518	R	T	134	CATGAGATTC	GAGATGAGAC	GAGACTTCATCA
2FH21F_01_057	21	33849	R	A	86	1	15594	R	T	86	ATATTGTG	ATGTGACCC	AAATCTTTAA
2FH21F_01_058	21	33849	R	G	109	1	15594	R	A	109	TACTCCAG	CTCTCTCTAC	CCACAGA
2FH21F_01_059	21	33849	R	A	113	1	15594	R	G	113	CTGTGGTAAGA	GGATGGGAGA	TTGATCGCCCTTA
2FH21F_01_060	21	33851	F	C	116	1	15594	F	T	116	AGACGAAGC	TCTGTAAAC	ATCTGA
2FH21F_01_062	21	33851	R	A	96	1	15594	R	G	96	GGATGGGAGAT	CTGTGGTAAG	CGATGAAGAAC
							5610				CTGCTAAAC	AAGACGAAGC	ACCTT
							15594				AGGTGCAGGCT	GATAAGGCTC	AGGCTCAATTAC
							5724				TTAGGTTG	AATTACTTG	TTGAAATAGC
							15594				TAATGCAAGCTG	TATAGTAGGTG	GGTGGAGGTGC
							5772				CCATGTGTG	GAGGTGCAG	AGGCTTAGGTT
													TGG

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Marker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Marker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21F_01_063	21	33851	F	469	105	1	15594	F	5830	105	CTCAGTTAGTTC TTCTATAGT	AAACCTAAAGC CTGCACCTC	GAGAAAGTTGC TAAAAAGTCA
2FH21F_01_064	21	33853	R	810	96	1	15594	R	6048	96	ATTGCTGCAGC AAACCA	GAGATCCAGA TGATACAGGG	TGATACAGGGA ATTCTTTTGTTA
2FH21F_01_065	21	33853	F	850	85	1	15594	F	6088	85	CATTCTCCATAA ACACTATG	GAATTCCTGT ATCATCTGG	TATCATCTGGAT CTCAACAT
2FH21F_01_067	21	33861	R	377	92	1	15594	R	6234	92	CTCTACAGCAAT GAGTGAAC	CCTGAGCTCTA TTTAACATGC	TGCATCTCACT GAGTCTTTTCTG
2FH21F_01_068	21	33861	F	410	112	1	15594	F	6267	112	CCTGAGCTCTAT TTAACATGC	TACAGCAATGA GTGAACGGG	AGACTCAGTGA GAATGCATTGA
2FH21F_01_071	21	33869	F	988	113	1	15594	F	6871	113	TCAGGGCCACT ATCATGGAC	AGGCAACAT CCTGTGCTG	GTGCTGCTTTG ATGGA
2FH21F_01_072	21	33870	R	000	104	1	15594	R	6883	104	TCTGTGCTG CTTTGATGG	TCAGGGCCAC TATCATGGAC	CAGGTGGTTGC CAGCTTCT
2FH21F_01_073	21	33870	F	731	103	1	15594	F	6943	103	TTATAAACCTC AATCTATC	CAATGGGCT TGTAACCAAG	CTCATGGCTAAT GCCAC
2FH21F_01_077	21	33870	R	871	85	1	15594	R	7085	85	GGTACAAAATC AAAGCCTG	GGCAATTTAAG ACATTTGTG	AGACATTTGTA AAAAGCAATCTG
2FH21F_01_078	21	33870	F	951	96	1	15594	F	7165	96	TGTTTGGATGT TAGCCAC	AACCATACAG GGTTTGGTA	GGTTTGGTATG TTTATATTGTT
2FH21F_01_080	21	33871	R	006	82	1	15594	R	7220	82	AGTGGCTAACA TCAAAACGA	TTAACATTCCA CACTGAAG	CATTCCACACTG AAGATTACTCT
2FH21F_01_081	21	33871	R	091	93	1	15594	R	7305	93	GTACTATGATGT AACTCCCC	CACAGCCCTT CACTGATTAC	TTACAGGCAAG TGTTACAGTAG
2FH21F_01_082	21	33871	R	149	105	1	15594	R	7363	105	GTAATCAGTGAA GGCTGTG	GATCAGCTCAA TAACACTGG	ATCTGTCCAGC AGAACCCA
2FH21F_01_083	21	33871	F	170	108	1	15594	F	7384	108	CTTGATCACCTC AATAACAC	GTAAATCAGTGA AGGCTGTG	GTCTGTCTGGA CAGATA
2FH21F_01_084	21	33871	F	198	113	1	15594	F	7412	117	CAAAATTTTGG GGGAGATGG	TGGTCTTGCT GGACAGATA	AGTGTATTGAG GTGATCAAG
2FH21F_01_086	21	33871	R	220	119	1	15594	R	7438	123	TGGTCTTGCT GGACAGATA	CTCTACAAAA TTTTGAGGG	CAAAATTTTGG GGGAGATGGT
2FH21F_01_088	21	33871	F	351	116	1	15594	F	7588	120	GTAAMACTATAT CACAACCTC	GGGTCAATAG AAGGAGTAA	AGGAGTAAAA AATGAAGTCTGA
2FH21F_01_090	21	33871	F	453	105	1	15594	F	7674	105	GTGGCTGGTTG CCAATTTA	TGAATTCAGC TACACTAG	CAGTACAGCT AGATAGAC
2FH21F_01_093	21	33871	R	568	118	1	15594	R	7788	117	ATTGGCAACCA GCCACTATT	TACCACTGAA TACACATG	CCACTGTAATAC ACATGAAATAT
2FH21F_01_094	21	33871	F	608	91	1	15594	F	7828	91	ATTGGGCCCTTA AGCTTTTG	TTTATGTGTAT TACAGTGG	ATTACAGTGGTA TTTATATGCTAT
2FH21F_01_099	21	34436	F	974	130	1	51085	F	302	121	CTGTTGTAAGG GGAAAAGTC	ACTGCTCACTG ACAGCTTCT	CTGACAGCTTCT CTGTAA

Marker_J_D	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21F_01_101	21	39590	F	C	120	1	13755	R	C	120	GAGGCTCAGTA GAGGTTAG	CAGAACATAG GTTTGAAGC	GGTTGAAGCA GTCACA
2FH21F_01_102	21	39591	R	G	115	1	13755	F	T	115	CATAGGTTTGAA GCAGTCAAC	GAGGCTCAGT AGAGGTTAG	CTCAGTAGAGG TTAGTATGATG
2FH21F_01_104	21	39591	R	C	98	1	13755	F	A	98	ACAGTGCTCTG ATTAGTGCC	TGCCAGACTG GTTTGTTAGC	TTGTTTCTTAGT GCTCTAGGCAT
2FH21F_02_003	21	13535	F	A	111	2	13239	R	A	115	AATTTATAGAG AAGCCTG	GTGCTCATAG TCACTGGTC	CATAGTCACTG GTCCATAGTAA GIAT
2FH21F_02_007	21	13543	F	C	112	2	13238	R	C	112	CACCTACCTCT GCCATCAAG	CCATTCTTGCA ACAGTTCCD	AGTCCACAGAA AAGAAGAGGAA TGTG
2FH21F_02_015	21	14091	F	A	111	2	13841	F	G	112	CATAGGTGAGA AAAGTTTGGG	GGGAAAAAA GTGCACCT	AAAAAGTGCAC CTTTCTTA
2FH21F_02_017	21	14091	R	C	85	2	13841	R	T	86	CTCTCCAGAGT GTCTCTA	CATAGGTGAG AAAAGTTTGGG	TGGGAAAGAA CTTGAA
2FH21F_02_018	21	14091	F	T	112	2	13841	F	G	113	CCCTACACTCT TCTCTTT	TTCTCCACC TTCTCTT	CCAACTTTTCT CACCTATGTTT
2FH21F_02_019	21	14091	R	G	112	2	13841	R	A	113	TTCCCAAACTT TTCTCACC	CCCTACACTCC TTCTCTTT	CTCTCTTTAT AGGAACACATT GC
2FH21F_02_020	21	14091	F	A	120	2	13841	F	G	120	CTCACTGTACAT CCATCTC	AAAGAAGAAG GAGTGAGGG	TTAGCTCTAGA GGATGAG
2FH21F_02_021	21	14091	R	T	120	2	13841	R	C	120	AAAGAAGAAGG AGTGAGGG	CTCACTGTACA TCCATCTCTC	ACATCCATCCTC AAACTG
2FH21F_02_022	21	14091	F	T	115	2	13841	F	C	115	GCAGAGATATC ATGCACA	TAGTGAGGGG CTTTTCCAC	GCITTTCCACC TTGAA
2FH21F_02_023	21	14091	F	T	91	2	13841	F	G	97	GGCATGGGGCT TTCTTGT	ACCCATGTAA ACCTTGAGC	TTGAGCACACT GCAAAGTCAT
2FH21F_02_027	21	14092	F	T	105	2	13841	F	A	105	GCCTCTCAGGC ACCATCT	TTATCAGTGA CTTCAGTGG	CAGCTCCCTA CATACC
2FH21F_02_034	21	14092	R	T	84	2	13841	R	G	84	CCATTGCCAA GTTGTGGT	GTGGAATTCTC CTTGGAATC	GGAACTCTCTT GGACTCTTTGT CTC
2FH21F_02_035	21	14092	R	T	92	2	13841	R	C	92	GAGTCCAAGGA GAATCCAC	ATACTCTTATC CAGTTGAGC	CTCTATCCAGT TCAGCTTTGTT GTC
2FH21F_02_036	21	14092	R	A	98	2	13841	R	C	98	TGCTGACAAGG TGAAAAGGG	GGAGGAGATA TGGTGCAGAG	GAGGAGATATG GTGCAGAGCTC TCAG
2FH21F_02_037	21	14090	F	C	93	2	38777	F	A	93	CATAAGCCACTT TTTCAGA	CTCTTCAAATG CACCTAGTG	TTCAAATGCACC TAGTGTACAA GAA
2FH21F_02_038	21	14390	F	C	120	2	38790	F	G	121	AAGCACCTTGG GAATTTT	GGAAGGGAA AAAACTGCG	GGAAAGGGGAA AAACCTGCAG CATA

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21F_02_040	21	14396 267	F	T	85	2	38795 979	F	C	85	ACACAGATTCTCT CCCATAGC	TCCAGAGGA GGCCCTGGT	CCAGAAGGAGG CCCTGGTGTAC TA
2FH21F_02_041	21	14437 193	F	C	110	2	20801 4410	F	T	110	TTGTGGAGTAG GCATATTTC	TTTAAATCAGA ATCATAGAG	CAGAATCATAGA GTAATAATTGC
2FH21F_02_043	21	14437 253	F	T	99	2	20801 4470	F	C	99	GGGATTCATTA TCTGGTC	GAACCTCTAGA AAACCCAG	AAATATGCCTAC TCCACAA
2FH21F_02_045	21	16149 874	R	A	86	2	22522 5488	F	A	86	CTGAGCTTTAA GTGCCACAT	ACAAGTCTGA GAGCCTAAAG	GAGCCTAAAGG CAGGATGTG
2FH21F_02_050	21	18127 404	F	T	93	2	20818 5957	R	G	93	AGACTTTTGTGTA CAGTAAG	GAGTGTGTCA CTTAAGGTC	TGTCACCTTAAGG TCITAGACTG
2FH21F_02_055	21	18128 107	R	C	85	2	20818 5567	F	A	87	GTTCCTAAATT TCTGGATG	ATAGCACTAAC AGCTCAAGG	CTAACAGCTCAA GGAATGTAT
2FH21F_02_057	21	18433 865	R	A	113	2	95536 170	F	A	113	CAGTGGAAATCC TGGGAAATT	GCCATTACCTG CAACCATGT	CTGCAACCATG TTGTTTTATT
2FH21F_02_058	21	18433 901	F	C	102	2	95536 134	R	A	102	AACTAACAGC CTGGAATAC	AACATGGTTGC AGGTAATGG	ACATGGTTGCA GGTAATGGCAA CAAG
2FH21F_02_061	21	18434 055	R	G	103	2	95535 979	F	T	104	CTAATTTTAGA AAGAGTAC	ATTGTACAGT TTCCCATTC	CCATCCCATTTC CCACCTTT
2FH21F_02_062	21	18434 167	F	C	113	2	95535 867	R	A	114	AGTGGCAGAAG ATGGGAATG	TATGGTGCTAA AAAGGACTG	TGCTAAAAGG ACTGTTATCTAA
2FH21F_02_063	21	18434 195	R	T	113	2	95535 838	F	T	114	TATGGTGCTAAA AAGGACTG	AGTGGCAGAA GATGGAGTAG	GGAATAGTACA ATAAGATAAGGA
2FH21F_02_065	21	18434 275	R	T	110	2	95535 758	F	G	110	ACTATTCCATCT TCTGCCAC	TTTATTAAATC AGTCTGGG	AATCAGTCTGG GAAGGCA
2FH21F_02_066	21	18434 542	F	T	82	2	85536 686	F	C	82	ACATCATATAGA AAGGGCAG	GTATAACATTA TACAGAGAGG	TATACAGAGAG GACAGTGGTAA ACT
2FH21F_02_067	21	18434 573	F	T	98	2	95536 717	F	A	99	CAAACTGTAAAC AGTGGTCC	ACTGCTGCC TTTCTATATG	GCTGCCCTTTCT ATATGATGTAAT
2FH21F_02_072	21	18435 016	R	A	94	2	95537 160	R	G	94	TTTATAGCTCTT GCATCTTG	TCAAATGTGAG GAAAGTGCC	ACATAAAATGTT ACCAACAGAT GGG
2FH21F_02_073	21	18435 097	R	G	111	2	95537 238	R	A	108	TGGCATTCTCT CACATTTG	GTGCCAGAAC ATTCTGAATC	GAATCTTAGTGT GGAAAAAAA
2FH21F_02_074	21	20848 805	F	A	102	2	33521 214	F	T	102	GAAAAAGTGC ATGCTTTG	GGAAAGATTA TGATGCAC	GAAAAGATTATG ATGCACCTGGCC TG
2FH21F_02_075	21	20848 810	R	A	97	2	33521 219	R	T	97	AGATTATGATGC ACTGGCCT	GAAAAAGTG CATGCTTTG	GATGAATGCAG TGAAGTC
2FH21F_02_076	21	20848 832	F	C	96	2	33521 241	F	A	96	GAAAAAGTGC ATGCTTTG	GATTATGATGC ACGGGCTG	ACTTCACCTGCAT TCATCAGC
2FH21F_02_077	21	20848 839	R	G	101	2	33521 248	R	A	101	GATTATGATGCA CTGGCCTG	ATTATGAAAA AGTGCATGT	AAAAAGTGCAT GCTTTGT
2FH21F_02_088	21	28215 571	F	G	99	2	13240 5073	R	A	99	ATTAAATCAAGG GGGTGTTTC	ATTAAATCAAGG GGATCAGA	TAGGATCAGA ATCTCAAC

Marker _ D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21F_02_089	21	28215_882	R	T	95	2	13240	F	T	95	GTCTACCAACT ACAAATTAG	CTGAAGAAGT GTAAATGGC	GGCAAGATGCA TATAGAG
2FH21F_02_090	21	28215_945	R	C	102	2	13240	F	A	102	GCATGTTGCCA TTTTTACAC	TTGTCTTAGG CACAAATGG	TTAGGCACAAAT GGAAATAGT
2FH21F_02_091	21	28215_990	F	C	116	2	13240	R	A	117	CCAAATTTCAA GCAAAGC	GTGCCTAAGG ACAACTTTTC	GACAACTTTTC TTTTCTCT
2FH21F_02_103	21	28234_536	R	A	92	2	13236	F	C	95	GGAGTTGACAA TTACATCT	AAACAATGGGT TCTAGAAA	AAACAATGGGT CTAGAAAAAAA A
2FH21F_02_107	21	28264_424	R	A	112	2	13236	F	C	112	GGAAGTTAGA AGGCCACAC	CCAGATGAA GGGGTTTAG	TTTAGTATTGAA TTTAGTGTCTAG
2FH21F_02_108	21	28264_470	F	G	111	2	13236	R	A	116	GATTGTGGGTTT TTGGAAAG	ACTAAACCCC TTCACTGGG	CCCTTCATCTG GGACTCAA
2FH21F_02_111	21	28264_552	R	A	85	2	13236	F	C	85	CTTCCAAAAC CCACAATC	CTGCTAACTCA GATACCTGC	CTCAGATACCT GCATGTCA
2FH21F_02_113	21	28264_816	F	T	116	2	13236	R	G	116	TGCTCTGGCAT TCCCTATC	CTCTATCAGC AAGTTAG	TTTTGTTTCATT TTTGTCACAT
2FH21F_02_116	21	28278_126	R	C	119	2	13235	F	A	118	AGGCTGCAGG GACAGTAG	GTCTCACATCC CAITTCAG	ATTACAGTTA TGTCAGCTA C
2FH21F_02_127	21	31597_156	F	C	86	2	23139	R	A	86	GTTTGCAGTTC AAATTACAC	CTAGCAAGAA TAATCATATC	TAGCAAGAATA ATCATATCAATT TC
2FH21F_02_129	21	31597_201	F	G	85	2	23139	R	A	85	TAGTGATAGAA GATCACA	CCATGCTGAAT TTGAAGTGG	AACGTGGCAAC TCTGAT
2FH21F_02_132	21	31597_387	F	G	94	2	23139	R	T	94	TAGTCATAGGT GTCTATGG	AATAGTGATAA TTTGACG	AGGAAGAGGAC ATTAAAAAA
2FH21F_02_134	21	31597_421	F	C	81	2	23139	R	C	86	CTGAAATATTAA AACTTTGGC	CCATAGGAC ACCTATGAC	AGGACACCTAT GACTAGGAA
2FH21F_02_139	21	31597_560	R	G	116	2	23139	F	T	116	GAAGAAAAAGG TGCTCTACAG	AATGAATCTGC CAGATCTGT	AATGAATCTGCC AGATCTGTGAAT GA
2FH21F_02_143	21	32833_444	F	A	93	2	26690	R	C	93	GGCAATGAGTT CCATAAGTT	TCTGATTATA CTGAGGAC	AGGACAAATTAA AGAAAGTAATTT AT
2FH21F_02_144	21	32833_448	R	C	93	2	26689	F	A	93	TCTGATTATAC TGAGGAC	GGCAATGAGT TCCATAAGTT	GAGTCCATAA GTTTACTCTTC
2FH21F_02_145	21	32833_749	F	T	80	2	26680	R	G	90	TCTCTCACTGT GCACAGG	ACAAGGCTG CACCTTGCAC	CACACTGGGT CCCTGC
2FH21F_02_146	21	32834_036	R	G	120	2	26631	F	T	120	CACACCTGGTT GTGACGAC	GGAGCTGAGA ATGACAGTTG	CAGTTGTTAAGC CAGAC
2FH21F_02_148	21	34197_714	R	T	116	2	26680	R	C	118	TTGTGCTCCAA GTTTAAG	AAGACCAAGAT TCAGAAGC	GCAGGGCTATG CGGGAG
2FH21F_02_150	21	36183_313	F	C	120	2	10692	R	A	119	GATTATTTGGT ACTAACAA	GAATGAAGT GCAGGAAAGC	AAATGAAGTGC AGGAAGCCCT GTG

Marker_I D	CH R_1	Marker POS _1	SE NS E1	Mar ker _1	AMP LEN _1	CH R_2	Marker POS _2	SE NS E2	Mar ker _2	AMP LEN _2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21F_02_151	21	36424 390	R	A	101	2	32089 083	F	G	101	GGCGGGGGCCA GGGCTTT	CAATCACCACA AATCCGGC	CCACGGGGGGC CTCACC
2FH21F_02_155	21	43701 408	R	G	115	2	11290 8101	R	T	114	TGCCAAACAGC AGACGCAG	CAGCATCGCT GCCTCTTG	AGCTGGGGGGC CCACGC
2FH21F_02_156	21	43701 502	R	T	115	2	11290 8195	R	A	115	TGACAGAGAAG GGCTGCAAG	AGAGAGGAG CGATGCTGG	CATCTGCCCAT CCCATCTGC
2FH21F_02_157	21	43701 520	R	C	96	2	11290 8213	R	G	96	GGAGAAACTGA CAGAGAAG	TCCATCTGCCC ATCCCATCT	TCCACACACCG CCCTGC
2FH21F_02_158	21	43701 558	F	C	86	2	11290 8251	F	T	89	CCCGATTCGAA CTCTCATTT	CAGCCTTCTC TGTCAGTTT	TCTCTGTGAGTT TCTCCAT
2FH21F_02_159	21	43701 561	R	T	81	2	11290 8257	R	C	84	AGCCCTTCTCT GTCAGTTTC	CCCGATGGGA ACTCTCATTT	GGAACTCTCAT TATCACCAACC
2FH21F_02_163	21	43701 756	R	G	96	2	11290 8452	R	C	96	ATGGCTAGGAT GCCCCAGAC	TCTGAACCTT AGTTAGGAC	GGGCCCTCCTT TCCACTTC
2FH21F_02_168	21	43702 318	R	A	101	2	11290 9018	R	G	101	GGTGGTGGGCA GCATCTGG	ACTTCACCGG ATGATCTGG	CGCGGAGGTGT GGAAGAAA
2FH21F_02_170	21	43702 512	R	A	103	2	11290 9212	R	G	103	AAGGATAGAAC AAGTCCCG	ATCCAGCCATC CACGCTCAG	CCTCCTCCCTC GCTCTC
2FH21F_02_172	21	43702 610	F	T	109	2	11290 9310	F	C	109	GGACATATTATA GCAAGGAG	AAAGTCTCTCA GGACCTGCC	AAAGGCCCTCG TGAGCTCTCC
2FH21F_02_173	21	43702 645	F	T	115	2	11290 9345	F	C	115	CAGGTCCTTTT CTTTTGGG	CAAAACGCC TGTGAGCTCT	CTCTCCTTGCTA ATAATGTCCCAC
2FH21F_02_174	21	43702 740	R	A	117	2	11290 9440	R	G	117	TCAGGAAGAAA CAGTCAGGC	ATGAAAGTGG CCCTGCTCTC	GCTCCACCTGC CGAGTC
2FH21F_02_175	21	43702 782	F	A	96	2	11290 9482	F	G	96	TTCAGCCTGA GGCTGTTTC	TCTCAGACTC TCCCTTG	GGGAGGGGAAA CCTGCGG
2FH21F_02_177	21	43702 889	R	C	112	2	11290 9589	R	T	112	CCATTGAAGCAT TCAGCAGG	AAGGAGGCT GCCAGGAC	CTGTGGGGGGG GCCTGGTC
2FH21F_02_178	21	43702 910	F	T	115	2	11290 9610	F	C	115	AGCAAGGAGG CTGCCAG	CCATTGAAGCA TTCAGCAGG	GACCAGCCCCG CCCCACAGG
2FH21F_02_181	21	43702 989	F	A	100	2	11290 9689	F	C	101	AGTGTCTGCAG TTTTCTGGG	GGATGAGCAG CTCGCAATAG	GCTCGCAATAG GC0000
2FH21F_02_182	21	43703 008	R	A	99	2	11290 9709	R	G	100	GATGAGCAGCT CGCAATAGG	AGTGTCTGCA GTTTTCTGGG	CTGGGGGTGCC CCGTCTCTC
2FH21F_02_184	21	43703 202	R	G	108	2	11290 9903	R	C	108	CTCTCGGGCCA GGCCTCTC	TCACCCAGATT CCTGAAGAG	GGGCTGGGATG CTGGGGTG
2FH21F_02_185	21	43703 225	R	A	108	2	11290 9926	R	G	108	CTCTCGGGCCA GGCCTCTC	TCACCCAGATT CCTGAAGAG	CCAGATTCTCTG AAGAGGGGATG
2FH21F_02_189	21	43704 043	F	G	104	2	11291 0745	F	A	104	TCCTAAGCCCTT GCCCCCTG	GGAGAGCGT GGAGCAAGA	GAGCAAGAGGA GGAGGCTCGGC

Marker_I D	CH R_1	Marker POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_02_1 90	21	43704 153	F	C	117	2	11291 0855	F	T	117	GATCCCTATCTC TGTCTCGG	GTCTCAATCTT GTTGGCCAG	GGCAGTTTAT GAAAGTCAAGC CTA
2FH21 F_02_1 91	21	43704 243	R	C	105	2	11291 0945	R	T	105	AGAGATAGGGA TGCTCCAG	TGGGTGTTCT GCAGGCTGG	GGGTGGAGGTG CTCCAGGACT
2FH21 F_02_1 93	21	43704 508	F	G	108	2	11291 1210	F	A	108	TCATGTGGGGC TGGTGTAG	CCACCCCCAC CCCCTCAC	CCCACCCCGTC ACGCGCAT
2FH21 F_02_1 94	21	43704 539	F	C	107	2	11291 1241	F	T	107	AGGAGGAGGAG CCCACACTG	AGACACTGAC CCCAGAGAC	CTGGTGTAGGC GTGGGGTGGAC
2FH21 F_02_1 95	21	43704 601	F	C	111	2	11291 1303	F	T	111	GGTCAAGGTC CTGCACAC	TACACCAGGC CCACATGAG	GTCTCTGGGG TCAGTGTCTG
2FH21 F_02_2 00	21	43704 890	F	A	118	2	11291 1592	F	G	118	CAAGAGTTCAG ATGAGTGGC	TCTCCAGGA CTGGCCAACT	CCCAGGGCTCC TCCCC
2FH21 F_02_2 04	21	44919 978	F	T	108	2	86224 659	F	C	109	GGAGTGTCTC TTTGCACT	CAACATTATT TTGATTGGC	TTTGTATTGGCC TCACAAG
2FH21 F_02_2 06	21	44920 113	F	G	118	2	86224 795	F	A	118	AAGGAATCAG CAGTGATA	GGGTTAACAT TTAGAACAG	AACATTAGAAC AGTACTTGTAA
2FH21 F_02_2 07	21	44920 284	F	T	89	2	86224 967	F	C	89	TGGCTGAAGGA AGCCCGAAT	GCTGGCATAT GCTGTACAGGA	TGCTGTACAGGA TTTCCA
2FH21 F_02_2 08	21	44920 330	F	T	107	2	86225 013	F	C	107	TTGTCAATCAG CTGAAGGG	TATCTGTTTGG TTTCTAGGG	GCTTCCTTCAG CCAGTC
2FH21 F_02_2 11	21	44920 379	R	A	119	2	86225 082	R	G	119	CCCTTCAGCTG ATTGACAAA	TCCTATTGCAT TGAGCATGG	GCATGGTGCAT TGGAGCTAG
2FH21 F_02_2 12	21	44920 544	R	A	90	2	86225 231	R	C	90	GAAGTACTGGT ACAAGCTAT	TGCTGTTCAAA AACTGGCCC	TGGCCCGAAGG GTAGCAATGATT GAT
2FH21 F_02_2 13	21	44920 587	F	A	88	2	86225 278	F	G	88	CAGTGAAGAGA CCCTTAGAG	CAATCATTGCT ACCCCTCGG	GCCAGTTTTGA ACAGCATA
2FH21 F_02_2 14	21	44920 594	R	A	94	2	86225 281	R	G	94	CAATCATTGCTA CCCTTCGG	GGGTGTACAG TGAAGAGAC	GTGAAGAGACC CTTAGAG
2FH21 F_02_2 15	21	44920 624	F	T	108	2	86225 311	F	C	108	CAGCTATCCCT CCAGAGTC	TCGGGCCAGT TTTTGAACAG	CTTCACTGTACA CCCCA
2FH21 F_02_2	21	44920 652	F	T	118	2	86225 339	F	C	118	GCCATCAAGC CAACTGTTC	GTCTCTTCACT GTACACCCC	AGGACTCTGG AGGGATAGCTG

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
16													
2FH21 F_02_2 17	21	44920 732	R	A	92	2	86225 419	R	G	92	CAGAACAGTGG GCTTGTG	CAGCATGAAG ACCTCATCTG	AAGACCTCATCT GCAGAA
2FH21 F_02_2 18	21	44920 793	R	A	81	2	86225 480	R	G	81	TAATGCTCCAC TGAAGGC	TGAGTTGCT GAAGAGGAAG	AAGAGGAAGCC AGAAAAGCC
2FH21 F_02_2 19	21	44921 280	R	C	91	2	86232 120	R	G	91	AGCTCTCTGTTG AGCTGATC	CTCTCTACTGA TGATCTGAA	TACTGATGATCT GAACTCCCT
2FH21 F_02_2 20	21	44921 506	F	T	87	2	86240 216	F	C	103	CCTTTTTGACCA CATTATCC	AAGAGTTGC TGGGGCCAAG	GGCCAAGCCTC ATATAA
2FH21 F_02_2 23	21	44921 778	R	T	110	2	86247 238	R	C	110	GTGGAGTGTG CATTGACAG	GAAGATGCTCT GAGGCAA	TCTGAGGCCAA CTGCAA
2FH21 F_02_2 26	21	44922 084	R	G	94	2	86254 352	R	A	94	TGTTTTGGAGT TGTGAGGC	GGTCCACTAAA AATCTCTAG	AAATCTCTAGTG TATCAGAAAGTAA
2FH21 F_02_2 27	21	44922 157	F	G	84	2	86260 086	F	C	84	ACTCAGACAAA CTCTTCGAG	TTCTTGGCAA TGGAAACAT	TTGGCAATGG AACATTATAAG
2FH21 F_02_2 28	21	44922 175	R	C	92	2	86260 114	R	T	92	GGCAATGGAAC ATTATAAG	GAACACATAC CTTACTCAG	ATACCTTACTCA GACAAACTCTTC GAG
2FH21 F_02_2 30	21	46917 919	R	A	87	2	92420	F	A	87	GTATAATAATG TTCAGTTATC	ACTGGTCTTTT ACCTAGATG	TACCTAGATGAT TGCTTCTAAAT
2FH21 F_02_2 32	21	46918 360	R	A	92	2	91979	F	C	92	GTAAATCTTGT AAGTTGCAG	TTATGCCACTT GAGTGGGAG	ACATTGTTGGTC CAATACTAAT
2FH21 F_02_2 34	21	46918 645	F	A	115	2	91692	R	C	115	AGGTGCAACTC CAAAAAGC	AATCTTGAACC AGTGGTCT	ACCAGTGGTTC TGGCTCC
2FH21 F_02_2 35	21	46918 651	R	T	112	2	91686	F	C	112	CTTGAACAGT GGTTCTGGC	AGGTGCAACT CCAAAAGC	TGAGTTACAAAG ATTATGACAAG
2FH21 F_02_2 36	21	46918 748	R	G	107	2	91589	F	T	107	GGAGTTGCACC TGTCTTG	GGAATGACAA ATTGCCAAATC	TGACAAATGGC AAATCATGTCTT A
2FH21 F_02_2 39	21	46918 867	F	C	85	2	91470	R	T	85	TGTGGAGGAT TATTCTGC	TCCTTCTTATA ACAGTGGGC	ATAACAGTGGG CTTTCACAAT
2FH21 F_02_2 41	21	46919 142	F	T	112	2	91213	R	G	113	AGAATCTCTCA CACCTTGC	GCAGGGACTC CCCAAGTGT	ACTCCCCAAGT GTCCGACCCCC

Marker_ID	CH_R_pos	Marker_pos_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_pos_2	Marker_pos_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21_F_02_2_43	21	46919 207	F	G	93	2	91147	R	T	95	AGGACTCTGCA ACCCAGG	TGCTGGGCTG CCCTCCCTGT	GGTGTGAGGAG ATTCTT
2FH21_F_02_2_48	21	46920 267	R	T	92	2	90118	F	C	95	CTATAGAAATTA CTGGACT	GGAAGGAATC ATTCTGAG	AAGGAATCATTC TGAGTGAATA
2FH21_F_02_2_49	21	46920 298	R	C	86	2	90087	F	T	86	CAGTCAGAAATG ATTGCTTCC	TAAAGGGCTA GACAATGGG	AGGAGGAGAC TCAGAA
2FH21_F_02_2_50	21	46920 352	F	A	98	2	90033	R	C	98	ACATGTCCAAAT ATGCTCTG	TCCTACCCCA TTGCTAGC	TCTAGCCCTTTA AATACATTGAC
2FH21_F_02_2_54	21	46920 612	R	T	95	2	89503	F	G	95	TATTTTATTTTC CAATGTAGT	CAATTAGAAAT CTAGTGCAA	AATTAGAAATCT AGTGCAAAAGA
2FH21_F_03_0_05	21	15894 129	F	C	121	3	50774 887	F	T	119	TCATCCCATTT CTCAACTC	TATATAACT TAGTTTGGT	ATAATACTAGT TTTGGTCATCAA
2FH21_F_03_0_07	21	15894 317	R	G	95	3	50774 127	F	T	97	ATCAAGGCCAAT AGCCTA	CTTCTTTTGG TCCTCACCTG	CTTCACCTGATA ATTTTCACCAT
2FH21_F_03_0_08	21	15894 382	F	G	108	3	50774 062	R	T	108	TCAAAAGTGCT GGCCAGGTC	GATTAAGTGC AGAAAAGTG	GTGCAGAAAAG TGAATDCA
2FH21_F_03_0_11	21	15894 444	F	T	102	3	50774 000	R	G	102	CTTTGGTGCTT TATCCCTG	GGTAATTTTTC CCTTGGG	CTGGCCAGCAC TTTTGA
2FH21_F_03_0_12	21	15894 451	R	T	99	3	50773 993	F	G	99	GACCTGGCCAG CACTTTTGA	CCCAAGCTTAA AATGTGGGC	ACCTTTGGTGTC TTTATCCCTG
2FH21_F_03_0_13	21	15894 476	R	C	99	3	50773 968	F	T	99	GACCTGGCCAG CACTTTTGA	DCCAAGCTTAA AATGTGGGC	CAAGCTTAAAT GTGGGCCCTAGA
2FH21_F_03_0_14	21	15894 647	R	G	113	3	50773 797	F	T	113	GTTAAGGCTGTC TAAGGCTAC	GTGTCCAGTA GAAGGAAAAC	AAACTTAGCTG AAAGGAACATG
2FH21_F_03_0_15	21	15894 746	F	T	120	3	50773 698	R	G	120	TTCCTCTAAAT CCTTAGC	GAGAAAGATA TTTATGAGAC	GAGACTATTAG GAATATATAAT
2FH21_F_03_0_17	21	18755 783	R	T	120	3	10758 8227	R	C	120	TCATATCTTAC AGTACAG	GAGGTCAAT TTATTTCAT	CATAAAATGTGT AGTATTTCTAG
2FH21_F_03_0_18	21	18755 822	F	T	120	3	10758 8256	F	C	120	GAGGTCAAT TATTTCAT	TCAATATCTTA CAGTADAG	AAGAATACTAC ACATTTATGTT
2FH21_F_03_0_18	21	18756 063	R	A	95	3	10758 8491	R	G	95	TAGTGGCCCTG AGTTCAA	TAGAAGAAGC TCCTCCTCC	CTCCTCCCATAA AGGAAGA

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
21													
2FH21 F_03_0_22	21	18756 109	F	C	91	3	10758 8537	F	T	91	GCTGATCAAGG CAGTTTTC	TTCTTTATGG GAGGAGGAG	AGTTCTTTCTA TGCTTTTGTTA T
2FH21 F_03_0_25	21	19539 204	F	A	109	3	14464 204	F	T	109	CATGGTGTCTT CGATGCAG	ACTACCTGTTT CAGTCCTTC	CTTCAGAAAG AGCTGCC
2FH21 F_03_0_26	21	19539 233	F	G	103	3	14464 233	F	A	103	GAGCTGATGGT GATCCAGAC	GGCACACTGC AACCACAGC	AACCACAGCTG GAACAC
2FH21 F_03_0_27	21	19539 238	R	C	98	3	14464 238	R	A	98	ACTGCAACCAC AGCTGGAAC	GAGCTGATGG TGATCCAGAC	ATGGTGCTCT CATGCAG
2FH21 F_03_0_28	21	19539 267	R	G	106	3	14464 267	R	A	106	TGCAACCACAG CTGGAACAC	TTGGTGGAGC TGATGGTGAT	GGTGATCCAGA CACTCT
2FH21 F_03_0_30	21	19775 552	F	G	89	3	14950 732	R	G	89	ATTCCTGGTCTT GGCAGATG	AGAACAGCCT CAGGCCACGA	ACAGCCTCAGG CCACGACTTCT GTGCT
2FH21 F_03_0_31	21	19775 569	R	A	83	3	14950 715	F	C	83	TCAGGCCACGA CTTCTGTGC	TGAATTCCTGG TCTTGGC	CTGGTCTTGGC AGATGG
2FH21 F_03_0_39	21	25854 993	R	C	100	3	11661 0381	R	G	100	AGCCATGAAG GCTTCCAAA	CAAGTTGTCTC TGACCTAGC	TCTGACCTAGCT CCCTT
2FH21 F_03_0_40	21	25855 024	F	G	95	3	11661 0412	F	T	95	CTTGTGCTCG GTTTTCATT	GAGCTAGGTC AGAGACAAC	TCAGAGACAAC TTGAACA
2FH21 F_03_0_43	21	27438 037	F	C	81	3	49370 800	F	A	81	TGTGAGCCTGG GCTCCCTG	TGTAGTCCCG GACCCGTGGTG	GCCACATTCTC GATAAGTAGT
2FH21 F_03_0_53	21	32740 757	F	A	86	3	13127 1948	R	G	86	GTAGGCAAGCT CATGCATTC	ACCAAGGTGT GGGAAATT	TGTGGGAAGTT CAGTGGC
2FH21 F_03_0_58	21	33872 005	R	T	113	3	13725 6165	R	A	113	CTATGTGGAATA CAAAATGCC	CCTACTGATTT ATAATTCC	AATTCCTTATT TTCACATATACT AAA
2FH21 F_03_0_61	21	33872 562	F	G	101	3	13725 7230	R	G	101	TAAAGATGATTT CCCAAGT	AAGGAGCTTA CTAACTGTGG	ACTGTGGTTTG CACCCATA
2FH21 F_03_0_62	21	33873 563	R	A	94	3	13725 7154	F	C	94	TATCAAGTACTT TGTCAT	CTCTGCAGTAC TGTATCCAC	CCAAGTCTGT ATTAAACA
2FH21 F_03_0_63	21	33873 613	F	T	101	3	13725 7104	R	G	101	GCCTCATCTCT GCATTAC	TCGTGTGGATA CAGTACTGC	CAGTACTGCAG AGAAAGA

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_03_0 64	21	33873 618	R	A	101	3	13725 7101	F	C	101	TGCTGTGGATA CAGTACTGC	GCCTCATCTC TGCAITTCAC	ACCATGCTGCT CAAATCTTCACA GAG
2FH21 F_03_0 66	21	33873 672	R	G	100	3	13725 7045	F	T	100	CATGGTCACTG AATGCAGAG	CTCTTCTGGA TACAGAGAC	AGTTGGAGATT ACAGGT
2FH21 F_03_0 71	21	39487 857	R	T	97	3	64964 43	R	C	97	TGCTTTAAAGA CATCAGG	AGAGTGGTAT TTTGGTTT	AGTGGTATTTG GTTTTAATC
2FH21 F_03_0 73	21	39487 887	R	G	98	3	64964 73	R	A	98	CTTCTGATGAAA CCAAATC	CTTTCAGTCCA AAATAGTTAG	CCAAAATAGTAA GACCOCTG
2FH21 F_03_0 79	21	39488 200	R	A	94	3	64967 80	R	G	94	AAATTAATGGAT TTGACATC	CTGAAAAGACT AATGGGATGC	TGGGATGCOCT TTACTT
2FH21 F_03_0 80	21	39488 320	F	G	101	3	64969 02	F	A	102	AACTGAGATAG GTGGGAAAC	GAGAAGAAAA GCATCATAG	AGAAAAGCATC ATAGTCTGAAA TG
2FH21 F_03_0 81	21	39488 330	R	T	100	3	64969 12	R	C	101	GAAGAAGCATCAT AGTTCTG	TATCAACTGAG ATAGGTGGG	CCCTCATTTGT GGCTTAG
2FH21 F_03_0 83	21	39488 395	F	C	119	3	64969 78	F	T	119	CTATTCATTG ACATAGTAG	AGGTTTCCAC CTATCTCAG	TGTCCAAAACA TCCTC
2FH21 F_03_0 84	21	39488 417	F	A	119	3	64970 00	F	G	119	CTATTCATTG ACATAGTAG	AGGTTTCCAC CTATCTCAG	CATGCATCAGA GTAGAAAGA
2FH21 F_03_0 85	21	39488 427	R	T	118	3	64970 10	R	C	118	CCACCTATCTC AGTTGATA	GTTATCTATTC ATTGACATAGT AG	GTTATCTATCC ATTGACATAGT AG
2FH21 F_03_0 87	21	39488 728	F	C	108	3	64972 01	F	T	108	GGACTTGATTTCA AATGGTT	CACAATTAGG GCTAATAAA	GTGGGTACTG TAACATAT
2FH21 F_03_0 88	21	39488 868	F	C	119	3	64973 41	F	G	119	GTCCAAATATAA GAACTGTC	GGTTAGAAAAT AAGTGACTA	AAGTGTACTATT TGTGTGATAAA
2FH21 F_03_0 89	21	39488 934	F	A	120	3	64974 07	F	G	119	AGTTTACTGCTT CCATGTGC	ACATGACAGTT TCTTATATT	ACATGACAGTTT CTTATATTGGA CT
2FH21 F_03_0 91	21	39488 983	R	G	118	3	64974 55	R	A	117	GACAGTTTCTTA TATTTGGAC	TTAGTTTACTG CTTCCATG	TGCTTCCATGTG CAATC
2FH21 F_03_0 93	21	39489 193	R	A	109	3	64976 64	R	G	109	TCCTTAGCCCT GTACACTC	GTCCATAATC TTACTCTGTG	TTACTCTGTGAA ATAGAGGAAT
2FH21 F_03_0	21	39489 227	F	A	105	3	64976 98	F	G	106	CTCTGTCCAAG ATCTCCTG	CCCTTATTTCA CAGAGTAAG	TCACAGAGTAA GATTATGGAG

Marker_ID	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
94													
2FH21 F_03_0 95	21	39489 346	R	C	108	3	64978 17	R	T	105	TATATAGCATTT TGTTAGTG	GATTGAGTGC ATGTTTTA	TGAGTGCATGTT TTAAACCTCTA
2FH21 F_03_0 97	21	40695 570	F	C	116	3	14198 9208	F	A	121	AGGTCAGCAGC CTCCAGAG	ACAGCATGTT CCCACCAGG	CACACAGGTC AGAGAA
2FH21 F_03_0 98	21	40695 518	R	T	120	3	14198 9261	R	G	125	TCCCACAGGG TCAAGAGAA	CAGGTCTCCA GGTCAGCAG	CTCCAGGTCAG CAGCCTCCAGA GGG
2FH21 F_03_1 00	21	40695 680	R	G	108	3	14198 9303	R	A	106	TGCTGACCTGG AGACCTGC	ATATAGCTAGC AAGGCTGGG	AAGGAGAGCTG SCAAGA
2FH21 F_03_1 01	21	40695 692	F	A	106	3	14198 9335	F	G	106	ATATAGCTAGCA AGGCTGG	TGCTGACCTG GAGACCTGC	CTCCTTCCTCTT TCTCCAGA
2FH21 F_04_0 06	21	17983 704	R	A	80	4	94858 511	R	G	80	TCTAGAACTCTA TCAGAAG	TCTCAGAGGTA TGACTGAGC	ACTGAGCAGTT GCTCAAG
2FH21 F_04_0 08	21	22395 232	F	G	119	4	11083 2709	R	G	115	GATCTGTGTTA GCATTAT	TATGATTGAA ATCATTCAG	ATTGAAATCAT TCAGGACTTT
2FH21 F_04_0 10	21	23887 805	F	G	106	4	83204 418	F	A	107	TATAACACATCC CCACATGC	TAGTCTTTCT TGCTGGGA	TAGTCTTTCTT GCTGGGAATCA AA
2FH21 F_04_0 11	21	23887 842	R	G	107	4	83204 454	R	T	108	AGTCTTCTTGC TGGGAATC	TATAACACATC CCCACATGC	TCCCCACATGC ATCCTT
2FH21 F_04_0 14	21	31962 966	R	G	85	4	18480 1285	R	A	85	TGATCAGCTTGA AGATTTG	ACAGGTCATTG AAACAGACA	GGTCATTGAAA CAGACATTTAA
2FH21 F_04_0 15	21	31962 996	F	T	93	4	16480 1315	F	C	92	AAGAAATCTGA CAAGTTA	AATGTCTGTTT CAATGACC	CTGTTTCAATGA CCTGTATT
2FH21 F_04_0 17	21	33092 540	F	T	98	4	18547 3899	R	G	98	AAGAAGCCATC CAGAGAGAC	GGACACAAGT GCAGGTTGAG	TGCAGGTTTCAG GGCAAGGTTGTG
2FH21 F_04_0 18	21	33092 610	F	G	115	4	18547 3829	R	A	115	GTAAGAATTGG GGTAGGTC	TCTCTCTGGAT GGCTTCTTG	GGTGACTGACA GAGGGA
2FH21 F_04_0 19	21	33092 642	R	T	119	4	18547 3797	F	G	119	TCTCTCTGGATG GCTTCTTG	TGGAGTAAGA ATTGGGGT	AAGAAITGGGG TTAGGTC
2FH21 F_04_0 21	21	33092 683	R	T	111	4	18547 3758	F	G	111	CTAACCCCAATT CTTACTCC	GTAAGTGA GAAACTAGGG	GACACAGTCTC CAGCAGAAAT

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_04_0 22	21	33092 713	F	C	100	4	18547 3726	R	A	100	AAGCCAGTGA AATCACAGC	TCTGCTGGAG ACTGTGTCTT	GGAGACTGTGT CTTAAACTT
2FH21 F_04_0 23	21	44291 397	F	G	92	4	10109 0391	F	A	92	GAAGGAGTAGG TGGTGGGAT	CTGAAGCTCAA GCAAGCAAG	CAAGCAAGGCA GAGAAA
2FH21 F_04_0 24	21	44291 416	R	C	93	4	10109 0410	R	T	93	CTGAAGCTCAA GCAAGCAAG	GGAAGGAGTA GGTGGTGG	GAGTAGGTGGT GGGATCTC
2FH21 F_05_0 03	21	15812 473	F	C	114	5	15749 0943	R	C	114	GAAGTGGCCTA TCAGGTCT	AACCATGGTTT GGGTTTAC	CACGTGTTCTAT ACAGTGTTCTTC
2FH21 F_05_0 05	21	15812 543	F	T	101	5	15749 0873	R	G	101	GGTGGTAATG AGATGACTG	TGTAAACCCA AACCATG	CCCAAACCATG GTTCCT
2FH21 F_05_0 06	21	18426 542	F	A	93	5	16099 8928	R	A	91	GTTTCCCATAT CTAGATGTC	GTGAATCTTC CCACTCTC	CACCTCTCACTT ATCATCTG
2FH21 F_05_0 07	21	18426 561	R	T	99	5	16099 8911	F	C	97	GTGAATCTTCC CACTCTC	TCATATGTTT CCCATATC	CTATGTTTCC CATATCTAGATG TC
2FH21 F_05_0 08	21	18426 592	F	A	87	5	16099 8880	R	A	87	TCCAAGGATG GAGGACAC	GACATCTAGAT ATGGGAAAC	AGATATGGGAA AACATAAGAAAA
2FH21 F_05_0 13	21	18426 958	F	A	89	5	16099 8513	R	C	88	GTGCAACAAT GCCTTTAA	TTAACATGTTT TCTCTCAC	TAAACATGTTT CTCTCACTGTAC T
2FH21 F_05_0 15	21	18427 206	R	A	115	5	16099 8262	F	G	115	AAACAAGCACT GTAGAGTA	CTTCTTACAA CCTATGACTC	AACATTTGGCAA TTCGTAAATC
2FH21 F_05_0 16	21	18427 235	F	A	97	5	16099 8233	R	C	97	ATTATATAGAAC AAACCCC	CTATGGCAAT TCTGTAATTC	TACTCTACAGTG GTTGTTTA
2FH21 F_05_0 18	21	20033 996	F	T	99	5	64072 748	R	G	99	ACTTTTGAATGC CGCAAT	CTTCACTACTT GTACTGCTG	CCGTTTAAAGGT CTACTC
2FH21 F_05_0 19	21	20034 055	R	A	104	5	64072 689	F	G	104	GAGTAGACCTT AAAAGGGAC	TATTCAGTTCT TCATTCTC	ATTCAGTTCTTC ATTCTCTTCATC
2FH21 F_05_0 25	21	27040 842	F	T	105	5	35308 773	F	A	105	TATTTGTAATGT GAATTTGC	GGACACTAAA CAAAGACAGG	AAACAAGAGACA GGTTCAAAAATA C
2FH21 F_05_0 26	21	27040 864	F	G	105	5	35308 795	F	A	105	TATTTGTAATGT GAATTTGC	GGACACTAAA CAAAGACAGG	GGATGTTTCTG GAACAA
2FH21 F_05_0	21	31316 723	F	T	111	5	23151 508	F	G	111	TTAGCATTCCTC AGACTCAG	ATTGGCCAACA TCTCAACAG	ACATCTCAACAG AGTTACA

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
27													
2FH21 F_05_0 28	21	31316 765	R	T	114	5	23151 550	R	A	114	TGGCCAAATC TCAACAGAG	TTTCATTAGC ATCCACAG	GCATCCAGAG CTCAGA
2FH21 F_05_0 32	21	31918 345	R	A	118	5	17122 1502	R	G	118	GAATTAGACTAT CCCAGTGC	TTCACAGCAT ACTCTGGAC	TCTGGACTTTAT TTTGTACCAT AA
2FH21 F_05_0 33	21	31918 387	F	T	95	5	17122 1544	F	A	94	GGACITTTGGCA CCCAAGGA	AATAAGTCCA GAGTATGGC	GAGTATGGCTG GGAATT
2FH21 F_05_0 34	21	31918 647	R	A	108	5	17122 1804	R	G	108	CTTCCCTCTGG GCTTTCT	TGATGGTGGTT GTGAAAGTG	ATGGTGGTTGT GAAAGTGATTAA G
2FH21 F_05_0 35	21	31918 687	F	T	83	5	17122 1844	F	C	83	GTAACAATAAA CCTCCATTC	CTTCACAACC ACCATCAAG	CACCATCAAGC TTACAACATC
2FH21 F_05_0 40	21	31918 896	F	C	119	5	17122 2085	F	T	118	CCAATAAACAG CCTCTATA	CTCAATGCAAA GGACAATC	CCTTCCCTTTAG TAGTAGAG
2FH21 F_05_0 41	21	31918 920	R	A	91	5	17122 2089	R	C	91	CCTTCCCTTTAG TAGTAGAG	AGGACCAATAA ACAGCCTCC	ACCAATAAACAG CCTCTATAAA
2FH21 F_05_0 44	21	31918 409	F	C	82	5	17122 2232	F	T	82	CACAGCCAAA TGTGTAAATG	GATGCCAACG TCTTTCC	ATGCCAACGTC CTTCCATGCAC
2FH21 F_05_0 45	21	31919 418	R	G	82	5	17122 2241	R	A	82	GATGCCAACGT CCTTTCCAT	CACAGCCCAA ATGTGTAATG	AAATGTGTAAT GGCACTGT
2FH21 F_05_0 47	21	31919 498	R	G	118	5	17122 2321	R	C	118	CCATTACACAT TTGGGCTG	CCACCCCACT CATCTCTG	CCAGTCATCTCT GGTGTC
2FH21 F_05_0 51	21	31919 696	R	A	112	5	17122 2519	R	C	112	GATGCATGAATT CCAGAGCC	CAAAATCAATT ATTCTGTGC	TGGCCCTGGGA AGGGAAATAA
2FH21 F_05_0 54	21	31919 824	F	T	90	5	17122 2647	F	A	91	TATATTATACAA TAGAGAGG	ACTCAGGAGT ACTTATGAGA	TGAGAAAAGA ATAAGAACAATA A
2FH21 F_05_0 58	21	31920 049	R	C	104	5	17122 2680	R	T	104	AGGTAATCCAC ATCAACC	CTTGAGACACT AATACAGAG	ACTAATACAGAG TGTGTTCCG
2FH21 F_05_0 61	21	31920 141	R	T	81	5	17122 2872	R	C	81	ACTGTTATGTAC ATTATATC	GTTGCTTGC CTCCTAATT	CCTCTAAATTTA AAACTACTGTATT C
2FH21 F_05_0 64	21	31920 848	F	T	101	5	17122 3266	F	C	101	TTTGGGTGCC AAACACTA	TGACTTGGAC GGTAAAGG	TTGGACGGTCA AAAGGAGATG

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Marker_POS_2	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Marker_POS_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21_F_05_0_66	21	31920 882	R	A	R	17122 3300	R	17122 3300	102	5	17122 3300	R	17122 3300	102	GGACGGTCAAA AGGAGAATG	GTGAAATTTTG GGTGCCAAAC	GGGTGCCAAAC ACCTAC
2FH21_F_05_0_67	21	31920 932	R	G	R	17122 3350	R	17122 3350	99	5	17122 3350	R	17122 3350	99	TGGCACCACAAA ATTCACTG	GGCCTCTAATT TATATGC	TATTGCTTTGCA CTTTGGTTTGAT A
2FH21_F_05_0_69	21	31920 969	R	A	R	17122 3408	R	17122 3408	112	5	17122 3408	R	17122 3408	113	ATCAAAACCAAAAG TGCAAAGC	GAAGAGAAC ATAGAATCTG	GAATCTGTTTAA CAGAAGTAAAT
2FH21_F_05_0_72	21	31921 065	F	A	F	17122 3484	F	17122 3484	116	5	17122 3484	F	17122 3484	115	TTTGAGAAGGA GACCTTAGC	ACATTTGAAAC ATTAGATTTT	CATTGAAACAT TAGATTTTTCAC CT
2FH21_F_05_0_73	21	31921 138	R	T	R	17122 3556	R	17122 3556	100	5	17122 3556	R	17122 3556	100	GAAGCTAAGGT CTCCTTCTC	GCAAAGCAGC CTAACCTTTC	TTTCTCACCTCT GATTCC
2FH21_F_05_0_74	21	31921 163	F	G	F	17122 3581	F	17122 3581	103	5	17122 3581	F	17122 3581	103	GATGCAAAGCA GCCTAACTC	GAAGCTAAGG TCTCCTTCTC	GAATCAGAGGT GAGAAATGTGG G
2FH21_F_05_0_76	21	31921 354	R	T	R	17122 8281	R	17122 8281	101	5	17122 8281	R	17122 8281	101	GTGCAGACTGT TATCTAGAG	TAAATGTGCCT CCCAGTGGC	TGCTCCCAAGT GCCCAGAATGA GACCC
2FH21_F_05_0_80	21	31921 962	F	C	F	17123 6063	F	17123 6063	113	5	17123 6063	F	17123 6063	113	ACACGGGTGAA GTTCTTAAC	TCTTTGGAACA GGTCAACAT	AGGTCAACCAT AGTCCA
2FH21_F_05_0_83	21	31922 417	F	T	F	17125 9565	F	17125 9565	84	5	17125 9565	F	17125 9565	84	GAATGCTTTGG AAGAAGCTG	GAAAGTCCTTT CCATAGGGG	TCCATAGGGGA TCAGTG
2FH21_F_05_0_88	21	31922 614	F	G	F	17127 0233	F	17127 0233	84	5	17127 0233	F	17127 0233	84	GTGGAACATCTT ATTTACG	TGCAACATGG GCTTCAGGTA	GGCTTCAGGTA AGAGTT
2FH21_F_05_0_91	21	34117 690	R	G	R	10718 223	F	10718 223	83	5	10718 223	F	10718 223	83	AGAAATTTATGC CATGTAC	CCTTGCTGAAA GGTAAATC	TCTCCTTGCTCA GAACTCT
2FH21_F_05_0_92	21	34117 728	R	G	R	10718 185	F	10718 185	106	5	10718 185	F	10718 185	106	CAAGGAGATTTA ACCTTTC	TTGTCGCCCA CTGTTCTGT	TTCTTGGTAACC AAAATCACATC
2FH21_F_05_0_94	21	34117 762	R	T	R	10718 152	F	10718 152	111	5	10718 152	F	10718 152	110	CTGAGCAAGGA GATTAAACC	TTGTCGCCCA CTGTTCTGT	TGCCCCACTGT TCCTGTCCACC
2FH21_F_05_0_96	21	34130 564	F	C	F	10717 750	R	10717 750	82	5	10717 750	R	10717 750	92	TGATGATCTGG OCCTTGTTG	AGGTGATTGG GATGTACGAC	AGGACTACACC GCGCAGAATGA
2FH21_F_05_0_97	21	34130 701	F	G	F	10717 713	R	10717 713	98	5	10717 713	R	10717 713	98	TGACTTCTCCTT TCCACCAG	ATGAGCTGGC CTTCAACAAG	AAGGGCAGAT CATCAAC
2FH21_F_05_0	21	34130 721	F	T	F	10717 693	R	10717 693	89	5	10717 693	R	10717 693	99	ATGAGCTGGCC TTCAACAAG	CCCACCTGTCC ATTGACTTC	TCTCCTTTCCAC CAGTC

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Marker_POS_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Marker_POS_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
98													
2FH21_F_05_0_99	21	34131201	R		91	5	10717567	F		91	TCATATGTTGTC CATCCCC	TGGGCAGTGA TATGGCATAG	GGGCTCTTTG AGGACTT
2FH21_F_05_1_01	21	34131361	F		104	5	10717407	R		104	TTGCTGCTATC TCTGCAAG	AGAAGAACTCA CTGCAGAG	TACCTTAGTTGC ATGTGAT
2FH21_F_05_1_02	21	34131411	F		110	5	10717357	R		110	GGGAAAGTCAA TTTGAGTAAC	TTACTTGCAGA GATAGGAGC	AGAGATAGGAG CAAAAATTACAA AAA
2FH21_F_05_1_09	21	39372630	F		82	5	21021038	R		82	CTCTTCTTAATG GGAAGCAG	TCCCAACATTG GGCAAG	CTTGGGCAAG TTGACA
2FH21_F_05_1_10	21	39372638	R		80	5	21021030	F		80	CCAAACTTGGG CAAAGTTGA	TCCTCTTCTTA ATGGGAAGC	ATGGGAAGCAG CTCCTTA
2FH21_F_06_0_01	21	17888275	F		81	6	139839257	F		79	CATGTTAGCAC CTCACTA	TACCTTTTCT CAACATGA	CTCAACATGACA CCAACACA
2FH21_F_06_0_04	21	26521837	R		98	6	114291260	F		98	GGAATTGGATC AAATGATT	TGGCAGTATG TATAATGGC	TAATGGCATTG CTGTGGT
2FH21_F_06_0_05	21	26521929	F		110	6	114291168	R		110	GGAAAAAATGT TAATATGGC	CAACTACTGAAC TGTAACAGAG	AAGAGTTATTA TTTTCCTTAAAT CTC
2FH21_F_06_0_06	21	26521974	R		91	6	114291124	F		90	CATCCAAGTTT TGATACATCA	TTTAGTAATAC AAAAAGGCC	AAAAAGGCCATA TTAACAATTTTT CC
2FH21_F_06_0_07	21	26522028	R		89	6	114291070	F		89	CATGATGTACAA AACTTTGG	GGTGGATTTC CTCCAAGTATT	GGTGGATTTC CTCCAAGTATT AAA
2FH21_F_06_0_11	21	26527970	R		116	6	114290746	F		117	GTTAAGATAGG AAAGACCC	TTTAGTTAGG GTTTCTTG	TAGTAGGGTTT CTTGATCTTGG
2FH21_F_06_0_12	21	26528056	F		101	6	114290660	R		101	GGATAATGGA TCAAAAATAG	CCCTCTAAGT GTTATTG	CAAGGTGTTT GGTAAGGTC
2FH21_F_06_0_13	21	26528063	R		82	6	114290653	F		82	TTAGTAGCAAG GGTGTGG	TAAITGGAAAT AATGATCA	ATTGGAATAATG GATCAAAAATAG
2FH21_F_06_0_15	21	26528520	R		117	6	114290188	F		117	GACATCATCCAT TCAACACC	GCTTAGTGCTT GGCTAATTC	TTGGCTAATTC CAAAATTATGC
2FH21_F_06_0_18	21	26528680	R		95	6	114290028	F		95	TCTATAGACTCT CACTCAG	GAGAAAATTC ATAAGGCC	GAGAAAATTC TAAAGCCATTCT C

Marker_I D	CH R_1	Marker POS 1	SE NS E1	Mar ker 1	AMP LEN 1	CH R_2	Marker POS 2	SE NS E2	Mar ker 2	AMP LEN 2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_06_0 23	21	26528 889	R	A	111	6	11428 9819	F	C	111	TGGTAACAGATT TGACATGG	TCTGAAGTTT CAAGCTCTG	TCAAGCTCTGAA ATTCATAATC
2FH21 F_06_0 25	21	26528 957	R	A	118	8	11428 9751	F	C	118	TCAGAGCTTGA AAACTTCAG	TGAGACTTCTA GGTCTTAGG	GGTAAATTTTA GGAAGATCTTG
2FH21 F_06_0 26	21	26528 017	F	G	118	8	11428 9691	R	T	119	TTCTGTGAGCA CACTAANA	TAAGACCTAGA AGTCTCAG	AGTCTCAGTATT ATTAGAACATAA A
2FH21 F_06_0 28	21	26529 086	R	T	97	6	11428 9611	F	G	97	GTGTGCTCACA GAAATTAG	GAGATGGAAT GTAACCTTGC	CTACAAAAATT GCTATTAACTC CT
2FH21 F_06_0 29	21	26529 157	F	G	118	6	11428 9550	R	T	118	TCAGATGCAAT GGTTTGTG	GCAAAGTTACA TTCCATCTC	TTCCATCTCTAA GTCAAAATTGCTC
2FH21 F_06_0 31	21	26528 316	R	G	104	6	11428 9392	F	T	105	CCACAGTATAAA CAGTAAC	CTGCAGTCATC TTGGACCTT	AAACTCAACCAA GCTGTGATAAG
2FH21 F_06_0 34	21	26529 525	F	C	94	6	11428 9182	R	T	94	TGTACAGTCA GTGATTAG	ATTAAGGTGAT AAACCAGC	GTCATAAACCA GCAATAACAAT A
2FH21 F_06_0 35	21	26528 569	F	C	105	6	11428 9138	R	C	105	GTCTACTTAAT CACTGAC	GATCATAGTCT TAGGAGTTC	GAACTTTTCACT TATCTCATGTTA G
2FH21 F_06_0 37	21	26529 646	R	A	119	6	11428 9061	F	G	120	GAACTCCTAAG ACTATGAT	ACAACACTACA AGTCTTGA	GAAAAACACC AATAOCCA
2FH21 F_06_0 38	21	26529 744	R	T	94	6	11428 8854	F	T	102	GAAATGGTGTG AAGGCTGTC	GTGTTGTAAAC CTGCTCAC	AAATACATGGTA ATAACTTTTCTT
2FH21 F_06_0 45	21	29875 665	F	T	86	6	10247 9244	R	G	86	ACTCAGACGTG GTGGAAAAC	TGAGAGCTCC AACTCCAAAC	TCCAAACAGA AACTATTAG
2FH21 F_06_0 46	21	29875 668	R	A	86	6	10247 9241	F	C	86	TGAGAGCTCCA ACTCCAAAC	ACTCAGACGT GGTGGAAAAC	GTGGTGGAAA CAATTTTAC
2FH21 F_06_0 47	21	30050 650	R	G	112	6	64135 65	R	A	112	AACGTGGCAAT GTCCCAAG	GTGAGCTAATG CCACATGGT	TAATGCCACATG GTAATTGCTGC
2FH21 F_06_0 51	21	31747 020	F	A	86	6	15491 2719	F	G	85	CCAGGTCTTGA TAGTCTTTG	AGATGAGTGA GCAGGAAGAG	AGAGGAGCTTG AGGATG
2FH21 F_06_0 52	21	31747 021	F	C	101	6	10748 8032	F	T	101	ACTGCTTTTCC AGGTCTT	TGATGAGATGA GTGAGCAGG	AGAGGAGCTTG AGGATGA
2FH21 F_06_0	21	31747 168	F	G	116	6	15491 2866	F	A	116	TGTATCTCCAC TTTGACC	AGAACAAAGT GGAAGATGC	AGGCTGAATGG GGAAAA

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Marker_POS_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Marker_POS_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
53													
2FH21 F_06_0 60	21	32835 972	R	A	117	6	15660 9546	R	T	116	GGTAGAGTTGC AAATAATT	CCACCCACATT TTTCTCAGC	ATACCTCCATCT GCACC
2FH21 F_06_0 61	21	32835 996	F	T	111	6	15660 9570	F	C	110	CCACCCACATT TTTCTCAGC	GTGCAATAA TTTGGTGAG	GCAGATGGAGG TATCTCTTA
2FH21 F_06_0 62	21	32836 018	R	A	94	6	15660 9591	R	T	93	GTGCAGATGGA GGTATCTCT	TTCTCCACCC ACATTTTTC	CTCCACCCAC ATTTTCTCAGC AATT
2FH21 F_06_0 64	21	32836 229	F	A	108	6	15660 9801	F	G	111	GGGAAAGGACA TCCCTTC	TGTAGTGATG GGAGGGATTC	GATTCAAATCCT CCTCTTCAGCAA AAG
2FH21 F_06_0 65	21	32836 400	F	G	92	6	15660 9975	F	C	92	CCTGTTTTGAGT ANACAGT	GTCTCATGGG CTGCAAAAC	GGGCTGCAAAAC CAACAA
2FH21 F_06_0 68	21	32836 489	R	A	116	6	15661 0074	R	G	116	ACTGTTTACTCA AAACAGG	GATACCTACTG AATTATTG	GATACCTACTGA ATTATTGAGGAT A
2FH21 F_06_0 73	21	32836 931	R	G	95	6	15661 0505	R	A	95	AATCACTGGGA AACAAAGAC	GAAATGCCAA CTTCTGGG	TTACCATTTGTG GTTTATTGTCTC T
2FH21 F_06_0 75	21	32837 154	F	T	106	6	15661 0726	F	C	106	TTCATTTGTCCC TGGTACAC	GACTGGAAC TGTGAAAG	ACTGGAAACTG TTGAAAGTTAAA AA
2FH21 F_06_0 76	21	32837 191	R	G	113	6	15661 0763	R	A	113	GACTGGAAC GTTGAAAG	GGATACTTTCA TTTGTCCTG	TTGTCTCTGGTA CACAT
2FH21 F_06_0 77	21	32837 231	F	C	86	6	15661 0803	F	T	86	AGAAAGGCTTG ACAATAAT	ATGTGTACCAG GGACAAATG	ATGAAAGTATCC TTCCAAATA
2FH21 F_06_0 79	21	32837 258	F	G	107	6	15661 0830	F	A	107	TGGATTGCTGT TGATCACC	CCCAAATTATT GTCAAGC	AAATTATGTCAA GCCTTTCT
2FH21 F_06_0 82	21	32838 067	F	A	90	6	15661 1192	F	G	89	TCAGACACTGC ATATTCTGG	AAATCTCCAGTA AACTCTAGG	GTAACCTCTAG GATATCCAAAG GTGT
2FH21 F_06_0 83	21	32838 110	F	G	87	6	15661 1234	F	T	87	GTTTGTCTGACA TTAGTTG	CAGAATATGCA GTGTCTGAG	GAATATGCGAT GTCTGAGAAAC TT
2FH21 F_06_0 84	21	32838 483	F	G	84	6	15661 1587	F	A	84	GCTAGAGAAA AGCCAGG	TCAGGGTACA AGCAGCTGTC	CAGCTGTCTGA CTCCAAACCTT TAT
2FH21 F_06_0 88	21	32838 840	F	C	82	6	15661 1764	F	T	82	GAAATATGTGC TTTTATCTG	TTATCTATAGA AACACTCC	AGAAACACTCC CAAAGC

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_06_0 92	21	32838 763	R	G	88	6	15661 1887	R	C	88	CCTTGATAGTAT TTGGCACTC	CATCATTCGCT ATTGACTG	TGACTGATTTT AACCTATCAT
2FH21 F_06_0 93	21	32838 962	F	C	97	6	15661 2095	F	G	97	TCCTGAAGTTCA GAAACAG	TTTCTTAACCA GAGAGCTTC	TAAACAGAGAG CTTCCTGGCCC ACA
2FH21 F_06_0 95	21	32839 594	F	G	94	6	15661 2730	F	A	97	AGACCTTATTTC CAAGGGA	TTCCAGGGC CCAAAGCAAG AATG	TCCGAGGGCC CAAAGCAAGAA AATG
2FH21 F_06_0 99	21	32839 825	F	C	89	6	15661 2965	F	T	89	GACTTGAGCAA CACAAATG	CTAAGTAAATC AGGCTTTGG	AGGCTTTGGAC AGGCTC
2FH21 F_06_1 02	21	32839 831	F	T	108	6	15661 3068	F	C	108	CCTTTCTGACA GAAAGGA	GATGGAATTTC TCTTTGCACC	AATTCTCTTTG CACCTGAACAA
2FH21 F_06_1 07	21	32840 060	R	T	108	6	15661 3197	R	C	108	CTTAGATTACA CTCAAGCC	TCTGTGCTAG GAGAAGGAG	AGGAGAAGGAG AATTGGG
2FH21 F_06_1 10	21	32840 630	R	T	116	6	15661 3770	R	C	116	GACTCATCAACT TCTCAT	GGAAACTCAA ACATGGACTG	AACATGGACTG GAGTGG
2FH21 F_06_1 11	21	32840 668	F	G	105	6	15661 3808	F	A	108	GTCTGTGATT CAAAACAC	CACTCCAGTC CATGTTTGG	GAGTTTCCAAA TCCACAT
2FH21 F_06_1 12	21	32840 695	R	T	118	6	15661 3838	R	G	121	CACCTCAGTCC ATGTTTGG	GGATTAAAT ATGCTGTTG	TCTGTGATTTC AAACACA
2FH21 F_06_1 13	21	32840 740	F	G	120	6	15661 3883	F	A	119	GAGAATTAAAT GAACGTGAG	GTGTTTGAAA TCAACAGAC	CATATACTTAAT CCTTTTGCCTCA
2FH21 F_06_1 14	21	32840 770	R	A	97	6	15661 3912	R	C	96	TACTTAATCCTT TTGCCCTC	GAGAATTAAAT TGAACGTGAG	GAGAATTAAAT GAACGTGAGAT TTC
2FH21 F_06_1 17	21	32840 889	F	G	111	6	15661 4032	F	A	107	CTGCATATATCT TCTGCCCTC	CTGGTTTGA TTACATTGGC	ATTACATTGGCT AACTTCAGAAAA
2FH21 F_06_1 18	21	32840 915	R	A	112	6	15661 4054	R	T	108	CTGGTTTGAAT TACATTGGC	ACTGCATATAT CTTCTGOC	CTTCTGCCCTCAA TTACTTTC
2FH21 F_06_1 19	21	32841 051	R	C	95	6	15661 4190	R	A	95	AAGCTATTAT CATAAC	AGAATGACAAC TGACATTT	GAGGCTTATAAA ATGATTAAAGG
2FH21 F_06_1 27	21	32844 567	F	T	91	6	15661 7501	F	C	91	GGGCTGCGAGT TCAAAATC	CTGCCCTTTC AATCTG	CCCTTTTCAATT CTGTCTGAG
2FH21 F_06_1	21	32844 629	R	C	120	6	15661 7563	R	T	120	GAATTGAGCTC GCAGGCC	CTGTGAACCA TGGGAAGTT	AAGTATACAATC AGGCAGAAAA

Marker_I D	CH R_1	Marker POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
28													GG
2FH21 F_06_1 29	21	32844 555	R	G	120	6	15661 7569	R	A	120	GAATTGAACTC GCAGCCCC	CTGTGAAACCA TGGGAAGTT	TGACTTTACAGG CACTT
2FH21 F_06_1 30	21	32844 700	F	T	119	6	15661 7634	F	C	119	AGAGGATTCAG CCTGCTCA	ATAACTTCCCA TGGTTTCAC	CCCATGGTTTCA CAGCAAG
2FH21 F_06_1 32	21	32844 750	R	G	96	6	15661 7684	R	A	96	GCACAGGCTTT TAAACCCA	GAGACATTGTC CTTTTGAAG	TTTGAAGATGTG GAAAGTAAT
2FH21 F_06_1 33	21	32844 772	F	G	117	6	15661 7706	F	T	117	GCAATTTTGACA CCTTAAAGC	TTGTCCCTTTTG AAGATGTGG	AGCAGGGCTGAA TCCTCT
2FH21 F_06_1 34	21	32844 793	R	A	120	6	15661 7727	R	G	120	AGTGAGCAGGC TGAATCCTC	GCAGCAGGGGT ATAACAAAGC	TGACACCTTAAA GCAGAA
2FH21 F_06_1 35	21	32844 826	F	T	103	6	15661 7760	F	C	103	TGGGTTTAAAG CCTGTGC	TATCTGTGTAG CAGCAGGG	GCAGGGTATAA CAAAGCTAAA
2FH21 F_06_1 37	21	32844 977	R	T	113	6	15661 7917	R	C	114	TATATGTGTAG CACAGAC	CTGTTTGACTA TTCTGATCTC	TGATCTCTTAAG ATGCATCTGAAA AA
2FH21 F_06_1 38	21	32845 021	F	A	114	6	15661 7961	F	C	113	ACTAGCTGTAAC CTTTGTGC	CTTAAGAGATC AGAATAGTC	ATCAGAATAGTC AAACAGTAG
2FH21 F_06_1 40	21	32845 086	F	C	102	6	15661 8025	F	T	102	ACGAGGTCAAA TCTGCTCC	CCATCTTCAAG TTTTAAGCAC	GCACAAAGGTT ACAGCTAGT
2FH21 F_06_1 41	21	32845 086	R	T	85	6	15661 8035	R	C	85	GCACAAAGGTT ACAGCTAGT	ACGAGGTCAA ATCTGCTCC	TCCAACAGTGG AAATAAAT
2FH21 F_06_1 42	21	32845 163	F	T	104	6	15661 8102	F	C	104	CTTCATTCAGAA TCTTTTTC	CAGATTGACC TCGTCTCTC	GCAGAAAACCTT CAACAAAGG
2FH21 F_06_1 44	21	32845 265	F	T	105	6	15661 8204	F	C	105	CACTGGGGAAA AGTGACCT	ATGCAGTGTCTT AGGAAGTGG	GTGCTTAGGAA GTGGATAAAG TCAA
2FH21 F_06_1 47	21	32845 497	F	G	103	6	15661 8436	F	A	103	TCTTTTGGAAATG GGAGGGAG	TGCCACTGCA CCAGGAGAA	AGGAGAAAAGG AGTCACTAG
2FH21 F_06_1 48	21	32845 501	R	C	103	6	15661 8440	R	T	103	TGCCACTGCAC CAGGAGAAA	TCCTTTTGGAAAT GGAGGGAG	TTTCTCTTCCC CATCC
2FH21 F_06_1 49	21	32845 574	F	C	118	6	15661 8513	F	T	118	GATGACATTCCTT CCTGTCT	TCCCTCCCATTT CCAAAAGAG	GAAGAAAAAG CTGGACAGCCA GATA

Marker_D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_06_1 50	21	32845 973	F	G	112	6	15661 8922	F	T	112	GCGTGAGTCTC TCTAAAT	TGCTTCAGCTA GGTGCTTAC	AGGTGCTTACA GGTGAA
2FH21 F_06_1 53	21	32846 019	R	A	102	6	15661 8968	R	G	102	CATGTAGCAAT TTGGTTTC	GGAGAAGAGC ATAGCTAGAC	GCCTGAGTCTC TCTAAT
2FH21 F_06_1 55	21	32846 052	R	C	108	6	15661 9001	R	T	108	CATGTAGCAAT TTGGTTTC	GAGGCTGGAG AAGAGCATAG	AGAAGAGCAT GCTAGAC
2FH21 F_06_1 56	21	32846 079	F	T	109	6	15661 9028	F	C	116	CCATTCAAACA AAGCCCG	GTCTAGCTATG CTCTTCTCC	CTAGCTATGCTC TTCTCCAGCCTC
2FH21 F_06_1 59	21	32848 617	F	T	87	6	15661 9268	F	C	87	AGAACCGAGGG ATGCAAAAC	TCCTTGAACA GCATGACTC	AAACAGCATGA CTCAGATAG
2FH21 F_06_1 63	21	32848 012	R	T	99	6	15662 1662	R	C	99	GGAACCAAGAC TACACTGAG	TGGTGTATTG GATGAGTGG	GAGGTTGAAGG AGAGGC
2FH21 F_06_1 65	21	32849 060	R	A	93	6	15662 1710	R	G	93	GGGCTGTTTCA ATGAGGGAC	GGTACCACCTC ATCCATAAAC	CTCATCCATAAA CACCAACACT
2FH21 F_06_1 66	21	32849 104	F	C	120	6	15662 1754	F	T	119	GATGCTGTGT CTAAATTTGG	TGTGTATCATA AAGTCCTC	CCTCATTGAAC AGCCC
2FH21 F_06_1 68	21	32849 146	R	A	113	6	15662 1797	R	G	112	GTCCCTCATTGA AACAGCCC	GGGAGGATGT CTGTGTCTAA	GGAGGATGTCT GGTCTTAAATTT GGT
2FH21 F_06_1 72	21	32849 578	F	A	112	6	15662 2268	F	C	113	ATTGTCCAATTA AATGACC	CTCTCTTCTGG AAATCATCG	GGAAATCATCG ATGAAAAAGCAT GTT
2FH21 F_06_1 76	21	32849 896	F	A	111	6	15662 2572	F	T	110	AGACCTTGTGT CTAGGGTG	AACAGCCAAA GCCTATC	GCAAAAGCCTAT CATCACA
2FH21 F_06_1 79	21	32850 613	R	G	103	6	15662 2980	R	A	107	CCTCATCATTTT CAGCCTGG	TATGGAGAG GGTAAAAAG	GGGAGAGGGTA AAAAAGAGTTAA
2FH21 F_06_1 82	21	32850 954	R	A	118	6	15662 5339	F	C	118	GCTCAGGTATTT TATAAGGC	AGTTAGTTACC AACTCCTAG	CCAACTCCTAG AAGCCA
2FH21 F_06_1 83	21	32850 996	F	A	113	6	15662 5297	R	C	113	GCTCAGGTATTT TATAAGGC	GTTACCAACTC CTAGAAGCC	GATGTGTAAAT AACTGAGAAAA
2FH21 F_06_1 94	21	32863 500	R	A	102	6	16117 8437	F	A	102	GAGAACCAGCCT AGAAGGCCAA	TTCCGAGGCC CACAGCTAAG	CAGCTAAGTCA CTCTGA
2FH21 F_06_1	21	32863 965	R	C	112	6	16768 4833	R	G	127	TCACTGAAACCC GGGGAAG	GGCAGCGAAG GGGCCTCAC	GCAGCGAAGGG GCCTCAGGGGG

Marker_I D	CH R_1	Marker POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
96													AC
2FH21 F_06_1 98	21	32864 171	R	C	115	6	16788 5060	R	T	114	GCGAAATGACC TGTTTACC	TGTAACACAA CGCAGGAAC	CGCAGGAACAT CATGAAAA
2FH21 F_06_2 04	21	32867 314	R	G	102	6	16752 1102	F	T	102	AGCTGTCCAGA TAATTTGGG	GAAGCCACAG GCTCACAG	GGATAAGAACC AGGAAACAT
2FH21 F_06_2 18	21	32883 453	F	G	100	6	16772 4982	F	A	100	ACCTTCAGTAC CACTATCTC	GAAGTTCCTTG TATTAAG	GAAGTTCCTTG ATTAAAGAAGT GG
2FH21 F_06_2 19	21	32883 480	R	T	93	6	16772 5019	R	C	93	CTGTATTAAAA GAAGTGG	ACCTTCAGTAC CACTATCTC	TCAGTACCACCTA TCTCAATCTT
2FH21 F_06_2 24	21	32885 410	F	G	107	6	16772 8703	F	A	107	GGAGTCAAGGG AGCATTTTA	CAAGGATTCCA GTACTGGAG	CAGTACTGGAG AATGTCT
2FH21 F_06_2 28	21	32885 661	R	T	88	6	16772 8958	R	C	90	GATGTACCTCT CTGCCTTC	ACGTAAGTCC CCACAGTTTG	GGGAGGCTTAG GGAGAA
2FH21 F_06_2 29	21	32885 700	F	C	118	6	16772 8997	F	G	142	GGGAGGTCAGG ACAATTTT	CTCCAAACTG TGGGGACTT	AAACTGTGGG ACTTACGTGT
2FH21 F_06_2 33	21	32886 101	R	A	99	6	16772 9422	R	G	99	ATGGGTGGACA AAACGAC	GAAGATTGCAT CTGGGTACAC	CAGCTCCTTGG TGTA
2FH21 F_06_2 38	21	32886 326	F	C	115	6	16772 9649	F	G	115	TGTGTGCAAGG CTCTAGAAG	TGTTCTTGTT GACTTTAC	CAACAGAGAA AATTAAATCAA ACA
2FH21 F_06_2 39	21	32886 535	F	T	118	6	16772 9855	F	G	116	TTTGGCCTTT CCAGGTG	CTGTCTCTGAG CTGATTGGG	TCCTGAGCTGA TTGGGGTTCTG G
2FH21 F_06_2 41	21	32886 576	F	G	118	6	16772 9888	F	A	116	TTTGGCCTTT CCAGGTG	CTGTCTCTGAG CTGATTGGG	AAGCTCAGGAG GACAAA
2FH21 F_06_2 42	21	32888 205	R	A	108	6	16773 2826	R	C	108	GAAGACAAGTA GCTGACCTG	AGGACATGGG GCTGTTTTG	GGAGAGGGGCC TAGGTG
2FH21 F_06_2 43	21	32888 229	R	G	108	6	16773 2850	R	C	108	GAAGACAAGTA GCTGACCTG	AGGACATGGG GCTGTTTT	AGGACATGGG CTGGTTTGTA AA
2FH21 F_06_2 50	21	32889 347	R	T	120	6	16773 3959	R	C	119	TGTATGACAAG CCATGTGGG	TCCTGTGTTTC TAGGAAGGC	TTCTAGGAAGG CAACAAT
2FH21 F_06_2 51	21	32889 391	F	C	119	6	16773 4003	F	T	119	CCTGTCAGTTCA ATGTGTAA	GAACACAGG AATAACCTGC	GGATAACCTG CAGCACCA

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_06_2 52	21	32889 422	R	A	114	6	16773 4034	R	C	114	ACAGGAATAAC CTGCAGCAC	CCTGTCAGTTC AATGTGTAA	AAAAGCACAAA AGTAGATTCT
2FH21 F_06_2 53	21	32889 464	F	A	113	6	16773 4078	F	G	113	ATTCATCGAATG TGGGCGTC	GTGCTTTTACA CATTGAAGTG	TGCTTTTACACA TTGAAGTGACA GGT
2FH21 F_06_2 54	21	32889 504	F	A	85	6	16773 4116	F	G	85	GCAGGATTCAT CGAATGTGG	AGGCATCGAC TGTACACAGG	CAGGCGCCAGT GGAGAGGT
2FH21 F_06_2 58	21	32889 591	R	A	124	6	16773 4195	R	G	116	CCACATTCGAT GAATCCTG	AGCTGCCTTTA TTGCTGCTC	TTTATTCGTGCT CAAGTTAT
2FH21 F_06_2 59	21	32889 621	F	T	103	6	16773 4225	F	C	103	ACAGGAGCAGT GTTTAGAGC	ACTTGAGCAC GAATAAAGGC	CGATAAAGGC AGCTCA
2FH21 F_06_2 63	21	34679 715	F	A	119	6	86502 282	R	C	119	CTTCAGCCTCC AGTTTTG	GGCAGCAAAA ACATTAAATTC	AGCAAAAACATT AATTCTCTGCCT G
2FH21 F_06_2 64	21	34679 765	R	A	115	6	86502 232	F	C	115	AACATTAAATCT CTGCCTG	TCTTCCTTTCA GCCTCCAG	CTCCTTTTCAGC CTCCAGTTTTCG
2FH21 F_06_2 68	21	36424 803	R	C	107	6	13526 0845	R	A	107	CCACTTGTTTAT AAGCATGGG	CAAAAAGACCT GCTAGAGGC	GCTAGAGCCAT TATTGC
2FH21 F_06_2 75	21	36680 355	R	C	103	6	10622 0838	R	T	103	AGACTCAGGAG GATGAAAG	CATGCTGGAA GTCCAGGCT	AAGTCAGGGCT GTACAC
2FH21 F_06_2 77	21	36707 214	F	T	111	6	10622 2106	F	C	111	GGGTCTTGGGT TCTGTCTGG	CAGCAAAAGAA AACCAGAGT C	ACCAAGAGTCA GACACA
2FH21 F_06_2 78	21	36707 282	F	G	84	6	10622 2174	F	A	84	TGGGGCCTGTC TGGCCTGAG	TGCCAGCAGA ACCCAGAC	AGAACCACAAGA CCCCAGCA
2FH21 F_06_2 79	21	36707 289	R	C	93	6	10622 2191	R	A	93	TCCAGCAGAA CCCAAGAC	TGTTGGGGCT GGGGCCTGT	TGGGCGCTGTC TGGCCTGAG
2FH21 F_06_2 84	21	36710 882	F	C	93	6	10622 2912	F	A	94	CTTCTCATCTT CCTAATTC	CTGGCATCCT CGTGAAGTG	ATGGAGGGACT CCTTTT
2FH21 F_06_2 88	21	44005 258	R	C	96	6	14831 246	R	T	96	ATGTTTCCTGTT CTCAGTGC	TGAAGGCAG GAACGTGGT	AGGCAGGAACG TGGTTTATGAC
2FH21 F_07_0 02	21	10017 549	R	T	81	7	15153 2773	R	C	81	GAAAGGCTTTG GAGATGAC	GGTTTAGGGA CTGAATAAC	GGACTGAATAA CTTAGTTACATA A
2FH21 F_07_0	21	10017 701	F	G	107	7	15153 2925	F	A	107	TGATGAAAGGA TTTGAGTGC	AGTCTATTGGA TTTAAACC	ACCATTTCCTTA TAAACCTGATT

Marker_I D	CH R_1	Marker POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
03													
2FH21 F_07_0 04	21	10017 727	R	T	117	7	15153 2951	R	C	117	CCATTCCATT AAAACCTG	CTCAATAAGAG TCATTATGCC	GATGAAAGGAT TTGAGTGC
2FH21 F_07_0 09	21	10018 035	F	G	114	7	15153 3282	F	A	114	TATCCTGTGTAC TGTTGAAA	TTGCCGACAC ATAAATCCAC	CACCAATACCTA TCCAAAAAGAA ATT
2FH21 F_07_0 16	21	10018 739	F	A	112	7	15153 3959	F	G	112	TGTATAAATGCC CTCATAC	CACAAACTAOC TAGATGACAC	TGACTGATATGA TTTCAGGGGGA C
2FH21 F_07_0 17	21	10019 087	F	C	99	7	15153 4313	F	A	105	TGCAGATTCTT CCAGGAAC	COCTCAATTAG AGGGTTGAC	GAGGCAGAGGA AAAGAAAA
2FH21 F_07_0 18	21	10019 153	F	T	119	7	15153 4385	F	C	119	GGTCATATCTAT AATAAGG	AAAAGTACACT TATAAGCC	ACACTTAAAGC CTCATGAT
2FH21 F_07_0 21	21	10019 238	R	C	88	7	15153 4470	R	T	88	GGTCTTATTAT AGATATGAC	CATTCGTATTC CATGAGACC	TTCATGAGAC CTTAAAGATAA CCT
2FH21 F_07_0 22	21	10019 283	R	A	92	7	15153 4525	R	C	92	GGTCTCATGGA ATACGAATG	GTAAGAGTGAT CTAAATCCC	TGATCTAAATCC CTTTTGATATG
2FH21 F_07_0 25	21	10019 407	R	G	89	7	15153 4640	R	C	90	CAATTAAACC TCATTGG	CACACGTGT GAGTAGGCTT	TGTTGAGTAGG CTTTCTCTTAG
2FH21 F_07_0 26	21	10019 536	R	G	113	7	15153 4770	R	A	113	GCCTACAACTTC TGATTGTG	TCAGGAGTGG AGAGAAAGC	GAGAAAGCGG TCTTGC
2FH21 F_07_0 27	21	10019 592	R	A	103	7	15153 4826	R	G	103	AAGACCGCTTT CTCTCCAC	GGCTCCTAGA ATTTATAGTC	AGTCCAGTTAAA AACCATGA
2FH21 F_07_0 28	21	10019 645	R	G	101	7	15153 4879	R	A	101	GGACTATAAAT CTAGAGC	TGTTTATGCAG GAGTGCCAG	AAGTATACAGTG TGAAGGGGAA
2FH21 F_07_0 29	21	10019 826	F	A	118	7	15153 5060	F	C	118	GTCGAAGTATG AACAAAAGCC	GTAATACTTC ACAATGAATC	TCCCAATGTTA ACCATTTTATTA AA
2FH21 F_07_0 30	21	10019 853	F	T	118	7	15153 5087	F	C	118	GTGAATACTTCA CAATGAATC	GTCCAAGTATG AACAAAAGCC	AAATGGTTAACA TTTGGGA
2FH21 F_07_0 33	21	10020 153	F	T	90	7	15153 5387	F	C	90	TCGAATCTAGT CGTGAGCG	ACACATCTGT TCCTTCCAC	CCACTCCCTTA GTTTCATCAT
2FH21 F_07_0 35	21	10020 360	F	C	102	7	15153 5594	F	A	102	AACACTGCACTA AGCAGCAC	ATCCCTGTGG TAGGAAAG	GGAAGTATGA AAGGAGATAGA AG

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_07_0 36	21	10020 375	R	C	102	7	15153 5609	R	G	102	ATCCCTGTTGGT AGGGAAG	AACACTGCAC AAGCAGCAC	ACTAAGCAGCA CAATTTCTA
2FH21 F_07_0 37	21	10020 466	R	C	115	7	15153 5700	R	T	115	AAGGGGAACAC AGAACTCAG	AGAGACCTGG ACCTGAAGAC	AGTGAATTTGTT AAGTGCAGATG G
2FH21 F_07_0 42	21	10021 598	R	A	101	7	15153 6832	R	G	101	CATGAACAGGG TATTTGTC	GCCATTATCAG ATTGTTATG	TGTTATGGAT TGGCCT
2FH21 F_07_0 50	21	10054 407	F	C	112	7	15156 9685	F	G	113	CCAATGGAATA TTGAGAG	CCACCTAGGA CGTTTTATTG	ATTAGTGGTAG GCAGTGGGG
2FH21 F_07_0 52	21	10054 485	F	T	104	7	15156 9764	F	C	104	GAACTGTCTACT GCCAACAT	GGTTTTCTCT GAGATTTGGC	TGGCTAACATAC ATCTTAAATTC
2FH21 F_07_0 53	21	10054 494	R	A	104	7	15156 9773	R	G	104	GGTTTTCTCTG AGATTTGGC	GAACTGTCTAC TGCCAAACAT	ACTGCCAACATA ATATTAACTAT
2FH21 F_07_0 57	21	10054 889	F	T	81	7	15157 0171	F	C	81	CTGCCCTGTGA ATGATG	ACAGTGTAATA AGTGCTGCA	CTGCAACTGGA TTGTAGG
2FH21 F_07_0 58	21	10054 933	F	A	106	7	15157 0215	F	C	107	TGCTGAACAGG GTGCTTAAC	CTACAATCCAG TTGCAGCAC	CACTTTTACAC TGTAATTAAGA T
2FH21 F_07_0 59	21	10054 956	R	C	110	7	15157 0239	R	T	111	CTACAATCCAGT TGCAGCAC	TAAGTGTGAA CAGGGTG	TGAACAGGGTG CTTAAC
2FH21 F_07_0 61	21	10055 024	R	G	116	7	15157 0307	R	A	116	TCTGCTGAGCA TCTATTATC	TACTGGTGA GGCAATTAGTG	TGTTTATTGAT GAATTCATACAC A
2FH21 F_07_0 63	21	10055 125	F	A	119	7	15157 0408	F	G	118	CAGTTGTAGAT TAAGGAGG	CCACCAGTAAT AACCTAGAA	ATCTTGAATTC TTCACCTTAAAA AA
2FH21 F_07_0 64	21	10055 286	F	T	108	7	15157 0578	F	C	108	CAGAAAGAAGC TTAATGCT	AAACACTACCT GGCAGGGAC	GGCAGGGAGTG AATTTGAACC
2FH21 F_07_0 67	21	10055 438	R	A	119	7	15157 0720	R	C	119	CTCAGGTAAACT GTGGAAGC	GTTGCTTCTAA ATAGCCTATC	TAAATAGCCTAT CCTCCAC
2FH21 F_07_0 71	21	10055 681	R	C	107	7	15157 0863	R	G	107	CCAAGGTTGCT TATAAACAG	CTTTACCAGT TATCTCC	TCCTCATGCTT TCACTTTC
2FH21 F_07_0 72	21	10055 703	F	C	107	7	15157 0985	F	G	107	CTTTACCAGTT ATCTTCC	CCAAGGTTGC TTATAAACAG	GAAAAGTGAAA GCAATGAAGA
2FH21 F_07_0	21	10055 918	R	T	95	7	15157 1200	R	C	95	GTAAGAAGA AATTAGACC	TTATGAAGGC TAAAGCTG	TATTGAAGGCTA AAGCTGATAATA

Marker_I D	CH R_1	Marker POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
74													
2FH21 F_07_0 81	21	10056 637	R	G	112	7	15157 1928	R	C	112	GAAAGCAATTA GAACATGA	ACCCTGTATGT ATCATCAG	AATGTAATCACA CTACTATGATCT A
2FH21 F_07_0 82	21	10056 705	R	C	102	7	15157 1986	R	A	102	GACGTGATGAT ACATACAGG	GTATTCOCAT CTAATTAGG	AATAATCTTAGG TCTTCITGTAT
2FH21 F_07_0 84	21	10057 393	F	A	92	7	15157 2885	F	C	95	GCAGGATTCA CAAGATGAG	CAATATCCAAT TTGCTGTCTG	OCAATTTGCTGT CTGTTACTTCT
2FH21 F_07_0 88	21	10057 855	R	A	116	7	15157 3150	R	G	117	ATTTAAACTGA ATATACTTG	TCTGTGTGTC ATGGAACAC	ACACATTTTAAT GCAGATAATTG
2FH21 F_07_0 90	21	10058 493	R	A	104	7	15157 3797	R	G	104	ATTGCCACCA TGAACACAG	CAATCTTTGG TCITTACCAG	CTAACCAAGAA ATGTAGATTAC
2FH21 F_07_0 94	21	10059 025	R	A	105	7	15157 4328	R	C	105	ACTAAAAGCTG GAGGGAGG	GCCCTCTTGT TACTACTTC	GCCCTCTTGT ACTACTTCATCA TTT
2FH21 F_07_0 95	21	10059 172	F	A	101	7	15157 4474	F	G	101	CCAGGTTCAATA CATTAGGAC	TAAGCCTGGA AATACACCC	CCCCTGCCCAA TATTC
2FH21 F_07_1 05	21	10059 545	F	G	108	7	15157 4848	F	T	107	AGACAAGGTAC ACGAAAGGG	GGCCTAGTTTT ACTGCACAC	GCCTAGTTTTAC TGACACAGCTT T
2FH21 F_07_1 06	21	10059 627	F	T	92	7	15157 4831	F	G	92	TGTGAAATAG TCTCCTC	TCCCTTCGTG TACCTTGTG	GTCTTTAGAGAA TAAATATATCT GG
2FH21 F_07_1 09	21	10059 776	R	C	116	7	15157 5081	R	A	116	GCCAACTTTAA TCCATTT	TCACAATAGTA ATTGGAG	TGATTGAATTG CTTCAAGT
2FH21 F_07_1 12	21	10059 962	F	G	82	7	15157 5288	F	A	86	CTACCTTTAAG AATGAGTTC	CATTTGCCAT GCAGTTTTAC	GCAGTTTTACTT AAATCTCACTTA
2FH21 F_07_1 15	21	10061 071	F	A	115	7	15157 6385	F	C	115	CTGCAGTTGTTA GAGGAACC	GTTTCTAGTGG AAGAGTGAC	TTTCTAGTGGAA GAGTGACAGAT TC
2FH21 F_07_1 16	21	10061 077	R	A	109	7	15157 6391	R	T	109	AGTGAAGAGT GACAGATTC	CTGCAGTTGTT AGAGGAACC	GAATCAAGGCC TCCAAAATT
2FH21 F_07_1 17	21	10061 102	F	T	109	7	15157 6416	F	C	109	CTGCAGTTGTTA GAGGAACC	AGTGAAGAG TGACAGATTC	GAGGCTTGAT TCTTCT
2FH21 F_07_1 19	21	10061 143	R	C	110	7	15157 6457	R	T	110	TTTGAGGCCCT TGATTCTTC	TCGTTACAC CAGATCAC	ACCAGATCACT GTGCAGCAAGA

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_07_1 22	21	10061 289	R	G	116	7	15157 8613	R	A	116	TATGCTTCACCT CAGAAGAC	TATCATCCCAA CATACAGT	TCCCAACATACA GTGAATAC
2FH21 F_07_1 28	21	10061 656	R	C	100	7	15157 8973	R	G	100	TGTATGTGAG GTACCTAAG	CATCTGGGTAT CTACTATTAG	TGCCTACACATT CTAGATCA
2FH21 F_07_1 30	21	10061 746	R	G	92	7	15157 7063	R	A	92	AGACTCAAAG CACAGACAG	GGTTGGCAGG TATGGTTAAG	GCAAAATAATA TTGGTGGTTAG
2FH21 F_07_1 31	21	10061 791	F	G	120	7	15157 7108	F	C	120	GATTTCCTGAGA TTAGTCTT	TTTGCTTAACC ATACCTGCC	CCATACCTGCC AACCTA
2FH21 F_07_1 35	21	10062 476	F	T	112	7	15157 7798	F	C	112	ATGCCAAAGAC ATTITTCG	CCATTGTCAAT TCITTTCCAG	ATCTCTTAACCTA AAAGATTAGTT AC
2FH21 F_07_1 36	21	10062 502	R	T	118	7	15157 7820	R	C	118	CCATTGTCAAT CTTTCCAG	GTCCTTATCCC AAAGACA	TTTATCCCAAAG ACATTTTTCG
2FH21 F_07_1 38	21	10066 084	R	A	93	7	15158 7748	R	C	93	ACCTATCTGACA ATGACTGG	TGCTCCCTGG TGAGGTGA	CCTGGTGAGCT GGAGTGGGG
2FH21 F_07_1 42	21	10066 675	R	A	99	7	15158 8323	R	G	99	CTCTCAAAGA GAATAGCAG	TCTCAGCTTGT TCTGTCTCC	CCCCTTTGGTG TGTCTCTTT
2FH21 F_07_1 43	21	10066 747	F	C	116	7	15188 8395	F	T	115	AAATATCTAGTAA CTACTGG	CACCCAGAAAT CTCTACCAG	CCCAGAAATCTC TACCAGTTCTCA AGA
2FH21 F_07_1 47	21	10087 472	F	C	104	7	15158 9128	F	A	108	GTGGAATGSGTTA TCTTTTCAC	GTTACCTCTAT TAAGCTTTTC	CGCTATTAAAGC TTTTCAAAGAT A
2FH21 F_07_1 50	21	10087 666	R	C	108	7	15158 9324	R	G	108	CATTACATAGAA TAAAGAAC	TGTGGCTGTGA TTTAGCAAG	GTGGCTGTGTTT TAGCAAGTAGG TCA
2FH21 F_07_1 51	21	10067 698	F	T	97	7	15158 9354	F	G	97	GACCACTATTAA TTGTTCCCT	GACCTACTTGC TAAATAACAG	CTTGCTAAATAA CAGCCACAAG
2FH21 F_07_1 52	21	10087 754	F	T	86	7	15158 9412	F	A	99	GATAGGAACAA TTAATAGTG	GTTAGATGAAG TCCCTTTTACC	GACTTGTGTTT CAACAAGTT
2FH21 F_07_1 53	21	10067 846	F	A	102	7	15158 9507	F	C	99	AAITTAACCTAAG GTAGGTTT	TAAACACAAT GCTACACC	ATGCTAGACCTT TAAAAAGTCA
2FH21 F_07_1 56	21	10068 270	F	G	103	7	15158 9837	F	A	103	GGCCAGAGTTC ATCACAATC	AAAGAGCTGC TGGGTAACTG	GGCTACCTGGG AAGTGGG
2FH21 F_07_1	21	10068 378	F	G	112	7	15159 0045	F	A	112	CTGCAAGCAGT ATTACCAGG	GAGAGAAGC CCCTCCCT	CCACCACTCAG GCAGATGCCTA

Marker_J D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
57													
2FH21 F_07_1 60	21	10068 563	F	C	101	7	15159 0229	F	A	101	AAGCACAGCA TTGTCATTG	ACATCACCTC CTTCCAG	AGGCCCTOCAC CTCCTC
2FH21 F_07_1 61	21	10068 616	F	T	120	7	15159 0282	F	C	120	TGACCCCTCAGG TGCTGCAT	AATGACAATGC TGTGCTTC	TGCTGTGCCTT CCACTCC
2FH21 F_07_1 64	21	10068 653	R	G	120	7	15159 0319	R	A	120	AATGCTGTGCC TTCCACTCC	ATGGAGATGA CCCTCAGGTG	TGGGCTGGAG CGGGTT
2FH21 F_07_1 66	21	10068 814	F	C	109	7	15159 0480	F	A	109	CCTACCTCACTT GGCTTCTG	ATCCCAAGGG CTATCTCCAC	CCCAACCCGGC TCTGAACGCCT C
2FH21 F_07_1 68	21	10069 480	F	G	94	7	15159 1158	F	A	94	AAACATAAGTTT AAAGATAAG	GCATCTTGCTA TCTTCTCCC	GCTATCTCTCC CGATTGCTTAAA AA
2FH21 F_07_1 76	21	10070 235	F	G	116	7	15159 1914	F	A	115	AGCTCTTCTTGC TTTCCCTG	CTCTGTTGAGA TTTTTGAC	GAITTTAAATTC AAGAGGAGGGG AA
2FH21 F_07_1 78	21	10070 329	R	G	113	7	15159 2007	R	A	113	GTGACTTTTAT GGAGAGG	GAATGAAATCT GGGGGATAA	ACAGGAAGATG GGTCAGTT
2FH21 F_07_1 79	21	10070 373	F	A	116	7	15159 2051	F	G	114	GAGTACTTGTG CTCCAAGAT	GCCTCCAATTA TTATTCAG	CCTCTCCATAAA AAGTCAC
2FH21 F_07_1 80	21	10070 397	R	C	92	7	15159 2073	R	G	90	CCTCTCCATAAA AAGTCAC	CTTGAAGGAA GAGTACTTG	ACTTGTCTCCA AGATCTTT
2FH21 F_07_1 81	21	10070 432	R	C	82	7	15159 2108	R	T	82	AAAGATCTTGG GGACAAGT	CTCAGTTTCTT GGGAAGGAT	TTCTTGGGAAG GATTAAAAGA
2FH21 F_07_1 83	21	10070 468	R	C	107	7	15159 2144	R	T	107	AGGACAAGTAC TCTTCTTTC	ATTCAGTAAAC ATTATTCG	ATTGAGTAAACA TTTATTCGATAC CTT
2FH21 F_07_1 86	21	10070 670	R	G	119	7	15159 2346	R	A	119	TGCGGCATAATT CTTGCTGG	ACCCCATGAT TCTAATGAG	GATAATTTGGG GATGTACCAG
2FH21 F_07_1 87	21	10070 767	F	A	119	7	15159 2443	F	C	119	ATCCTGGTCAG CATAAATCC	GGAGAAATGA CCAAGAGATG	GAGAAATGACC AAGAGATGAAAT AC
2FH21 F_07_1 88	21	10070 815	R	A	120	7	15159 2491	R	G	120	TTGAGTAGATCC TGGTCAGC	TGACCAAGAG ATGAAATAC	AAATTTGTAAT GCCACATATTTC
2FH21 F_07_1 94	21	10071 259	F	T	99	7	15159 2988	F	C	99	ATTCAAAGCTGT GTATGGG	GAACAACCTCT ATTATATTAC	ACAACCTCTATT ATATTACAAA C

Marker_1 D	CH R_1	Marker POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_07_1 95	21	10071 393	R	G	96	7	15159 3122	R	A	96	TTCGGCACACT TTGCACTC	TGTGTCAGC ACTATCATGG	TCATGGAATGT GCCTGGATA
2FH21 F_07_1 96	21	10071 850	F	T	115	7	15159 3379	F	C	115	GCATCATGAAC CTTTCAGAC	GATTAATACC CTACAGTG	ATACCTACAGT GTTTTATTG
2FH21 F_07_2 00	21	10071 825	F	C	108	7	15159 3554	F	T	108	GTTACACTGCAA AGCATTTTC	GCTGGATACC TAATTAATGC	TACCTAATTAA GCTCAATATATG CT
2FH21 F_07_2 02	21	10071 854	F	C	108	7	15159 3583	F	A	108	GTTACACTGCAA AGCATTTTC	GCTGGATACC TAATTAATGC	GAACCAACAA GGAAATAC
2FH21 F_07_2 03	21	10071 857	R	C	114	7	15159 3586	R	T	114	GCTGGATACCT AATTAATGC	GTTTATGTTAC ACTGCAAGC	CACTGCAAGC ATTCTTA
2FH21 F_07_2 07	21	10072 259	F	A	102	7	15159 3988	F	C	102	TATGCATAAGTT TAACGTGA	TACTAACAGTT CTTTTACC	AAATATAAGGAT AACTGCCCTG
2FH21 F_07_2 10	21	10072 886	F	T	93	7	15159 4614	F	C	93	GTTTCAAGATGC TTGACTGG	GAAGGTTGG TCAATCCTAT	CAATCCTATCAA TTTCTCTCTGAC TCA
2FH21 F_07_2 11	21	10074 617	F	C	93	7	15159 6351	F	T	91	GTTTCTTTGTAAG CATATGGG	GAATACCTATT ACCCACACC	TACCTATTACCA CACCAAAATAC C
2FH21 F_07_2 12	21	10074 885	R	G	119	7	15159 6617	R	A	119	CATCCCAGTTAT GTGCTTTC	TGGCTCTTTAA GTGATAGGC	ATCTAACAAATGG AAGCATCATAAA TT
2FH21 F_07_2 14	21	10075 482	F	A	96	7	15159 7193	F	T	96	TCAGTAAGGAAT TGGTGA	CTCTGCAACAA GACAACTG	CTGTCAATTGCA CAAAATCAC
2FH21 F_07_2 15	21	10075 500	R	C	116	7	15159 7211	R	T	116	GTCATTGTCCAA AAAATCAC	CCAATGATCCA TAGTAATC	TCAGTAAGGAAT TGGTGA
2FH21 F_07_2 16	21	10075 520	F	C	116	7	15159 7231	F	T	116	CCAATGATCCAT AGTAATC	GTCATTGTCC AAAATCAC	TCCACCAATCC TTACTGA
2FH21 F_07_2 19	21	10075 639	R	T	101	7	15159 7352	R	A	99	CTGGTGCAAAA ACACTTAA	GTTGGAACCA ACCTCATTC	TTCTTTTGTGA GTGCTTTTAAAA AT
2FH21 F_07_2 20	21	10075 594	R	A	81	7	15159 7407	R	G	81	AATGAGGTTGG TTCCAAACC	GGTGTGTTCCAG TATCCACC	TTCCACACATC TTCTC
2FH21 F_07_2 23	21	10076 079	R	A	113	7	15159 7787	R	G	113	GAAGTGATGA GTATTTGAG	AACCTGTCTCC CTTTACTTC	CCCTTACTTCA TTTAGCTTCAT
2FH21 F_07_2	21	10076 263	F	T	110	7	15159 7871	F	C	110	GCTGTTCACCA ATGCTTTTA	TAGAACAGAG CTTATCACAG	GCTTATCACAGA TCCTTAAAC

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
26													
2FH21 F_07_2_28	21	10078 328	R	G	117	7	15159 8037	R	C	117	CCAGACAACAC ATAAGAAT	CAATGCTGATT TGGTCCTC	TGACAGCTATTT TGACTTTT
2FH21 F_07_2_29	21	10078 363	F	G	104	7	15159 8071	F	T	104	GAAGCAATGC TGATTGGTC	TAAAGCATTG GTGAACAGC	AATAGCTGTCT ACAGTGTGAATT
2FH21 F_07_2_30	21	10078 479	F	A	118	7	15159 8187	F	G	118	TCYAGCCTCTTT GGATGAC	TTTCATCACTG GCAGGACAC	TTTGCTATAAA AGAGAATCTCT GG
2FH21 F_07_2_33	21	10078 516	F	A	119	7	15160 0224	F	T	114	ACCTTCAGTTAC ATGTTAG	CATTATATACA TGATCAACA CA	ATTATATACATG ATCAACAACAG CA
2FH21 F_07_2_34	21	10078 568	R	A	119	7	15160 0271	R	G	114	ATACATGATCAA CACAGC	AGTGATACCT TCAGTTAC	TATACCTTCAGT TACATGTTAG
2FH21 F_07_2_35	21	10078 595	R	A	84	7	15160 0298	R	G	84	CTAACATGTAAC TGAAGGT	ATGGCAGTGC TACTTTCTAC	TTTACTGTGAAA CTGTGTTCTAA
2FH21 F_07_2_38	21	10078 870	F	A	100	7	15160 0575	F	G	99	TCAATCTGAAA GAGAAGAAC	TGCACCTTGCTG AAGTAACTC	AGTAACTCAGTA CATAAATAGTAG CC
2FH21 F_07_2_39	21	10078 889	R	A	111	7	15160 0593	R	G	110	TGCACCTTGCTG AAGTAACTC	TGTACACTCT TCAATCTGG	TTCATCTGTGAA GAGAAGAACTT
2FH21 F_07_2_40	21	10079 022	R	G	89	7	15160 0722	R	T	85	GTTTGCCTTACC TATAATTG	TGTGTCCACAT ATGTAATC	CCACATATGTAA TCATATCAAC
2FH21 F_07_2_41	21	10079 119	R	C	108	7	15160 0819	R	T	107	AAAGGGTAATG ATCATGTA	CTTCTCCAGGT CTGTGAAC	CCAGGCTTAAA CTAATCTCAAT AC
2FH21 F_07_2_42	21	10079 159	F	T	82	7	15160 0859	F	C	82	GAGATTAGTTTA AGCCTGGG	TTTCTATCTT CTCCAGGTC	TTCTATCTTCT CCAGGCTGTG AAAC
2FH21 F_07_2_43	21	10079 181	F	A	117	7	15160 0891	F	G	116	CTTTTATATGTC ACCTCTTAG	CACAGACCTG GAGAAGATAG	CCTGGAGAAGA TAGGAAAAA
2FH21 F_07_2_45	21	10079 219	F	G	117	7	15160 0918	F	A	116	CTTTTATATGTC ACCTCTTAG	CACAGACCTG GAGAAGATAG	AACATTGCTAAG GAACAG
2FH21 F_07_2_47	21	10079 325	F	T	105	7	15160 1024	F	G	105	GAGATCTCTCT TTTCTTAC	GGAATTCAT AGACTAGGAG	TTCAATAGACTA GGAGAAAAA
2FH21 F_07_2_53	21	10079 512	F	T	99	7	15160 1209	F	A	95	GAATTATAAAT ACTATTGG	CCTTTTCATGA TTCATCTATC	CCTTTTCATGAT TCATCTATCTTA GTC

Marker_J D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_07_2 54	21	10079 748	R	C	131	7	15160 1433	R	T	119	ACTGGATGGCT TTTTAGTGT	CCACTGTAGAA AGATGTAA	CTGTAGAAAGAT GTAAATAGGA CT
2FH21 F_07_2 56	21	10079 996	R	C	120	7	15160 1681	R	T	120	ACACTCAGGGA ATTACAAC	GACCAAGCTC CTGAAAGATG	CTTTAAACTTC AACCAATGT
2FH21 F_07_2 62	21	10080 693	R	A	110	7	15160 2391	R	C	118	TACAAAATAAAC TCATCAAT	GTGATGCTA CATTGAAG	TGCTACATTGA AGTATGTAGTT T
2FH21 F_07_2 64	21	10080 826	R	A	99	7	15160 2525	R	G	99	TCCCAATTCAA CCTGCCTC	TAGACTGCC CTCTTGTG	TGTTGGGGC TTATTTCTGTG
2FH21 F_07_2 66	21	10081 077	F	G	101	7	15160 2776	F	A	101	GATCATGTAATG GCATAAGC	CTCTGTGGGA AATGACTATC	TATCTAACATAA ATTTTGTGTAC ACC
2FH21 F_07_2 68	21	10081 089	R	C	103	7	15160 2786	R	T	103	CTCTGTGGGA ATGACTATC	CTGATCATGTA ATGGCATAAG	TGATCATGTAAT GGCATAAGAA GTA
2FH21 F_07_2 70	21	10081 127	F	T	98	7	15160 2826	F	C	99	CAAGATAGTAT GGTGCCTC	CTTATGCCATT ACATGATCAG	GGCATTACATGA TCAGTTTATCTT TT
2FH21 F_07_2 71	21	10081 152	R	G	117	7	15160 2851	R	A	117	GCCATTACATGA TCAGTTT	CAGCATTTTG GTGCTTTGG	GATGATGTGT GCCTCAA
2FH21 F_07_2 77	21	10081 324	R	G	99	7	15160 3023	R	C	99	GTGGCTCATAA ACAGCTTAG	CCACAGTAATG TTAGCAGGG	ATGTTAGCAGG GTCCAACGTCT
2FH21 F_07_2 79	21	10081 461	R	T	95	7	15160 3160	R	A	95	TGTTTCAATGT TTTATGTG	GCAGTAGACT GATGACAGTG	GTGAGGAAGAG TTTGATAGTAGT TGA
2FH21 F_07_2 82	21	10081 890	F	T	116	7	15160 3598	F	C	118	CCTGTTTGTAA AAGCTGGT	GCTATTTTGGC ACTCAAGGG	TTTTGGCACTCA AGGGTATTATG
2FH21 F_07_2 83	21	10081 972	R	G	103	7	15160 3668	R	A	98	ACCAGCTTTTAC AAAACAGG	CTGGGTTCTGT TAATGCACT	TATTAGATAACC TTGGGAGTTA
2FH21 F_07_2 89	21	10082 542	F	C	92	7	15160 4236	F	T	92	TAGGAAGATAC ATTCCAGAC	AGCTAATGAAG AGCACTCGG	CACCTGGCAAT AAAGAAAA
2FH21 F_07_2 93	21	10083 271	F	G	109	7	15160 4963	F	C	112	TGAAAATTCTCT CAGACTC	CCCATATTAAAT CCAAGAAC	CCATATTAAATCC AAGAACACAATA A
2FH21 F_07_2 96	21	10083 542	R	G	84	7	15160 5235	R	A	84	TGGTTTATAGCT ACGTGCTC	AAACAAATTTG GAGCATGGG	ATTGGAGCAT GGGAGGCTTA
2FH21 F_07_3	21	10085 885	R	G	112	7	15160 7541	R	A	112	TGCTGTATATGA GATCCGAG	GAATAATTCA TAGATTAGG	TTTATTTTCACT CAGETTTATTTT

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
02													A
2FH21 F_07_3_03	21	10085 999	F	T	110	7	15160 7855	F	C	110	GACCTGAAGTA ATGAACAGT	GTGTGTTTAAT AGTATGCC	GTATGCCCACTA GAATGATTA
2FH21 F_07_3_04	21	10088 054	R	T	115	7	15160 7715	R	A	120	GGCATACTATTA AACACAC	ATCCCACTCTT AGCAGTCTC	TGTAATGTCGTT TGATGTTATTT
2FH21 F_07_3_05	21	10087 226	F	G	106	7	15160 8858	F	C	106	CATAGTGTTAAG ACATTGTG	GCCTTGGTCTC TGCCAAATC	GGTCTCTGCCA AATCACAATTA
2FH21 F_07_3_06	21	10087 247	R	C	106	7	15160 8879	R	A	106	GCCTTGGTCTCT GCCAAATC	CATAGTGTTAA GACATTGTG	CATTGTGTAATG TAAGTATAATGT
2FH21 F_07_3_07	21	10087 343	F	A	96	7	15160 8975	F	T	94	ACTCAGAAAGC TTGCCTCTC	ACTCTGGCTTG GAAATGAGG	GAGGAGGCAGA ATCTCAGA
2FH21 F_07_3_08	21	10087 366	R	T	100	7	15160 8986	R	A	98	ATGAGGAGGCA GAATCTCAG	TAGAGGGCAC TTTTGTGGAC	ACTCAGAAAGC TTGCCTCTCTTA TTTT
2FH21 F_07_3_09	21	10087 427	F	T	111	7	15160 9057	F	C	111	AAGTGGCCCTCT ACCTATTGG	AGGGACCTATT TCTTCAGGG	TATGTATGTTGT TACAAATAGAGA
2FH21 F_07_3_12	21	10089 160	F	C	89	7	15161 0833	F	A	87	TATATAAAAT TCACCTTGC	GGGTATTCTTA GAAATGTG	TGTACCTATTAT TCACTTGTCT
2FH21 F_07_3_21	21	10089 979	F	T	104	7	15161 1658	F	G	104	CGAGTTCTCCA AACAGATG	TCAACAGAAAT CTGGTTCAC	ATCTGGTTCACC TTATTGACTCA
2FH21 F_07_3_23	21	10090 076	F	A	92	7	15161 1755	F	G	91	GCAGGTACTGG AAATCTGCT	TGGTGAACAAA CTGTTTGTG	TGTTTCCACTT TTCTTAAAAA
2FH21 F_07_3_25	21	10090 219	R	T	118	7	15161 1897	R	A	118	AATCAGAGAAG GGCTATCAG	GCTGTGATTAT ATAAATACTC	TATATAAATCT CTTTTGATGCAT AA
2FH21 F_07_3_29	21	10101 118	R	G	88	7	15170 6710	R	A	88	CTTTGGTACCAA TTCTAGAT	AGGAACATGA GACCAGGAAG	GAGACCAGGAA GTAAATACC
2FH21 F_07_3_31	21	10101 393	R	T	113	7	15170 6985	R	C	113	ACAAGCTCTATC TTCTTAC	GGAAGTTTTT TGAAGATGGG	TTGAAGATGGG AGAAAGA
2FH21 F_07_3_32	21	10101 424	F	T	98	7	15170 7016	F	G	97	TTCTACAGACCA GGCTGTTG	TCTCCATCTT CAAAAAAC	CCATCTTCAAAA AACTTCCCCC
2FH21 F_07_3_33	21	10101 607	R	A	107	7	15170 7208	R	T	117	CTGAAACTTTTT TCAATGCC	AAAGTGGTTCA ACTGAAG	GTGGTTCAACT GAAAGATGAA AAG

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_07_3 34	21	10103 626	F	T	101	7	15170 8906	F	C	101	TTCAGCCATGTT CAAAAGGG	GCTTGGGATT CAAGTCATAA	AGGTCTGTCTTA CCTTTC
2FH21 F_07_3 35	21	10103 674	R	A	107	7	15170 8953	R	C	107	CTTTGGAGTCT CTCTGCTA	GAAAGGTAAG ACAGACCTAG	ATATTATGACT TGAATCCCAAG CTA
2FH21 F_07_3 37	21	10103 849	F	A	92	7	15170 9127	F	G	92	AACAGAACAAAA CTTGATG	AGATGTTCAAT GGACATCCC	CCATTTCCTTT GTAAAGGCAACT TGA
2FH21 F_07_3 40	21	10104 391	R	T	120	7	15170 9669	R	A	120	CTGTTCTACAAT AGAGGCTT	GTGAAATCTCA GGATTCAAT	AATCTCAGGATT CATGGTATC
2FH21 F_07_3 43	21	10104 535	F	C	104	7	15170 9817	F	T	104	AAAGAACTGGC AGAAATGTGG	GCTAAAAGCTT TGAGTGATG	TAAAGCTTTTGA GTGATGTTTGAT TA
2FH21 F_07_3 47	21	10104 730	F	C	100	7	15171 0012	F	T	100	CCATATGGACTT TTGAGCAG	CAATGTCCATG TCTCCTCC	TATCCCTACCCA TTAATACTGTA
2FH21 F_07_3 49	21	10104 785	R	A	118	7	15171 0067	R	T	118	CTCAAAAGTCCA TATGGTTTGC	AAGTGGATTGT AGCTAGTTG	GAATGTCAAGC TTTAGGAATT
2FH21 F_07_3 51	21	10104 873	R	T	115	7	15171 0255	R	C	115	TCAAAAGCCATT CAGGCTTC	CATGGCTAGAT CTGGTTCC	ACTGTTATTCTG AGTTGAATGC
2FH21 F_07_3 52	21	10104 989	R	G	115	7	15171 0281	R	A	115	CATGGCTAGAT CTGGTTCC	TCAAAAGCCAT TCAGGCTTC	TCAACTCAGAA AACAGTAAG
2FH21 F_07_3 54	21	10105 057	R	C	117	7	15171 0339	R	T	117	AACAGATCTA GCCATGTTCC	GACAGTAGAAA GGCAATAGG G	GACAGTGGCAT GAGCCAAAC
2FH21 F_07_3 55	21	10105 089	R	A	82	7	15171 0371	R	G	82	GTTGAGAGAAG TAGAAAGGC	GTTGGCTCAT GCCACTGTC	GCCACTGTCTT TATTATAAC
2FH21 F_07_3 56	21	10105 122	F	A	105	7	15171 0404	F	C	105	TGAGGTGACTC TGTGTTGG	CCCCTATTGTC CTTTCTAC	CCTTTCTACTTC TCTGAACTC
2FH21 F_07_3 57	21	10105 140	R	A	105	7	15171 0422	R	C	105	GCCTTCTACTT CTCTGAAC	CTGAGGTGAC TCTGTGTTTG	GTGTTGGGTTT TTGAAAAGAT
2FH21 F_07_3 58	21	10105 198	R	T	95	7	15171 0480	R	C	95	AACCCAAACAC AGAGTCACC	CCTGAAAGCC ACAGGCATTG	TGAAAGCCACA GGCATTGGGTG GGGT
2FH21 F_07_3 59	21	10105 280	F	C	119	7	15171 0562	F	T	119	GAATCTATCAT ATCTCAGC	CCTGTGGCTTT CAGGTCAAT	CAATTTTACTGG TTCTCTTTTGA
2FH21 F_07_3	21	10105 284	R	C	92	7	15171 0566	R	G	92	CTCAATTTTACT GGTCTC	CCCATTGAGCT TACTAATGA	ATCTATCATTAAT CTCAGCTGT

Marker_J D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
60													
2FH21 F_07_3 65	21	10106 079	F	G	113	7	15171 1353	F	A	113	TACAGGAATGTA GGAAGATG	GCAGTCTTACA AAACCTAAGC	TACAAAACCTAA GCAACCTT
2FH21 F_07_3 66	21	10106 087	R	C	108	7	15171 1361	R	T	108	GCAGTCTTACAA AACTTAAGC	TACAGGAATGT AGGAAGATG	AAATGCTTTTCC CACAGATA
2FH21 F_07_3 67	21	10106 124	R	G	116	7	15171 1398	R	A	116	CTGTGGGAAAA GCATTTTITAG	AGTGAGAGTC ACCAACATAG	ACAGGAATGTA GGAAGATG
2FH21 F_07_3 68	21	10106 166	R	C	107	7	15171 1440	R	A	107	CTTCTACATTC CTGTAATC	CCTAGGATTTTC TGGTTCAGC	AAAGTGAGAGT CACCAACATAG
2FH21 F_07_3 69	21	10106 228	F	C	113	7	15171 1502	F	T	113	TATAATCCCTCC TTTCCAG	CATAGGCTGA ACCAGAAATC	TCCTAGGAAAA CTGATGA
2FH21 F_07_3 70	21	10106 248	F	T	113	7	15171 1522	F	C	113	TATAATCCCTCC TTTCCAG	CATAGGCTGA ACCAGAAATC	AGAAAGCTAAG GGGAGGA
2FH21 F_07_3 71	21	10106 287	F	C	96	7	15171 1571	F	T	96	CTAAGTGATGC TCTGTGCC	CCTGGGAAAG GAGGGATTAT	GGAGGGATTAT ATTACACATGTT
2FH21 F_07_3 73	21	10106 738	F	C	85	7	15171 2012	F	A	88	TCGGATCTCCTT CTAGAGTC	TCTAGCCTTGT TAGTTGCC	AGTTGCCCAAT TCTGAAAAAAA
2FH21 F_07_3 74	21	10106 828	R	C	119	7	15171 2103	R	T	117	AAGGAGATCCG AGAGGCAGA	TGGGATTACT CCTGATTCC	ATTACTCTGTAT TCCTCCTTC
2FH21 F_07_3 75	21	10106 864	F	T	94	7	15171 2139	F	A	90	GACTCATGATG CCCTTTTTC	GGAGGAATCA GGAGTAATGC	GTAATGCCAAG AATGAGAA
2FH21 F_07_3 76	21	10107 874	R	T	95	7	15171 2663	R	C	95	GCACTGATCCA CCACTAGC	CTGTATAGGAC AGTATCTGG	AATACCCAAAGA CAAGATCTCTAA
2FH21 F_07_3 77	21	10109 898	R	C	80	7	15171 5027	R	T	80	AAGTAACACTAT TCTGTGG	AGTATCTCTTA AAATATCAC	CTTAATATATCA CTTTAATATGCC
2FH21 F_07_3 80	21	10110 237	R	G	114	7	15171 5373	R	C	116	GATTTCAGTTAT ATATGTAG	TTAATGTAGGT GCAGTTCAG	AATGTAGGTGC AGTTCAGTAATG
2FH21 F_07_3 81	21	10110 269	F	T	92	7	15171 5405	F	C	92	TGGCATACTAG TATATGT	CATTACTGAAC TGCACCTAC	GAATGCAACCT ACATTATATCA
2FH21 F_07_3 85	21	10110 756	F	G	99	7	15171 5879	F	A	99	TCAGTTTACTC CCAGAGG	GTCTTATCTAC AAACCAA	TATCTACAAACC AAAAACATCT

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_07_3 91	21	10111 466	R	C	98	7	15171 6844	R	T	98	TCTAATCAGGA GATTTGG	CCAGGTATTCT TCAGGTTAG	TTCAGGTTAGAA CTCAGTTTCACA A
2FH21 F_07_3 93	21	10112 627	F	T	100	7	15171 7812	F	C	100	GGATTAAATAT GGACCAGC	CTTTTTTAA CTAGCAGGG	GTGAATAGTGG GATTACAGA
2FH21 F_07_3 94	21	10113 252	F	G	98	7	15171 8440	F	A	100	CACTGTTGTATA CTTCGTAGC	GGAAGTAGAA ACTGAAGAAC	GTAGAAACTGA AGAACACTTTGT TAA
2FH21 F_07_3 95	21	10114 677	F	T	110	7	15171 9888	F	C	110	GTATGTATATGA TAAAGCTAG	AAGCTCCTCAA AAGAGCTGG	TCCTCAAAGA GCTGGAGTATA AA
2FH21 F_07_3 97	21	10115 023	F	G	92	7	15172 0234	F	C	92	CACTAAGGCT TTCCAAT	TTATCTGTCT CCCCTACCC	GTCCCTACCC CCCACAAC
2FH21 F_07_3 98	21	10115 084	R	T	85	7	15172 0285	R	C	85	ATTGGAAGGC CTTAGTG	GTAGTAGTAG TGAGTTTGG	GATGATGTGA GTTTGGATCATT TCT
2FH21 F_07_3 99	21	10115 123	F	C	81	7	15172 0334	F	T	81	TCATTTIAGTT GGAGAAC	GATCCAACTC ACATACTAC	AAACTCACATAC TACTACTTCTTT ATT
2FH21 F_07_4 02	21	10115 294	R	T	83	7	15172 0505	R	G	83	TAGTTATTAGTA AACAACTC	TGAGAACAGTT CCATAGCCOC	CCATAGCCCTT CAITTTTA
2FH21 F_07_4 03	21	10115 433	F	A	103	7	15172 0644	F	G	103	GGGAGGGCATT CACACAAAA	GCGCAGTGT TAATGAACITG	CACATCAGAAC CACCAG
2FH21 F_07_4 05	21	10116 089	F	C	101	7	15172 1214	F	G	101	GCAGAGTCCAA TGCATAATT	AAGATAACTAC CTGGCATT	AACTACCTGGC ATTACAGGTTAA AT
2FH21 F_07_4 06	21	10116 140	R	A	119	7	15172 1265	R	G	119	CCTGGCATTCA GGTTAAAT	TGAAATTTACA AGTAGGGGC	AAGTAGGGGCT GGTGAT
2FH21 F_07_4 07	21	10116 273	R	T	120	7	15172 1398	R	C	120	CTGATCTCAGA GTTTAAACC	GTAATAATTT TTGCATGCT	AATAATTTTGC ATGCTAAGANA
2FH21 F_07_4 16	21	10119 088	R	T	95	7	15172 9790	R	C	95	GCATACTGTTC TCAACCTTG	CCTTTCCTTT CCCTTTATG	CITTATGTGCTT ACATCTGTCATT TCT
2FH21 F_07_4 19	21	26029 711	R	C	82	7	62991 014	R	G	82	GAGAGACGCTG CACGTGGA	CGCCCGCACT CCAGAGCC	TCGAGAGCCGG CTGAGAAC
2FH21 F_07_4 20	21	26052 351	R	G	120	7	62991 802	R	A	120	GTTCCAGATGA CTCCAGAGA	ACCACACTCAA CAITTCGGG	AGAAGATTTT TCAGCGGGTTC CTC
2FH21 F_07_4	21	26058 471	R	A	103	7	62991 971	R	G	103	GTGCAATCTGC TACACCTAC	GAATCTCTCG GCGCTCTTG	TCTTTGACTTT GGCTGC

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
21													
2FH21 F_07_4 22	21	26058 506	R	G	87	7	62992 003	R	C	84	CTGTTCTGTTCC CAGGTGAG	GCAGCCAAAG TACAAAGAGC	AGTACAAAGAG CGCCAGGATT TCAG
2FH21 F_07_4 23	21	26083 275	F	T	100	7	62992 312	F	C	100	TGTGTACAAGTT TGTCTGTG	CACATTCTGTG ACCAACGG	CAACTCCGCTG CACTGTATCCA
2FH21 F_07_4 26	21	26083 642	R	A	119	7	62992 679	R	G	122	GTTAAAGGATCT CCACAAT	GCTACACATTA ATACTGACC	ATTCCACAATGA ACCTGCCCTCA CAC
2FH21 F_07_4 27	21	26063 674	F	A	107	7	62992 711	F	G	110	CTGGCTATTTT GGTAGGGC	TGAAGGCAGG TTCATTGTGG	AAGGAGGGTTC ATTGTGGAATAG TTT
2FH21 F_07_4 29	21	26063 792	F	T	90	7	62992 832	F	A	90	TCTCTAGGAAC AGTCTGGC	CATCTAAAGCA GCAGAGAGG	AGGGGAAACAG TTATATTTTCAA A
2FH21 F_07_4 30	21	26063 870	F	C	106	7	62992 910	F	A	106	CCTCTCTGCTG CTTTAGATG	GATTAGATGAA ACAGGCACAC	TAGATGAAACA GGCACACATGC TTTA
2FH21 F_07_4 31	21	26064 006	R	A	86	7	62993 046	R	G	86	AACTCTGGATCT CCTCCTTC	TGCAAGCAAG TGCAAGCAAA GGACAGTAAG GTTG	TGCAAGCAAG GACAGTAAGAA GTTG
2FH21 F_07_4 34	21	26084 248	R	T	113	7	62993 286	R	G	113	AACTGAAAGG TATACCTC	AATAAAGTGGC ACTACAGGG	AAAAAGGAAAGC CATAACAACCA AA
2FH21 F_07_4 37	21	26064 421	F	A	113	7	62993 461	F	T	113	GTCTTAAAGAGA AGACTGCC	AGTACTTTTACC TTTCAAGGC	TGCAATAGTTT TAAAGGAAAT
2FH21 F_07_4 38	21	26084 428	R	T	113	7	62993 468	R	C	113	AGTACTTTTACC TTCAAGGC	GTCTTAAAGAG AAGACTGCC	AGAGAAGACTG CCTATAACA
2FH21 F_07_4 39	21	26064 471	F	G	118	7	62993 511	F	A	122	TGATCAACTGAA TATGTATA	TAGGCAGTCTT CTCTTTAAG	AAGACAATACTT TTCCACTT
2FH21 F_07_4 43	21	26084 690	F	C	115	7	62993 736	F	T	120	AATAGCTATCTG CCAGTCTC	CAAAATGGCT AGAAATGTC	TGCTTTTTTCTT TCTTTTCTCT
2FH21 F_07_4 44	21	26064 683	R	G	104	7	62993 934	R	A	104	TAACAATGCCAT CTTGCGCTG	AAAGCTTCTTA AGAGCTCAG	TGACTTAACTAG GAGAAAAG
2FH21 F_07_4 45	21	26084 992	R	G	107	7	62994 042	R	A	106	GAATGAATCCTA AGAGGCAG	AAGATTACCAG AGAAAGAG	GATTACCAGAG AAAGAGATCAAA GAT
2FH21 F_07_4 47	21	26085 229	F	A	120	7	62994 284	F	G	120	CCTTCTCTGCTG TCTATTG	AATTGGGCAC TGTTGTT	ATGAATTAATAA ACAGAAGCTCT A

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_07_4 52	21	26065 616	R	A	98	7	62904 670	R	C	98	CTCATAATTTGA ACAGAGAC	TGTCATGCATA AATGATGG	AAAAGCATCTG ATCATGTA
2FH21 F_07_4 54	21	26065 675	R	G	80	7	62994 734	R	A	85	CCATCATTATG CATGACA	GAGTTCTTGA ATCAACTGG	AATCAACTGGA GAAATTAGTCA
2FH21 F_07_4 57	21	26066 063	R	G	86	7	62995 130	R	T	86	GAAGATCAACC ACACATAGC	ATATTGTGTT GGCATCAG	TGTTGGCATCA GAAAAACAAT
2FH21 F_07_4 59	21	26066 149	R	T	79	7	62995 221	R	C	84	TATTTTGTATC AGTCTATG	AATCAGGGGA GAAACAA	AATCAGGGGAG AAAACAACATAA CA
2FH21 F_07_4 60	21	26066 207	R	T	109	7	62995 279	R	C	109	GTTAGTTGTTT TCTCCCTG	CAGCAGACCT CACAAAAATA	CTCACAAAAATA TTTGGTGGTACA
2FH21 F_07_4 62	21	26075 597	R	C	87	7	57161 078	R	T	87	CCACTATTTCAG ACATTAG	GTCITTTTAAA TGAGGCCTG	TAAATGAGGEC TGTCATTATGTC ATC
2FH21 F_07_4 63	21	26075 666	F	C	119	7	57181 147	F	T	119	CTCAGTGAATG CGTGAGATT	CAGGCCTCAT TAAAAAGAC	AAACATGTGTA TTTCTACAA
2FH21 F_07_4 64	21	26800 500	F	G	120	7	42279 914	R	T	120	GGCAACATAAT TTGGATGGG	AGGTAGTTCTC TAAGTTAC	GGTAGTTCTCTA AGTTACCAAAAT C
2FH21 F_07_4 65	21	26800 549	R	C	119	7	42279 865	F	C	119	GTTCTCTAAGTT ACCAAAATC	CATGGGCAAA CATAATTTGG	AAACATAATTG GATGGGTCT
2FH21 F_07_4 66	21	26900 702	F	G	104	7	42280 104	F	A	104	GCTTCTACCAA GTTTATTTG	CTCCCATTA ACTCTTCAG	GTAAGAAATAAC TTTGGGGTAAC AA
2FH21 F_07_4 74	21	34400 356	F	G	99	7	13013 932	F	T	99	GAATTGCTAACA TTTCCAT	GCAAAGTACAT TCCTTCTG	GTACATTCCTTT CTGTGGTATTT
2FH21 F_07_4 75	21	35804 307	R	C	114	7	14813 5521	F	T	114	GTTGAAATTTCT GAATTTGC	CTTTGCAGCTG GTGAGAAGG	CTGGTGAGAAG GCAATATAAAAGT TGA
2FH21 F_07_4 76	21	40333 032	F	C	118	7	12138 8053	R	A	118	TTCATCTGCATA ATTATATC	GAAAAACTAAA GTCTAACAG	TAAAGTCTAACA GGGGAAA
2FH21 F_07_4 79	21	45508 375	R	G	82	7	12564 5926	R	A	82	TGTTTATACAG CTCTCAG	TGTTCTAGAAA CAGTGCCCT	AAACAGTGCCCT TTTCAT
2FH21 F_07_4 80	21	45508 426	R	T	93	7	12564 5977	R	C	93	AAAGGCACGT TTCTAGAAC	GTTACTCAAAG CTGTGCAGG	AAGCTGTGCAG GGTAAATG
2FH21 F_07_4	21	45508 473	R	C	91	7	12564 6024	R	T	91	TTACCTGACACA GCTTTGAG	CTCAGCTTTT AAAAATTGACC	CTCAGCTTTTA AAATTGACCCTG

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
82													AAC
2FH21 F_07_4 83	21	45508 504	F	A	107	7	12564 6055	F	G	113	GAGGGACAGAC AGCTCTC	CAGGGTCAATT TTAAAGC	TCAATTTTAAAA GCTTGAGAAG
2FH21 F_08_0 01	21	14371 001	R	A	118	8	47060 648	R	T	128	ACTTCACAGAAA CCGTTCC	TCCTTCTCCTT CTGAGATGC	CCCTCTGAGAT GCATCTTCAAC
2FH21 F_08_0 03	21	17783 776	R	G	107	8	52794 904	R	A	107	CACATCTTCTCG GATTGGAG	AAATATCTGC TTGAATCC	TACTCTGGAAG AATTTTGAA
2FH21 F_08_0 04	21	17783 855	R	A	106	8	52794 983	R	G	106	ATACTCAGTC TTAGATG	GGATTCAGC AGAAATATT	TTTTTCAAAGA TCAGTAAGCGG TGC
2FH21 F_08_0 08	21	23758 768	R	G	89	8	13113 5676	F	T	89	TTAGCTCCATGA CAGACCAG	CCAAAGTAGG TTTTTGTAGC	GGTTTTGTAGC TGTAACCTGTG
2FH21 F_08_0 09	21	23758 804	F	C	99	8	13113 5640	R	A	99	GCTGAAGGAAT AACACTTAC	TACAGCTACAA AAACCTAC	TACAAAACCTA CTTTGGTATT
2FH21 F_08_0 10	21	23758 828	R	T	103	8	13113 5616	F	T	103	GCTACAAAAC CTACTTTGG	CAGTGAATATT TTGCTGAAGG	TTGCTGAAGGA ATAACACTTACA
2FH21 F_08_0 13	21	23759 109	F	A	116	8	13113 5335	R	C	116	CTGCTTTAATGG CAATCAAG	TGCATTAGAA GCTTACCTG	CATTAGAAGCT TACCTGAAATCT
2FH21 F_08_0 14	21	39452 121	R	A	100	8	12121 5010	R	G	100	TCCTCATAACTA CTACAATA	TAGTAAATTC CATCTGTG	CATCTGTGTAAA CTTTATTGAG
2FH21 F_08_0 16	21	40846 776	F	T	96	8	25826 542	F	A	95	GGTTGGGATTI GCATCCTAA	GTAAAACATTA TACAGCTC	GGAACAGCTT TCTAATTTTT
2FH21 F_08_0 17	21	46479 557	F	T	119	8	13033 2631	R	G	119	ATGGTGGACAT TTGAGCAG	TGCATCAAGCA TCTGAGAA	CAAGCATCTGA GAATAACAT
2FH21 F_09_0 04	21	20468 633	F	T	94	9	11443 1888	R	G	99	GTGTATATAATG TTTGCTC	CCATAAGTTTT AGGCTGTACC	TTAGGCTGTAC CAACAAA
2FH21 F_09_0 05	21	20468 658	R	T	99	9	11443 1838	F	G	104	CCATAAGTTTTA GGCTGTACC	CCATTGTGTGT ATAATGTT	CCATTGTGTGTA TAATGTTGGCT CT
2FH21 F_09_0 07	21	20468 716	R	C	103	9	11443 1780	F	A	103	GAGGCAACAT TATACACAC	CATATTGTCT GTGTACTTG	CTGTGTACTTGT GCTCT
2FH21 F_09_0 10	21	20468 878	F	T	80	9	11443 1824	R	G	80	CTGTGTCAATA TGTGACTG	ACAAATATTGA CAGGCAGCA	GACAGGCAGCA GATTAT

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_09_0 13	21	20469 264	R	T	102	9	11443 1015	R	C	103	CCATGGTCAGT AATAGTTTG	TCCCACCAG GTTTCAGGC	GGGTAGAGTT ACATTTTCAG
2FH21 F_09_0 16	21	20469 522	F	C	108	9	11443 1286	F	T	108	AATGTGGTTAT TGTATTTC	GGAAGTTAATT GGGAATAA	ATTGGGAATAAA AAGATTATCAA TT
2FH21 F_09_0 18	21	32523 837	R	A	111	9	15976 292	F	C	118	TGCAGACAGAC ATGGTCC	GATGTGAATAA ACACAAGC	TGTGAATAAACA CAAGCTGATAA
2FH21 F_10_0 03	21	26638 582	F	T	88	10	69347 648	F	G	88	CTTCAAGAAGT TCATACT	ATGTTCAAAAA TGGTCTGA	AATGGTCTGAAA AATAAATGCTTA
2FH21 F_10_0 05	21	26638 685	R	G	118	10	69347 731	R	A	118	TCAGACCATTT TGAACAT	GAACAGCTATA TTTCAAAACC	ACAGCTATATT CAAAACCTTTT A
2FH21 F_10_0 06	21	26638 706	F	T	111	10	69347 772	F	C	111	GGGAATGGCC ATTCATAC	GGGTTTGAAT ATAGCTGTC	AGCTGTTCTTTA TGCATAAAA
2FH21 F_10_0 07	21	26638 769	R	A	92	10	69347 835	R	T	92	GTATTGAATGG CCAATTCCC	ACTGCATTCTT TAGTGTAGC	AAATAAATTCAG ATTGAGACATCT T
2FH21 F_10_0 11	21	26639 000	F	C	100	10	69348 063	F	T	100	TAAACACAGTGT ACAAGTAA	GTAGACTGTTT AATGACTGG	AATGACTGGATA TCTTCCT
2FH21 F_10_0 16	21	36780 234	R	A	106	10	95708 632	R	G	106	AGGCCAGGGAG CCCACAG	CTGAGTTCCCT CAGAGTGTC	CCAACAATGAA GCCATT
2FH21 F_10_0 18	21	36780 339	F	G	116	10	95708 737	F	C	116	AGACATTGATG CCAGCTCAG	ACACTCTGAAG GAACCTCAGG	TAATCATCTCC TCTTTGGCTGG CT
2FH21 F_10_0 19	21	36780 343	R	A	116	10	95708 741	R	T	116	ACACTCTGAAG GAACCTCAGG	AGACATTGATG CCAGCTCAG	GATGCCAGCTC AGCCATGGACA C
2FH21 F_10_0 20	21	46486 292	F	A	100	10	28159 033	R	C	100	GGCAGAGATG GTGGAACTT	GTATCATGGA GTTGGAGAAG	ACTTCAAGGATC TCTATGGGGA
2FH21 F_11_0 01	21	23395 848	F	G	113	11	12415 0014	R	A	113	GGGCTGAGCAT CCCATCCT	TGAAGAACAAT GGTGTG	AAAAGAAAGAG CAGTTACACA
2FH21 F_11_0 02	21	23395 850	R	A	113	11	12415 0012	F	A	113	TGAAGAACAAT GGTGTG	GGGCTGAGCA TCCCATCCT	ACACCTGTTCCA ACTGTTTC
2FH21 F_11_0 03	21	23395 873	F	C	95	11	12414 9989	R	C	95	GGGCTGAGCAT CCCATCCT	GAAAAGAAAG AGCAGTTACAC	GAACAGTTGGA ACAGGTGTTG
2FH21 F_11_0	21	23395 905	F	A	116	11	12414 9957	R	G	116	GACTCCAGCTC CTGGTACAA	ACAGTTGGAA CAGGTGTTG	GATGCTCAGCC CTGCCAG

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
05													
2FH21 F_11_0 06	21	23396 494	F	T	120	11	12414 3062	R	G	119	GGCAGTTTATT AGAAAGA	ATCGGTACAGT TGAATGGG	AATGGGAACCTT TTCAGAG
2FH21 F_11_0 07	21	23396 572	F	G	108	11	12414 2985	R	T	108	GGAATGGTTA TAACACCCG	GGAATGGTTA TAACACCCG	ATAACACCCGTT GGAAG
2FH21 F_11_0 08	21	23396 581	R	A	108	11	12414 2976	F	C	108	GGAATGGTTAT AACACCCG	GGAATGGTTAT AACACCCG	TGATCTCAGCAT AATGGTAA
2FH21 F_11_0 10	21	23396 594	F	T	119	11	12414 2661	R	G	119	GAAAGGGTTTC CAGGTCAA	GGCTATGAAG AATGTATTG	GAAGAATGTATT GAGAGGC
2FH21 F_11_0 12	21	23397 275	R	G	116	11	12414 2280	F	A	116	GGCTCTTTAGTT GAGTGC	AGGAGCTAAG AGCCCAATC	GCCCAATCCCT ATGAAGGATGA C
2FH21 F_11_0 13	21	23397 327	F	T	105	11	12414 2228	R	G	105	GTTCCATGAAG AGTCTGA	GCTCTTAGCTC CTTCTCTC	CTTCTTCTCTA CTCATT
2FH21 F_11_0 14	21	23397 405	R	T	110	11	12414 2150	F	G	110	TCAGACTCTTCA TGGAAAC	TGAGGTCTGTT TTTTCTGGC	AGTCTACTATG ATTCTTAGAAG TC
2FH21 F_11_0 15	21	23397 432	F	T	120	11	12414 2123	R	C	120	CATTTTCAGGTG AGGTCTGT	TCAGACTCTTC ATGGAAC	GACTTCTAAGG AATCATAGTAGA CTT
2FH21 F_11_0 19	21	25986 415	F	A	115	11	10981 1803	F	G	117	TCAACCAACAAC ATCTAGCA	GAAGATAAAAT AACAGTCCAC	TAACAGTCCACT TTATAAACC
2FH21 F_11_0 20	21	25986 457	R	T	108	11	10981 1847	R	C	110	ACAGTCCACTTT ATAAACC	ATTATTTCAA CCACAACAT	AACACAACATC TAGCA
2FH21 F_11_0 22	21	29170 479	F	A	98	11	92982 462	F	T	89	ACTGAAGTCATT CATTAGG	GGAATGTTCCA CCTTTCTAC	TGTTCCACCTTT CTACCTTTTTT
2FH21 F_11_0 23	21	29170 506	R	G	100	11	92982 490	R	T	101	GAATGTTCCAC CTTTCTACC	GAACTGAAGT CATTCATT	CTGAAGTCAATC ATTAGGTAA
2FH21 F_11_0 24	21	29170 534	R	A	121	11	92982 518	R	G	121	ACCTAATGAATG ACTTCAG	CAGTCTCAA GTTCAACCAAG	GAACTGAATG CATTTAGCATAT
2FH21 F_11_0 26	21	29170 588	R	G	121	11	92982 572	R	A	119	ATGCATTTCAGTT TCCAGTAG	TGCACCTTCCA GACAAAGCAG	TCAGTCTTCAA GTTCAACCAAGT
2FH21 F_11_0 27	21	29170 613	R	G	96	11	92982 595	R	A	94	ACTTGGTGAAC TGAGGAC	AAAGGTCTGC AAGGAACCCAC	TCCAGACAAGC AGGCAAGAA CT

Marker_ D	CH R_ 1	Marker _POS _1	SE NS E1	Mar ker_ 1	AMP _LEN _1	CH R_ 2	Marker _POS _2	SE NS E2	Mar ker_ 2	AMP _LEN _2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_11_0 _28	21	37392 976	R	C	107	11	66718 478	F	A	107	GTATATATACT OCTGATC	CTGTGTCAATG GCACATCTG	ATGGCACATCT GAATTACT
2FH21 F_11_0 _29	21	37393 011	F	C	81	11	66718 443	R	A	81	ACTCAGATAAAA GTCTTC	GTAAATCAGAT GTGCATG	TGCCATTGACA CAGGAGGACC
2FH21 F_11_0 _30	21	39479 721	F	C	83	11	77021 841	F	G	83	AATAGGATTAA TTTGTTGTT	ATTCAATTAAT CTGGCAATT	CATTAACTCTGG CAATTTTAATT
2FH21 F_11_0 _33	21	40282 355	R	A	115	11	86626 24	R	G	115	AGATTTCACATA GAGTGCTG	TCTTATTTCTT GGAACCA	TTCTCTGGAACC AGGATAAA
2FH21 F_12_0 _03	21	14384 374	F	T	88	12	36842 348	R	G	88	GGCTGGCCACT AGAGCTG	TGAGGTGTGT CTGGCTGTC	TGTCCATCAGC CTCTCTCTCC
2FH21 F_12_0 _11	21	14385 323	R	T	81	12	36841 410	F	G	81	CTCCTCGTGGG GGTCCACC	AAGCGGAAG AGGTGGGATG	GGATGCTGCTG CCTGGCGGT
2FH21 F_12_0 _12	21	14388 770	R	C	101	12	36831 590	F	A	101	CTGCTTATGCAC ATCAACGG	AAAGGTGAGC CAATGGGGTA	GGTGAGCCAAAT GGGTACAAAA
2FH21 F_12_0 _13	21	14388 851	R	C	120	12	36831 509	F	T	120	AATCTTCAGGCA CAACGAGG	ACCCCAATGG CTCACCTTTC	CACACTCCTTCC CCGCC
2FH21 F_12_0 _15	21	14388 945	F	G	83	12	36831 415	R	T	83	CCAGGCAACGG CCCTGAT	TCTGCCCTTACG ACCAAAAGC	CTGTGGCAAAT TTGAGT
2FH21 F_12_0 _16	21	14369 155	R	A	112	12	36831 204	F	G	112	CGCACTTGGCA GAGTGGAG	AGCGGATGA GTGAGGCAG	GCAGGCCCTC CCACTC
2FH21 F_12_0 _32	21	14386 950	R	G	109	12	36794 298	F	G	109	GAATCAGAGAA TGTGATCACT	TGAGCTATTGT CCCTCCAG	CTATTGTCCCTC CAGCCTTTTGGC
2FH21 F_12_0 _36	21	14400 021	R	T	117	12	36791 807	F	G	115	GAATAAGACTA GATGCAGGG	GTTAAATTAC TGGTGCCC	TTTACTGGTGCC CACAGAAAAA
2FH21 F_12_0 _39	21	18384 641	R	T	93	12	19154 702	R	G	93	CCAGCAGTCTC TAGGATTAC	ATCTCATCTCC AATTTTAC	TCTCCAATTTTA CTTTTTTTTTC
2FH21 F_12_0 _48	21	31116 128	F	C	81	12	10731 1641	F	A	81	TGACCTGCTGC CTCTGCTTG	CAGCTTTGATT CTTAAACCCC	TTAAACCCCTTT ACCCCAA
2FH21 F_12_0 _49	21	35466 901	R	T	109	12	98716 977	F	G	109	AAGAGGGAAGA TGACTTTTC	CTTCTGTGAA CCTGCTTTTC	GCATCTTACTT TTCTTTATCCA
2FH21 F_12_0	21	38466 974	F	C	109	12	98716 904	R	A	109	GCAGGTTTACA GGAAGTTTC	CTTCAAGGCAA TCITTTCTCC	TCCACTATTAA AAACAAAAAAA

Marker_I O	CH R_1	Marker POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
50													
2FH21 F_12_0 51	21	35467 003	F	A	109	12	98716 875	R	C	109	CTTCAAGGCAAT CTTCTCC	GCAGGTTAC AGGAAGTTTC	TGTTTGTGTTT TAAATAGTGAA AG
2FH21 F_12_0 52	21	35467 007	R	A	109	12	98716 871	F	C	109	GCAGGTTTACA GGAAGTTTC	CTTCAAGGCAA TCTTCTCC	AGSCAATCTTTC TCCATAACATA
2FH21 F_12_0 53	21	35467 047	F	A	107	12	98716 831	R	G	107	GAAAGATTGOC TTGAAGATG	CTCCACTTGTG CCTTTATTC	TCTTGAATTT GATCATCTCT
2FH21 F_12_0 54	21	35467 071	R	A	101	12	98716 807	F	G	101	TGGCTTGAAGA TGCAAGAG	CTCCACTTGTG CCTTTATTC	TGCTCTTTATTC TATCACCTTCTG CT
2FH21 F_12_0 57	21	35467 870	F	A	81	12	98716 023	R	A	89	TCAGAGCTTAG CTGCACCTGG	GCAGGCTCA GGATAATTATG	GGATAATTATGG TTGGAGTGC
2FH21 F_12_0 58	21	35467 877	R	G	102	12	98716 008	F	T	110	CAGGCTTCAGG ATAATTATGG	ATGGAAGAG GATSCAAG	AGCTTAGCTGC ACTGGTT
2FH21 F_12_0 60	21	36344 402	R	C	103	12	87577 41	R	T	103	GCACAAGCTGA TCAAGAT	GAGGATAGTC TTCCCTGATG	ACCACAACCTG GCAGCCAC
2FH21 F_12_0 64	21	36344 480	R	A	98	12	87578 19	R	G	98	CATCAGGGAAG ACTATCTCTC	CTAAAGTCCAG TTCTCTCTC	CTCCTCACAACA TTTGGCCCTT
2FH21 F_12_0 66	21	36344 707	R	T	116	12	87938 68	R	C	116	CGCCATCTAGA GAAGATGGG	GCCAGCCCAAC TCTTGAAATG	AGTTCAGGATG GCTTGA
2FH21 F_12_0 68	21	36344 861	F	T	112	12	87976 30	F	C	112	CTGATCTAAGC CATCTTAT	GACAATGACA CGTACATCCC	TCTTTAACATAC TTCTGGAACA
2FH21 F_12_0 71	21	36345 046	R	A	100	12	87979 15	R	G	100	GGGATGTACGT GTCAATTGTC	GCTTTGCATTC TCCCATCTG	TGCATTCTCCCA TCTGTTGAACAA
2FH21 F_12_0 72	21	36345 177	F	G	102	12	88172 73	F	A	102	TTTGCATTGGCC TCACAGAC	ATATCCTGGG GATGGATGTG	ATATCCTGGGG ATGGATGTGTG TGGC
2FH21 F_12_0 73	21	36345 212	R	T	108	12	88173 08	R	C	108	ATATCCTGGGG ATGGATGTG	CCTACATTGGC ATTGGCCTC	ATTGCAATTGGC CTCACAGAC
2FH21 F_12_0 74	21	36345 252	R	C	87	12	88173 48	R	G	87	CTGTAGGGCCA ATGCAATG	ACCAGCTACAT CTAGATTAC	ACATCTAGATTA CAAGCCCTTAT
2FH21 F_12_0 75	21	36345 286	F	G	120	12	88173 82	F	T	120	CAGAGGGTAGA AGGGAGGC	GAGGCCAATG CAAATGTAGG	CTAGATGTAGCT GGTATCA

Marker_I D	CH R_1	Marker POS 1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP LEN 1	CH R_2	Marker POS 2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP LEN 2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_12_0 76	21	36345 299	R	T	105	12	88173 95	R	C	105	TGTAATCTAGAT GTAGCTGG	GAGAGCAGGG ACATACGC	CCAGAGGGTAG AAGGGAGGC
2FH21 F_12_0 77	21	36345 331	R	A	98	12	88174 27	R	G	98	GCTCCCTCTTA CCCTCTG	ACTAGTCTCAC TGGCAGTGG	GAGAGCAGGGA CATACGC
2FH21 F_12_0 78	21	36345 350	F	T	98	12	88174 46	F	C	98	ACTAGTCTCACT GGCAGTGG	GCCTCCCTCTCT ACCTCTG	CGTATGTCCCT GCTCTC
2FH21 F_12_0 79	21	36345 382	F	T	108	12	88174 76	F	C	108	AACAGAGCTGG AACTTGCAC	GTCACCTGCC AGTGAGACTA	CAGTGAGACTA GTGAGC
2FH21 F_12_0 80	21	36345 422	R	A	107	12	88175 18	R	G	107	CTGTCAACAGA GCTGGAAC	TGCCAGTGAG ACTAGTGAGC	ACTGCTGTGGA CAACAT
2FH21 F_12_0 81	21	36345 599	F	T	115	12	88178 95	F	C	111	TGAACAGCAIT GCAAGTTGG	GGACTGACTC CACTGTAAT	CAAAACCCITGT AAACTTTCTTT CTT
2FH21 F_12_0 82	21	36345 703	F	C	119	12	88177 95	F	T	123	TCTATACCCCA CCTATTCT	ATTAGTTGGAG AGAGTGGGA	GGAGAGAGTGG GGATAGA
2FH21 F_12_0 83	21	36345 712	R	C	115	12	88178 04	R	T	119	TGGGAGAGAGT GGGAGATAG	TTTCTATACCC CACCTATTTC	TGAAAGTAACAT CTTACTAGC
2FH21 F_12_0 84	21	36345 749	F	G	115	12	88178 41	F	A	119	TTTCTATACCCC ACCTATTTC	TGGGAGAGAG TGGGAGATAG	TACTTTTCATTTA CAAACTCCTACA
2FH21 F_12_0 86	21	36345 780	R	C	108	12	88178 88	R	T	108	GGGTATAGAAA AATGTCAGG	AAGTATTGTTT CCTCATGG	TAGCAATTTAAA AGGGTAAC
2FH21 F_12_0 88	21	36345 832	R	A	111	12	88179 30	R	G	113	GTACCCCTTTTA AATTGCT	CAAAAACAAAA GCAAGGGAC	AAAAAGTATTT GTTCTCTCATGG
2FH21 F_12_0 94	21	36589 553	R	A	84	12	11938 6208	R	G	84	AGGCATATTC CATGCTCTC	ATGTGCAGAA GGATGGAGTG	GAAGGATGGAG TGGGGATGGT
2FH21 F_12_0 95	21	36589 583	F	C	97	12	11938 6238	F	A	97	TGGCAGGAOCT GAAGGATCA	ATCCCACTCC ATCCTCTG	CCATCCCTTCTGC ACATC
2FH21 F_12_0 98	21	36589 734	R	C	114	12	11939 1656	R	T	114	GGGTCTCTCGAA GGCAGC	AGGACCTGTT CTACAAGTA	GCAGATCGAG CTCAAGA
2FH21 F_12_1 03	21	40338 511	F	T	81	12	43803 073	R	C	81	TTTAATGTCAGT TCCAAAC	CTGTGCTAGA GAATGACTTG	ATGACTTGAGA GAGTACTT
2FH21 F_12_1	21	40770 445	R	A	99	12	56310 838	F	C	99	AGGACTCTAG GAATTTAG	CCCATGGTTAG TCAGCAAG	CCCAAAACTC CCCAAGTAA

Marker_ID	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	POR1	PCR2	Extension
04													
2FH21 F_12_1 05	21	40770 469	F	G	99	12	56310 814	R	A	99	CCAATGGTTAGT CAGCAAG	AGGGACTCTA GGAATTTTCAG	CTGGGAGTTT TGGGGGAAA
2FH21 F_12_1 06	21	40770 473	R	T	103	12	56310 810	F	G	103	AGGGACTCTAG GAATTTTCAG	CTAACCAATGG TTAGTCAGC	ATGGTTAGTCA GCAAGAATA
2FH21 F_12_1 07	21	40770 509	F	G	120	12	56310 774	R	A	120	CACGTGATAACA TAGCCTAC	CTGACTAACCA TTGGTTAGG	AACCATTTGGTA GGTGGTGG
2FH21 F_12_1 12	21	43408 873	F	T	103	12	64725 42	F	C	104	CTATTTTGGTGT GCTGTTG	AGTCCACAG GCGCCTAC	ACAGGCGCTA CCTGCCC
2FH21 F_12_1 13	21	43408 884	R	C	103	12	64725 53	R	T	104	AGTCCACAGG CGCCTACCT	CTATTTTGGTGT TGCTGTTG	AGACTAGAGAA ATGGCAGGGA
2FH21 F_12_1 14	21	43408 908	F	G	103	12	64725 75	F	C	104	CTATTTTGGTGT GCTGTTG	AGTCCACAG GCGCCTACCT	CTGCCATTTCTC TAGTCT
2FH21 F_13_0 05	21	99818 70	F	A	85	13	18965 588	F	T	89	GAGGCACCTGC GAAAGAAAG	ATGCACACTTA TGCTGACGG	ATGCTGACGGG TGACTTTA
2FH21 F_13_0 19	21	14093 183	F	G	105	13	18171 241	F	T	105	GGTCTAAATGTC AGTGAGC	CTCTAACATAA ACCCCTGCTG	AAACCCCTGCTG CTTCCA
2FH21 F_13_0 20	21	14093 198	R	T	104	13	18171 256	R	C	104	ACATAAACCCCTG CTGCTTCC	CAGTTACCTTC TAGTAGGTC	AGTGAGCATAA CAAGGGG
2FH21 F_13_0 22	21	14093 293	R	A	116	13	18171 351	R	G	116	GACCTACTAGA AGGTAAGT	GTAATTGATGT TGGGTATGC	ATGTTGGGTAT GCAATGTACCTT
2FH21 F_13_0 23	21	14093 337	R	C	112	13	18171 395	R	T	112	GGAACATACG ATGCTTTGC	CCCAATAAGA GTCCCTGAAG	AACATCAATTAC ATTTATCTCC
2FH21 F_13_0 26	21	14096 743	F	T	96	13	18174 798	F	C	96	ACAGGAAGAGC AAAGCCCTG	ATCCTATGTAT CTTATTC	TCTTATTTCCAAT GAATACTCT
2FH21 F_13_0 28	21	14099 425	R	T	119	13	18177 481	R	G	119	CCATTCATGGA ATAGACAAG	GCITTTCTATA TTCCCCAGC	TATTCGCCAGCA TTTTGTA
2FH21 F_13_0 31	21	14102 405	F	C	109	13	18180 495	F	T	109	AGGGTTAATGA CCAGGGCTC	TAGTCCCTCCT AGCTCAACC	TAGCTCAACCTC TAATTTGTTCTC
2FH21 F_13_0 32	21	14102 433	F	A	116	13	18180 523	F	G	116	GACAACCTTCTGA GAATCAGG	TGGAGCACTG CAGAGAAGTC	GGAGCACTGCA GAGAAGTCAA ACAC

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_13_0 33	21	14102 490	F	G	104	13	18180 580	F	A	104	ATTCTGAATGAC GAGCCCTG	CTGCAAAGGC ACAGAGACT	AGGCACAGAGA CTGCAGAAATC
2FH21 F_13_0 35	21	14103 122	R	C	80	13	18181 212	R	G	80	TGTTCCCTTCC TTATCCTT	CCAGTATTTTG AAACAGAGG	AGTATTTTGA CAGAGGTTAAT
2FH21 F_13_0 36	21	14103 149	F	A	116	13	18181 239	F	G	116	GAGTCTAGTTT GGCAAACTT	CITATCCCTTG GGTCTCTC	CCCTCTGTTTCA AATACTGG
2FH21 F_13_0 39	21	14105 660	R	T	120	13	18184 718	R	C	120	AGCCTCAGGCC TTTCTATAC	GCCATATCCAA ACCACATTG	ATCCAAACCACA TTGTAGATTCTC AAA
2FH21 F_13_0 40	21	14108 261	F	T	89	13	18187 316	F	G	89	GTCJTGTGTTA TCTCTGGC	GATCTTCCAG GCTGAAAGTG	GGAGGAGAACA CATGTTGT
2FH21 F_13_0 41	21	14109 738	R	C	108	13	18187 793	R	A	108	TGTGTGTAGG ATTATGAGC	ATGCTGATGAA CCGCACITC	TCTCAGGTCTCA GCACCTCA
2FH21 F_13_0 42	21	14109 824	R	G	99	13	18187 879	R	A	99	GGATCATTGGC CAACCATAC	ATTGTGAGGT GGAAGGTGG	GGGCCTTAATG GATAACC
2FH21 F_13_0 43	21	14109 914	R	A	101	13	18187 989	R	G	101	CTGAATGTGGA TTTGGCCAG	TGATCAGAGG GATGAGCTTG	TTGGGATGCAT GACAGGATG
2FH21 F_13_0 46	21	14111 144	R	A	103	13	18189 204	R	T	104	TTACCAAGAGAT TGGTGGAG	GTACATCAAA ATTGGGAG	AAAATTTGGAGA AGAAAGTAAAA
2FH21 F_13_0 47	21	14111 203	R	G	88	13	18189 263	R	A	88	ACTCCACCAATC TCTTGGA	AGCACTCTAAA AGGATGCAC	AAGGATGCACA CAGCTTA
2FH21 F_13_0 48	21	14111 249	R	G	95	13	18189 309	R	A	95	AGCTGTGTGCA TCCITTTAG	TGCATGACCAA GATCAGCAG	CAGCAGCAACT TCAATG
2FH21 F_13_0 49	21	14111 290	F	T	92	13	18189 350	F	C	92	GAAGTTGCTGC TGATCTGG	GAACCCCAAC AGCATCCAAG	CATCCAAGTCT GCTGATAAGCA C
2FH21 F_13_0 51	21	14111 371	F	A	89	13	18189 431	F	G	99	CTTCTAGGACTT GTCTATTG	GCAATTTTCC AAGACAGGC	TTCCAAGACAG GCTTCTGTTC CCA
2FH21 F_13_0 52	21	14111 381	R	G	90	13	18189 441	R	T	90	CCAAGACAGGC TTTCTGTG	CTTCTAGGACT TGCTATTG	TGCTCTATTGAG AAACAGCAGCT AC
2FH21 F_13_0 54	21	14116 424	F	C	85	13	18194 428	F	T	85	ACCATATAGCA GTTGGTAA	TAACTGTAAT TCTGAATAC	GTAATTTCTGAA TACTTAGTATGG
2FH21 F_13_0	21	14118 994	F	C	120	13	18196 941	F	T	120	GAGATATACTTA TGACATGGC	CITGATTGCCC ATGTAATCT	TTGATTGCCCAT GTAAATCTTGAT

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
57													TG
2FH21 F_13_0 59	21	14119 045	F	T	120	13	18198 892	F	C	120	GATATGACAAAC TGTGTGAC	GCCATGTAAA TCTTGATG	GCCATGTCAATA GTATATCTC
2FH21 F_13_0 80	21	14119 121	R	T	114	13	18197 086	R	C	114	GTACACAGATTT GTCATATC	GTGAAAAACT GGAGTAAAC	CTGGAGTAAAC CCTGGA
2FH21 F_13_0 62	21	14120 815	F	C	100	13	18198 762	F	T	100	AATACACAAAAG ATATGTAG	ACCGGGGACT GTCITTTTC	AGTTGCAAGAT TTTGTTTTT
2FH21 F_13_0 65	21	14120 978	R	C	92	13	18198 925	R	G	92	TCTTGGGGAC GTCCAGAAC	TCCAGCTGG GAGCTCTAC	AGCTCTACCTC CTTCTG
2FH21 F_13_0 66	21	14121 175	F	G	87	13	18199 129	F	T	87	GGGTTCATGCT GTAGCTGA	AGAACTGGTA CCAGCTAGAA	CTCTCCAACTC CTCAAG
2FH21 F_13_0 68	21	14121 570	R	G	100	13	18199 524	R	A	100	CAGATGGGTAC AAGCAAGTG	AGCTTGGTGT GTAGATGTG	CGTGTCTGAGA TGTGCCACCGG GTCC
2FH21 F_13_0 71	21	14141 638	F	T	114	13	18214 549	F	C	114	CCAAGGCCACG TTCAAGACT	GCTGCATTCTA CCTCCCAAA	TCTACCTCCCAA ATTAAGATAC
2FH21 F_13_0 77	21	14843 157	F	G	120	13	71046 877	F	A	120	GCTGTCAATGGT TTCTTGTA	CTTCAGCAATC AAACAAAGC	AATGAAAGAAT CAATTAAGATGG AT
2FH21 F_13_0 79	21	17407 356	F	C	113	13	50189 919	R	A	113	CTGAAAGACTTC CATTTCTG	AGCAGAAATGA TGCAACTAC	AAACAGAAAG GGAGACA
2FH21 F_13_0 82	21	19162 925	F	G	87	13	49661 632	R	T	87	GCTTGAATGATA GTTTAAAG	GAGACAACCC AAGTTAGATG	ACAACCCCAAGTT AGATGGAGCTA
2FH21 F_13_0 83	21	19162 941	R	T	121	13	49661 616	F	C	121	CAACCCAAAGTTA GATGGAGC	CTAGCTACTTT AAAGGAAC	TGCTTGAATGAT AGTTTAAAGAAT T
2FH21 F_13_0 84	21	19162 971	F	C	121	13	49661 586	R	T	121	CTAGCTACTTTA AAAGGAAC	CAACCCCAAGTT AGATGGAGC	CTTTAAACTATC ATTCAGCAAAA C
2FH21 F_13_0 88	21	19163 145	R	A	116	13	49661 415	F	G	116	CTTTTCATAGAA CAGAGGA	TCCTCTGCTTC ATCTAATCTC	CTGCTTCATCTA ACTCGTAGGG
2FH21 F_13_0 99	21	35999 919	R	A	90	13	88808 282	F	G	90	GATGAGAGAAC CAAAAGC	ATGTTCAATCC TTCAACTG	AATTTCCITCT GACTGTATT
2FH21 F_13_1 01	21	36000 063	R	C	107	13	88808 136	F	T	107	TTAGGGGATTC TCCTTC	CTGATGATGG GAAAGAACA	AAGACAAAAA GACAACATCC

Marker_J D	CH R_1	Marker POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_13_1 05	21	36000 702	F	C	94	13	8807 508	R	A	91	GCTATGAGATT CAAAACC	TTGATCCCTTT GCCAAGTTC	TTGCCAAGTTCT TTCAATTAAATGT TA
2FH21 F_13_1 07	21	36001 079	R	G	100	13	8807 132	F	T	100	TGACCCATTCC CAAAATGAA	AATGOTGGGA CACAGAAGAG	GGACATGCTT CTGGTTAGTGG A
2FH21 F_13_1 08	21	36001 146	F	G	121	13	8807 065	R	A	121	ACTGGGAGAAA TTGGTAGTG	CTTCTGTGTCC CACCATTAG	ATTAGAAAATCA AAAGCTGACT
2FH21 F_13_1 10	21	36001 377	F	T	118	13	8808 834	R	G	118	CAGTACTTGAC CAATTGAGC	GAGTCACATTC CAATTGAGC	CCACCTTGCATT ATTCTAA
2FH21 F_13_1 11	21	36001 406	R	T	119	13	8808 805	F	G	119	GAGTCACATTC CAATTGAGC	GTTGAGTACTT GACCATTC	TCAGTACTTGAC CATTGAAGCTTT TG
2FH21 F_13_1 12	21	36007 435	F	A	98	13	8808 776	R	G	98	AGAACTTGTAT AGCAGG	CAAAAGCTTCA ATGGTCAAG	AAGCTTCAATG GTCAAGTACTG AAC
2FH21 F_14_0 08	21	13879 750	R	C	104	14	19381 806	F	C	104	GAAAAAGACCA TGACTACC	ATATAAAGGA ACTTGTGC	AAGGAACCTTGT GCCATTTT
2FH21 F_14_0 08	21	13879 926	F	T	101	14	19381 830	R	G	99	AATTATATAGA CTTAAAGAC	CTCCTTTTCAT CACCAGAA	TTTTCATCACCA GAAAGAATG
2FH21 F_14_0 10	21	13880 089	F	A	87	14	19381 469	R	A	91	GCTAGGTGCAT AACTGGTAG	GCAACACACA ACTGCTCTG	AACTGCTTCTGA AGACCT
2FH21 F_14_0 11	21	13880 128	R	G	102	14	19381 426	F	T	102	TGGTGATTTCAG TAGGCTTG	TCTAGCTTTTA ACGTACCAG	TAACTACCACT TATGCACCTAG C
2FH21 F_14_0 12	21	13880 152	F	A	92	14	19381 402	R	C	92	CTATGGTGATT CAGTAGGC	CTACCAGTTAT GCACCTAGC	AAAAACACCAATT TCTCCGAG
2FH21 F_14_0 13	21	13880 155	R	C	108	14	19381 399	F	C	108	CTACCAGTTATG CACCTAGC	GCTTACTAAAG AACTATGGTG	GTGATTTTCAGTA GGCTTGT
2FH21 F_14_0 15	21	14921 613	R	T	113	14	41185 950	F	G	113	GTCTCCAAAT TTTTCAAC	GGCAAGCATG GAGAGTATTC	TTTGTITTCAG GAGTCT
2FH21 F_14_0 16	21	14921 832	F	G	99	14	41185 732	R	T	99	GTGCATGACAA TGCTCACTG	AAATTGTCTGG AGGCCCAT	GAGGCCATGG CCAAATATCAACA G
2FH21 F_14_0 17	21	14921 834	R	T	99	14	41185 730	F	G	99	AAATTGTCTGGA GGGCCAT	GTGCATGACA ATGCTCACTG	GGATCTCTTTCC TCACAAA
2FH21 F_14_0	21	14921 856	F	C	102	14	41185 708	R	A	102	GCATTCATGCT GTGCATGAC	CCCATGGCCA ATATCAACAG	TGAGGAAAGAG ATCCCG

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
18													
2FH21 F_14_0_26	21	14922 069	R	G	119	14	41185 495	F	T	119	AGACAAGGGAG AAGTCTCAG	GCTAAAGGAA GCATTTTGGG	GGAAGCATT GGGAGTTAACT AC
2FH21 F_14_0_27	21	14922 093	F	T	119	14	41185 471	R	C	119	AGACAAGGGAG AAGTCTCAG	GCTAAAGGAA GCATTTTGGG	AGGATAAGTGA TTCTAGGAATG
2FH21 F_14_0_28	21	14922 116	R	T	114	14	41185 448	F	G	114	GCAATTTGGGA GTTAACTAC	TCCCCAGACA AGGAGAAGT	GACAAGGGGAGA AGTCTCAGG
2FH21 F_14_0_33	21	17946 653	R	C	99	14	10309 2721	R	A	99	TATTTCAAGAAT AACTAAGG	ATTGGAACAGT ATGTCTTC	GGAACAGTATG TCTTCAATAAT
2FH21 F_14_0_35	21	17947 827	R	T	111	14	10309 3055	R	A	109	CTTCTCAAACTA AATTATATC	AATAAATGTAA TGAATATGTC	AATGTAATGAAT ATGTCTACAAAG
2FH21 F_14_0_37	21	25973 901	F	T	111	14	48818 843	F	G	111	ATTGGTGCTTA GAATGAAGG	TGGTGCTCTA CTTCTCTAG	CTCTAGCTTCC ACCTTCT
2FH21 F_14_0_39	21	26867 125	F	C	99	14	51943 094	R	A	99	GGTCAACATA AAGTCAAA	GACTCATGGC CCAAATTTTG	CAAGTTTGGAC AGAAATATG
2FH21 F_14_0_40	21	28867 172	F	T	119	14	51943 047	R	G	119	CCACATTCATAT TGAGTGA	CAAGTTTGGGA CAGAAATATG	ATTTGACTTTA TGTTGCACC
2FH21 F_15_0_02	21	98859 55	F	T	106	15	18428 903	R	C	108	CCAGAGGTATTT TCAGAGGG	CTGGACTTTTA GAGGCATGG	TTAGAGGCATG GATAGGAATA
2FH21 F_15_0_04	21	98860 39	R	G	117	15	18428 819	F	T	117	GCCTCTAAAAGT CCAGCAAG	GGCCTCATAC ATGACATCTC	ACATGACATCTC TCATGG
2FH21 F_15_0_05	21	98860 81	F	T	113	15	18428 777	R	G	113	TGCATTGTGCTGC AAAAAGGG	TGTATGAGGC CCTGTAGATG	GAGGCCCTGTA GATGGATTAC
2FH21 F_15_0_09	21	98863 76	R	A	108	15	18428 482	F	C	108	TCTGCTTGCTTG CCAGTGTG	TTAGTGGGAG GAGGTTTGTG	TCCAGAGTGCA CCCCAA
2FH21 F_15_0_10	21	98864 43	F	A	99	15	18428 415	R	A	99	TATCCTGCAG GGCATAATC	AGATGCACAC AAACCTCTC	CCACTAAATTAT CCACTACTAA
2FH21 F_15_0_11	21	98864 68	R	G	105	15	18428 390	F	T	105	AGATGCACACA AACCTCTC	TTATCCCTGC AGCGGCATA	CCCTGCAGCGG CATATCCATT
2FH21 F_15_0_15	21	98867 38	R	G	118	15	18428 120	F	T	118	ATGGAACATC CTTCTGCGG	GATTGTATGA AGAAATGCC	TTTACTCATAT TTATTCCTCTC C

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_15.0 16	21	98867 65	F	T	118	15	18428 093	R	T	118	GATTGTATGAA CAAATGCC	ATGGAACATC CTTCTGGG	GGAGAGGAAT AAATTATGAGTA AAA
2FH21 F_15.0 17	21	98867 74	R	T	118	15	18428 084	F	G	118	ATGGAACATC CTTCTGGG	GATTGTATGA ACAAATGCC	ACAAATGCCCAT ACTTTATTC
2FH21 F_15.0 18	21	98868 72	F	T	118	15	18427 986	R	G	119	AAGGGCTGGG AAATATC	AGCCACCATTA GCTGAGAAC	TGAGAACAAAC ATTTCAACC
2FH21 F_15.0 19	21	98868 98	F	C	118	15	18427 960	R	C	119	AAGGGCTGGG AAATATC	AGCCACCATTA GCTGAGAAC	CATGGGAGGT CAAGCAG
2FH21 F_15.0 21	21	98869 39	F	T	113	15	18427 918	R	G	114	ACACAGAGGOC CAGGGATGA	TGCATGGGGA GGTCAAGCAG	ATATTCCCAAC CCCTT
2FH21 F_15.0 24	21	98870 96	F	C	108	15	18427 761	R	A	108	ATACGGGATGG TCAACTTGG	CTCATCTGCAA CATAGCACA	CATCTGCAACAT AGCACATGACA G
2FH21 F_15.0 25	21	98871 36	R	A	111	15	18427 721	F	C	111	ACTGTCAGCTAT ACGGGATG	TGCAACATAGC ACATGACAG	AATTGGCAAAG GAGACC
2FH21 F_15.0 26	21	98871 70	F	A	99	15	18427 687	R	G	99	CAGATGATGTC CGACACAG	AGTTGACCATC CCGTATAGC	CCCGTATAGCT GACAGTGAC
2FH21 F_15.0 27	21	98871 76	R	G	99	15	18427 681	F	T	99	AGTTGACCATC CCGTATAGC	CAGATGATGT CCGACACAG	TTGTGAGGGG ACGTTGACC
2FH21 F_15.0 30	21	98873 69	R	C	120	15	18427 488	F	T	120	GGACAGAGAGA GCTGAATAC	TAGAGTGGTCT GCGCAGATA	GCAGATAAGAA ATTAGAAAGTGA
2FH21 F_15.0 31	21	98874 15	F	C	86	15	18427 442	R	A	87	CTTGATATTCAG AATGCTGG	ATTCTTATCT GCGCAGACC	CTGGCAGACC ACTCTACAGATT TTT
2FH21 F_15.0 32	21	98874 47	F	G	98	15	18427 409	R	T	98	ATGATGAGAAG CTGGTCTG	CTGTTGTGACC AGCATTCG	TGTGACCAGCA TTCTGAATATCA AGT
2FH21 F_15.0 33	21	98874 70	R	G	102	15	18427 386	F	T	102	CTGTTGTGACC AGCATTCG	TGAATGATGA GAAGCTGG	GATGAGAAGCT GGTGTGAA
2FH21 F_15.0 34	21	98874 97	R	C	80	15	18427 359	F	C	80	TTACAGCACCAG CTTCTCAT	ACACATTTGTG AAGTTAGAG	AGTTAGAGTGG TCAGTGAGGA
2FH21 F_15.0 38	21	98876 92	R	T	115	15	18427 165	F	T	114	TGTGCTTAAGTT AATCAGGC	CAGCTGTGG CTTACTACC	TTGGCTTACTTA CCTTAAATATTA G
2FH21 F_15.0	21	98878 23	F	G	108	15	18427 034	R	G	108	GGTATCTGTGC TGAGTCTTC	ATTAACTGTGC TACGCAAG	ACTGCTACGCA AGTTATAGT

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS 1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN 1	CH R_2	Marker _POS 2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN 2	PCR1	PCR2	Extension
40													
2FH21 F_15_0 41	21	98879 04	R	A	92	15	18426 953	F	G	92	ATCACTATCAGC TCAGGCAC	GAAGACTCAG CACAGATACC	GATACCTTCCAC CAGACTAACTA G
2FH21 F_15_0 42	21	98880 98	F	T	103	15	18426 760	R	C	102	AACITGGACAG TGGCGTTAG	TCTATCTTCA CATGGGATG	ACATGGGATGT TTTTAGGTTTG T
2FH21 F_15_0 43	21	98881 88	R	G	88	15	18426 671	F	T	88	TCCCAAGTATGA GAGACTGC	CTCCTATCCCT AACAAACAGC	ACATTCCTTTGT GTCAGA
2FH21 F_15_0 44	21	98882 29	F	T	108	15	18426 630	R	G	108	GAATGTAGCTG TTGTTAGGG	CTGGGCAACT GTGAAAAGAC	TCCTGTCTCAT GTTCTTACGATC AC
2FH21 F_15_0 45	21	98883 43	F	C	103	15	18426 516	R	A	103	CAGTGGCATAA AACATCTGG	AGAGACCCAG GAGAAACAATG	CAGTCTCTCCA GTCCATA
2FH21 F_15_0 46	21	98884 09	R	C	110	15	18426 450	F	T	110	CCAGATGTTTAA TGCCACTG	GAAGGATACT GGAAATAG	GAATAGTATT GTCTCTAAAC
2FH21 F_15_0 47	21	98884 47	F	C	117	15	18426 412	R	A	117	TTTTCTAGCCC AGGCTTGG	GAGGACAATA CTATTTCCAG	CTATTTCCAGT ATCCTTCAAA
2FH21 F_15_0 48	21	98884 78	F	G	83	15	18426 381	R	T	83	TGTTTCTTAGG CCAGGTC	CAATCAGAGA GCACCACAG	GAGCACCACAG TGCCCC
2FH21 F_15_0 50	21	98886 57	F	C	99	15	18426 202	R	C	99	GCTGGTCTAAC AGCATAAGG	ATAAAGTGGTC TGCAGTGGG	GCAGTGGGTAC AGAATTA
2FH21 F_15_0 54	21	98890 47	F	T	100	15	18426 811	R	G	100	GAGGCTCAAGG TTTGCTTTC	TAGATGGTGG AAGGGAAGAC	TACATCTAGG GAAATTTACAGG G
2FH21 F_15_0 57	21	98891 72	R	A	91	15	18426 686	F	C	91	CCTGGTCAATG AATAGTCTC	GCATCATCCCA CTTACACAC	TCCACITACAC ACAATGTCTA
2FH21 F_15_0 61	21	98902 85	F	T	119	15	18424 581	R	G	120	AGAGTCACAGG TAATGACCC	GCTAGTGTGA CCAGGAATAT	ATTGAGTGTGT GTGTGCTCTTG
2FH21 F_15_0 68	21	98914 52	F	T	95	15	18423 412	R	G	95	TGAAACATGAG ACTCAGGCG	TGTCCAGAAA TGTCAATTAC	GTATGTGAGCG CCAATAG
2FH21 F_15_0 69	21	98928 65	F	G	108	15	18422 004	R	G	108	AAGGTTTCAGG ATCTGGGAG	TCAAAGTCTAC CATCAGAGC	CAGAGCTTTGG TCCTCTTG
2FH21 F_15_0 70	21	98929 20	F	G	91	15	18421 949	R	G	91	AGGTGAGAGAC TGCAGGTG	ACTTGGTCTCC TGTGATTCC	TCCAGATCCT GAAACCTT

Marker_I D	CH R_1	Marker POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_15_0 74	21	98930 38	F	T	93	15	18421 831	R	G	93	CCACATCCCCCTT TCAATTTTC	TCCTATGGCC GATGCAAAATG	ATGATTCCCCA ACACAG
2FH21 F_15_0 75	21	98930 77	F	G	105	15	18421 792	R	T	113	GGACTCCTTTTG TACCACCTG	CCTGTATGAAA TTGAAAGGG	AAATTGAAAGG GGATGTGGG
2FH21 F_15_0 76	21	98931 40	R	A	90	15	18421 721	F	G	90	TCACAGTGGTA CAAAAGGAG	CTTGAGTGACA ACATCACCC	CACCCTAGTTCA CAACACCTTAG CA
2FH21 F_15_0 77	21	98931 81	R	G	111	15	18421 680	F	T	111	GGTACAAAAGG AGTCTCTAG	GATTTCTCTTC ATGGAGCCC	TCTTCATGGAG CCCCATTTGTA G
2FH21 F_15_0 79	21	98933 13	R	G	102	15	18421 548	F	G	102	ACCAGGAGGGG TGACTCAAC	TTCTCCTCTTT GCTGAGCAC	CTGAGCACAGA ATTCTCACCTC T
2FH21 F_15_0 82	21	98933 85	F	A	99	15	18421 476	R	G	99	CCATTGTGAAT TTCTCTGAC	CAGCAAAGAG GAGAACTCAC	CTCAATTTTCCC TCAAGAA
2FH21 F_15_0 83	21	98934 47	R	G	88	15	18421 414	F	T	88	ACTGGGGAAAA ACCTTGTCG	TGGAGAACTCTC CAGCTCCAG	GGTGGGACCCC AAAAGA
2FH21 F_15_0 84	21	98934 75	F	G	118	15	18421 386	R	A	118	TGGAGAACTCTC CAGCTCCAG	GGTAGAACT GGGAAAACCTT GTGC	GTAGGAATGG GGAAAACCTT GTGC
2FH21 F_15_0 85	21	98938 47	F	A	110	15	18421 032	R	C	110	AGCCAAGGAAC AAATTTCCC	TGCAAAGCTGT CAGCAAAGG	TCTCTTTGAGAG AAAGAATAATG
2FH21 F_15_0 86	21	98939 44	R	T	109	15	18420 935	F	C	109	TTGCTGACAG CTTTGCGAG	TAAGAGGGAA CATCCTGGTG	GAGTCACACAG AGAGCTCACTT GTCC
2FH21 F_15_0 91	21	98945 48	R	G	89	15	18420 331	F	T	89	TTCATGTTTCT CCAGGGAC	GGTATTTTAGA GATGTAGAC	GATGTAGAGCT AGACACAGCA
2FH21 F_15_0 92	21	98947 01	F	T	103	15	18420 178	R	G	103	TAAGGTTTCTGT CCCGAATG	AGTSGTCACTA GGATCACAG	CTGAGGGTAAAC CTGGTGAATCTT CT
2FH21 F_15_0 93	21	98947 29	F	C	102	15	18420 150	R	A	102	GATTCCTGAGA CTGTCTCC	GGGTAACTGT GTGAATCTTC	AGTCACATTCG GGACAGGAACC TTAG
2FH21 F_15_0 97	21	98935 75	F	T	119	15	18413 155	R	G	119	CTTCCCTTTAGC ATTATAAC	TGTCTGCTGTG GAAAGAAG	CTGCTGTGGAA AGAAGACATAG
2FH21 F_15_1 01	21	99039 15	R	T	110	15	18412 815	F	C	110	TAGTGAGGGCT CATCACTAC	AAGAGATGGT CTGACTTGC	GGTCTCCACTT GCTGTAAAGCTC ACACT
2FH21 F_15_1	21	99051 85	F	A	118	15	18411 551	R	C	118	CACAGCTTGGT GCAAAATGAG	TACAAGTGATT CAACACAG	ATTCAACACAGA GCCTG

Marker / D	CH R_1	Marker POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
03													
2FH21 F_15_1 _06	21	9080 91	F	T	91	15	18410 845	R	G	91	CTGTGAGAAGA TTCACGGAC	CTGCCTGTATT TGACCACAC	TGTATTTGACCA CACTTATCTT
2FH21 F_15_1 _07	21	9063 94	F	C	88	15	18410 342	R	A	88	GGGAGATTTTG CGACTTTTC	AACACTGGAAA GCTCACACC	CTCACACCCAG ACTCAG
2FH21 F_15_1 _19	21	13076 012	F	A	110	15	18264 867	R	C	110	TCTCCCTCCC GGGGCTAA	TAGGGCGGTG GAGAGCGGG	GCTGGAGAGCG GGGATCCTCTG GT
2FH21 F_15_1 _26	21	14329 608	F	C	98	15	44318 884	F	T	98	TACCAATATTC AAGTGAG	GTGGCATTTTA TCTTGCAAC	ATCTTGCAACA TTTGGCACA
2FH21 F_15_1 _28	21	14328 861	R	G	113	15	44319 637	R	A	118	GGCCAGAGAAT TCTCGAGC	AGGAGCCCTTC AGATTCTGTG	TGTGGATTCTCT GTACC
2FH21 F_15_1 _30	21	14330 105	R	C	113	15	44319 887	R	T	113	CACATGCTGTC AGCTAAT	TTCTCTGGAA TAAGACCCC	AAAGGCTGAGG AATCTGT
2FH21 F_15_1 _34	21	14330 189	R	T	107	15	44319 971	R	C	107	GGGTCTTATTC AGGAGAA	GCTCTGCACT GAAGCTACTG	GTTATTGTGCA TAAATTAAATAA G
2FH21 F_15_1 _35	21	14330 252	F	A	110	15	44320 034	F	G	110	TTTACTTGCGG CAGTTTTC	ACAGTAGCTTC AGTGCAGAG	CTGCAGCTTCA AGCTTTAC
2FH21 F_15_1 _37	21	14330 414	F	T	94	15	44320 198	F	C	95	TCTCCAGTATCT CAGTCCC	AAGTATCATTC CCCCCACCC	CCCCCACCTT GCTATT
2FH21 F_15_1 _39	21	14330 464	F	C	83	15	44320 249	F	G	84	TTCTCTGTGCAC ACTGTAA	AGTGGGAAT GAGATACTGG	CTGAGATACTG GAGAAAAGT
2FH21 F_15_1 _42	21	14330 813	F	G	102	15	44320 399	F	T	102	TGTGACCACT GCCAGTC	TGGCATGCTG AGAAACTCAC	GTTTGTGGTCTT TTTGTGAATAA
2FH21 F_15_1 _44	21	14330 885	R	T	106	15	44320 643	R	A	101	CAAGTACTGTGT CCAGGATG	TTCTTCCCAGC ATAGGGTTG	GCATAGGGTTG GAAAAATTGCTT A
2FH21 F_15_1 _46	21	14331 549	R	C	84	15	44321 301	R	T	84	AATTATTGAATC TGGTTGG	GTCTGAAGTAT TGCAAAAGC	AGCAGTATGAA AAGACATTAT
2FH21 F_15_1 _47	21	14331 597	R	A	80	15	44321 339	R	G	80	CATTAAATGTTCA GATTCCAT	GTCTTTTTCATA CTGCTTTC	TACTGCTTTGCA ATACTTCAGAC
2FH21 F_15_1 _48	21	14331 644	R	C	105	15	44321 396	R	A	105	ACTTGTATGGAA TCTGAAC	AGCTTGTAAAT CAAGAGTG	GTAATTCAGAG TGTAATATCTTA

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_15_1 49	21	14332 091	F	G	100	15	44321 855	F	A	96	CACCTTAATTT GCAAAAGTGG	CACCTTAATTT GCAAAAGTGG	AAAAGTGGAGC TTGGGT
2FH21 F_15_1 50	21	14332 119	R	G	96	15	44321 879	R	C	92	TTTACACTCA ATATGACC	TTTACACTCA ATATGACC	CTCAATATGACC TCCTTCT
2FH21 F_15_1 51	21	14332 566	R	G	119	15	44322 320	R	T	124	AGAGCTCCTGG TGGACAG	CACCTTGCTGT TGAATTC	CAAGCAGTGGC TCTTCT
2FH21 F_15_1 52	21	14332 589	F	A	114	15	44322 343	F	G	119	CACCTTGCTGT GAAATTC	TCCTTGCTGGG ACAGGGACT	AGAGCCACTGC TTGGAGAG
2FH21 F_15_1 53	21	14332 612	R	G	109	15	44322 371	R	C	114	AAGAGCCACTG CTTGGAGAG	TAAATGTGTG GATATGTC	TTGCTGTGTAA ATTCAATTA
2FH21 F_15_1 56	21	14333 098	R	G	102	15	44322 880	R	A	102	GAATTGGTGGG GGACCCCTT	TGATGTAGGG CATCTCTAGG	CCCCTAATCCA GACTCATGGGT GTC
2FH21 F_15_1 57	21	14333 124	F	A	106	15	44322 906	F	G	106	TTGTGATGATG GTAACAAGG	AATCCAGACTC ATGGGTCTC	AAGGGTCCTCC ACCAATTC
2FH21 F_15_1 60	21	14333 462	R	G	101	15	44323 242	R	A	101	CAGTATGCAATT ATGACAC	CTTGTTAAAGA AGCACTGTC	GCACTGTGCCA CATTAAATATAC
2FH21 F_15_1 65	21	14333 667	R	A	95	15	44323 445	R	C	95	GCTTGACTGGT CTGTCTTAC	ATTTCAAAGCT AGTAACAG	AAAGCTAGTAAC AGAGAGATT
2FH21 F_15_1 70	21	14334 200	R	C	109	15	44323 975	R	G	106	CAAGTAATTCA AACTTGAC	TGCTGCTTGCA GTGCCCTA	GCTGCTTGCG TGCCTACCAAG T
2FH21 F_15_1 75	21	14334 530	F	G	105	15	44324 302	F	A	105	CTCTAGAGGAG TCATAAGCC	CCAGCAATGA CATGATTACC	CCCCAAAATGT CTGAAACCCCTG C
2FH21 F_15_1 78	21	14334 783	R	T	89	15	44324 556	R	A	89	TGGAAGTCAATC TTGAAGTG	CATTAAACATA AGAGAGGC	TTAACATAAAGA GAGGCTGAAC C
2FH21 F_15_1 80	21	14335 783	R	G	111	15	44325 553	R	A	111	TCATAGCACTG CCCTACTAC	GAATCTTTATA TGAGAGGAC	AGAGGACCTCA TGGACA
2FH21 F_15_1 82	21	14335 875	R	G	106	15	44325 644	R	A	107	GTAGTAGGGCA GTGCTATGA	GGACAATTAA CTATTCCC	TCCTCATCTCAT TTAAATAAC
2FH21 F_15_1 91	21	22732 455	R	T	110	15	50126 130	F	C	111	TCAAACACTTTC ACAATGT	TCCTTAGTGAT CCCCAGAG	CCCTACTGATCC CCAGAGTGTCA AA
2FH21 F_15_1	21	22909 478	F	T	110	15	57893 049	R	G	110	GAGCTTGATCC TGATCTTC	TCAAGTAGTGT CTCCCTT	CAAGTAGTGTCT CCCTTTCATTC

Marker_J D	CH R_1	Marker POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
93													
2FH21 F_15_1_95	21	22909 551	F	T	82	15	57892 976	R	G	82	COCTACGACGT GTCAGAA	CCTGAAGAATC AGGATCAAG	ATCAGGATCAA GCTCTCAAAAT
2FH21 F_15_1_96	21	22909 583	R	C	121	15	57892 984	F	C	121	CAGGATCAAGC TCTCAAAAT	GATAGGATGA GCAAGCAAAA	CCCTACGACCT GTCAGAAA
2FH21 F_15_1_98	21	22909 608	R	G	94	15	57892 919	F	A	94	TTTCTGACAGGT CGTAGGG	GGACATCATG ATAGGATGAG	TAGGATGAGCA ACCAAAA
2FH21 F_15_2_00	21	22909 683	F	G	114	15	57892 844	R	A	114	GCTCATCCTATC ATGATGC	AGCTATCTGGT AGATAGTGG	CTATCTGGTAGA TAGTGGAAATTT GC
2FH21 F_15_2_09	21	31354 944	F	G	94	15	23136 353	F	T	94	ACAGACAGAGC ACCTGTGG	CTTCTGTGTC TGGGCCATT	GTCTGGGCCAT TTTTGGCTA
2FH21 F_15_2_10	21	31354 964	R	G	90	15	23136 373	R	A	90	CTGTGTCTGGG CCAATTTTG	ACAGACAGAG CACCTGTGG	ACAGACAGAGC ACCTGTGGGAG GAC
2FH21 F_15_2_11	21	31354 995	R	C	119	15	23136 404	R	T	119	GTCTGGGCCAT TTTTGGCTA	CAGAAAAGACT CTTCTTGCAG	AAGACTCTTCTT GCAGTTTACA
2FH21 F_15_2_12	21	31355 087	F	C	83	16	23150 634	F	T	83	ATTGCTTATATG TGGAGCC	GAGTCCCTGG TATAGCCAC	GTATAGCCACC GTCATATTC
2FH21 F_15_2_14	21	31355 171	R	G	114	15	23150 809	R	A	215	TCTTCTAGTGCT TGGAAATC	CCAATGAATCT CCCTTAAAG	TGAATCTCCCTT AAGTACTTA
2FH21 F_15_2_17	21	31355 249	F	G	81	15	23150 887	F	T	85	CTCGAAAAGC CTTGAAGT	GTCAATCTTTA TTCTGACTAC	AATCTTTATCT GACTACATTCTC AAT
2FH21 F_15_2_18	21	31355 353	F	G	118	15	23152 205	F	A	119	AAGGGAATGTG GAAGATGAC	TATCACCATT TCCTTTAG	CATCATTTGGTT ACCAAAA
2FH21 F_15_2_19	21	31355 370	R	C	101	15	23152 221	R	T	102	CATCATTGGGTT ACCAAAA	GGAGTATGAA GGGAATGTGG	AAGATGACATG ATGATCACCCTTC CAG
2FH21 F_15_2_20	21	31355 525	R	C	100	15	23153 010	R	T	100	TTCTGTAGACA ACCATGGG	CTGATTGGCAT AGTACTGGG	GGCTATTACAA TAACGTATACT GG
2FH21 F_15_2_21	21	31355 019	R	A	98	15	23156 668	R	C	104	GGATTGAAGATT TCTCCAC	GGAAATTTGAAG GAGAACAAGG	AGGAGGTGTT TCCAAA
2FH21 F_15_2_22	21	31356 039	F	C	103	15	23156 688	F	T	109	TATGTGGAATTT GAAGGAG	GGATTGAAGAT TTCCTCAC	TTTGGAAACACC TCCCTCA

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_15_2 23	21	31356 065	F	G	87	15	23156 720	F	C	108	CTATGAAATC CTGCAGAC	TTTGGAAACAC CTCCCTCA	TCCTCTCAAAT TCCACATA
2FH21 F_15_2 28	21	31356 399	F	G	86	15	23167 097	F	T	86	GGTGTAAAC CCTGGATTG	CAGTGGTTCAT TAATAAACTC	AACCTTCAAAA GGGATAAG
2FH21 F_15_2 31	21	31356 477	F	C	119	15	23167 175	F	T	119	ATGAAGAGCCC ATCCCTGAG	TTTCAGGGG GTCCACTC	GACCTTCTTGT TTCTTCT
2FH21 F_15_2 34	21	31356 643	F	C	120	15	23167 241	F	T	119	GCCTCGAAGTG CTTGAAATG	CTCAGGGATG GGCTCTTCAT	GATGGGCTCTT CATCATCTTC
2FH21 F_15_2 36	21	31356 594	R	T	101	15	23167 291	R	C	100	TGATTTGTGTCC ACTTCCC	ATGCCATTGTT GCTGCTTCG	CTTCGAAGTGC TTGAAAATG
2FH21 F_15_2 37	21	31356 757	R	C	86	15	23167 454	R	T	86	CTGGTCTGCATT GTAATTAG	AGCAAGCTAC CCCTTGCAG	CTTGCAGCCCA AGGAAA
2FH21 F_15_2 38	21	31356 790	F	T	104	15	23167 487	F	C	104	TCTCCACAGTC CTGAATATC	TTTCCITGGGC TGCAAGGG	CTGCAAGGGGT AGCTTGCTCAT
2FH21 F_15_2 39	21	31356 911	R	A	93	15	23167 608	R	G	93	GAACAAATTCAG ATAATTAGG	GTCACCTAAC GTGGAATGTG	CGTGAATGTG ACTTGA
2FH21 F_15_2 41	21	31357 019	R	G	112	15	23167 716	R	A	112	GAGAGCAATCT GGTGTAGAC	TTAGGCCCTG ATGATGTGTC	CTGATGATGTG CTGTGGATA
2FH21 F_15_2 42	21	31357 085	F	G	100	15	23167 782	F	A	100	CATGTTCTGTG CTGCTATG	ATTGTTGTCTC CCTGTGAGC	TGCTCCCTGT GAGCTATCAC
2FH21 F_15_2 43	21	31357 087	R	G	100	15	23167 784	R	C	100	ATTGTTGTCTCC CTGTGAGC	CATGTTCTGCT GCTGCTATG	GAAGACTCAGA AGCATCTTCCTC AAG
2FH21 F_15_2 44	21	31357 145	F	G	117	15	23167 842	F	T	117	ACACACCAAGG AAGAACTG	TTCCATAGCAG CAGCAGAAC	AGCAGAACATG CAGCTTTT
2FH21 F_15_2 47	21	31357 316	R	T	115	15	23168 014	R	G	116	GCACTAGAAAA AACTCTTCC	AACAGAAAGAG AAGGTATAT	CAGAAGAGAAG GTATATGAATT
2FH21 F_15_2 48	21	36589 643	F	T	90	15	81157 835	F	G	214	GCAGAGGATGC TAATTATGG	TGTGATCTCTC AGGTCTGTC	GGTCTGCCAG CTGGCTGA
2FH21 F_16_0 04	21	15052 250	F	T	117	16	56061 461	F	G	117	GTATCAAAAGC CACCCCTG	AAAGGCCAG GAGCTGAGAC	CAAGGAGCATG CCAAGT
2FH21 F_16_0	21	15052 256	R	T	117	16	56061 467	R	C	117	AAAGGCCAAGG AGCTGAGAC	GTATCAAAAG CCACCCCT	AAGCCACCCCT GCAGTA

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
05													
2FH21 F_16_0 08	21	16577 428	F	T	115	16	75226 732	R	T	115	CACAATACTTTA TCACTCT	GTTCCTGCT TTTGTGTCAG	GCCTTTGTGTCAG TTTCAAATA
2FH21 F_16_0 10	21	29192 727	R	A	82	16	20853 095	R	T	79	AGCAGACTTGC TCCAAGACA	CGAGTCCTTTT GTCTTGCCAC	TTTTGTCTTCGA CTATCAAATA
2FH21 F_16_0 11	21	29192 949	F	T	117	16	20853 317	F	C	117	TTCTGTCACAA GTGGCTATG	CTAGTCTGGTT TACCAACA	TTTACCAACAG AACCAC
2FH21 F_16_0 12	21	29192 986	R	A	115	16	20853 384	R	G	115	GGTTACCAAAC AGAACCAC	TAGGCTTCCTG CACAAAGTGG	AGGCTTCTCTGC ACAAGTGGCTA TGTT
2FH21 F_16_0 14	21	29193 036	R	C	119	16	20853 404	R	T	119	CACCTGTGCGAG GAAGCCTAA	GAATATTAAGG AGCTGTAA	CCITTAAGTTTAA AAAGTTAGGAA
2FH21 F_16_0 15	21	29193 084	R	C	120	16	20853 452	R	T	120	CTTTTAAAGT TAAGGATAAG	GACACCAACA AAGTCTGCAA	AAGAAATTAAAG GAGCTGTAAA
2FH21 F_16_0 16	21	29196 058	F	T	117	16	20855 783	F	C	120	AAATAACCAGCA GGTACCAG	AAGTTCAGGTT TGGCTCCTC	GGCTCCTCCCT CATTTA
2FH21 F_16_0 18	21	29197 551	F	C	100	16	20857 780	F	T	100	CTTGAAGAAAG AAGTTGGTG	TTGCTCCACIT TCCACTGAC	TTGCACTGACTG GAATC
2FH21 F_16_0 19	21	29197 558	R	G	100	16	20857 787	R	C	100	TTGCTCCACTTT CCACTGAC	CTTGAAGAAAG AAGTTGGTG	AGGCATCTACA GAGATGAG
2FH21 F_16_0 21	21	29197 604	F	A	114	16	20857 833	F	G	114	ATCAGCAGCOC TCTGGAAGT	CTCATCTCTGT AGATGCT	CACCAACTCTT TCTTCAAG
2FH21 F_16_0 22	21	29197 624	R	T	114	16	20857 853	R	C	114	CTCATCTCTGTA GATGCT	ATCAGCAGOC CTCTGGAAGT	CTCTGGAAGTG AGGGAGA
2FH21 F_16_0 23	21	29197 908	R	G	102	16	20880 574	R	A	102	TTCCGCGCCGOC AGGCTGAG	GGAGAAAGT TTCTCTTCC	ACGTTCTCTTT CCTCTCAG
2FH21 F_16_0 24	21	32671 407	F	G	98	16	30338 481	F	A	97	CATGCCAGAGC AAACTGTAG	CAACCCACTTC AGTGCCAG	ACCCACTTCAGT GCCAGAGCCT AC
2FH21 F_16_0 25	21	32671 471	F	T	88	16	30338 544	F	C	88	GGTTTGGATT ATGATGG	TACAGTTTGCT CTGGCATGG	TGGCATGGGT ACTATGAGAGG
2FH21 F_17_0 04	21	24615 434	F	T	83	17	44843 420	R	C	83	CTGAACGTGGC ACCAAGAGA	TTCAGAGATC AGGGAGTTG	GGAGTTGTAGG TATTAATACATT

Marker_I D	CH R_1	Marker POS 1	SE NS E1	Mar ker 1	AMP LEN 1	CH R_2	Marker POS 2	SE NS E2	Mar ker 2	AMP LEN 2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_17_0 _06	21	38532 100	F	C	94	17	45987 947	R	A	94	TGCCCTTCCTGA GTACCCCTC	TGACGAGGCT TGATTCTCAC	GCTTGATTCTCA CACACATA
2FH21 F_17_0 _08	21	38532 123	R	T	96	17	45987 924	F	C	96	TGAGCAGGCTT GATTCTCAC	GCTGCCCTTCC TGAGTACC	GTGCCCTTCTCG AGTACCCCTCCG A
2FH21 F_17_0 _09	21	38532 149	F	C	91	17	45987 898	R	A	91	TGCTGATTCTG GCTGATGGG	TCGGAGGGTA CTCAGGAAA	TCGGAGGGTAC TCAGGAAAGGC AGC
2FH21 F_17_0 _10	21	38532 403	F	A	95	17	45986 684	R	C	95	TCCGTGTCTAG CCCACACC	ACACACACTTG TCCATCCAG	ACTTGTCATCC AGTCCCTGTG
2FH21 F_17_0 _11	21	38532 428	R	G	99	17	45988 669	F	T	99	ACACACACTTGT CCATCCAG	GCCAACTCCGT GTCAGCCC	TCCGTGTGAGC CCACAACC
2FH21 F_17_0 _12	21	39486 280	R	A	95	17	41026 587	F	C	95	TATTCCTTGA TATCCAC	GTCACTGTAGA ACTTTTCACC	TGTGGAAGTTAT ACCTCTGAA
2FH21 F_17_0 _14	21	39486 350	R	A	93	17	41026 517	F	C	93	CAGGTGAAAG TCTACAATG	GTGTATGGAA ATTATAGTTC	TGTATGGAAT ATAGTTCAATTA TT
2FH21 F_17_0 _15	21	39486 380	F	T	107	17	41026 487	R	G	107	GTGATATATT ATTATCAGG	AATAATTGAAC TATAATTTC	AATTGAACATA AATTCACATAA CA
2FH21 F_17_0 _20	21	39486 682	R	A	99	17	41026 180	F	C	104	CACAATCAAGTT CAACTTGTA	TTACTAAOCT CCCTGTTTG	TAACTCCCTGT TTGATATTAAAA A
2FH21 F_17_0 _21	21	39486 851	R	C	82	17	41026 004	F	T	82	ACCATCTGAGG GTGTTACTG	GTGCAAGGG CTTAGTGATG	CTAGTGATGCA TCTTATTCTTTA
2FH21 F_17_0 _22	21	39486 902	R	T	100	17	41025 953	F	G	100	AGCACTTCAAAA CAGAAGGG	ACAGTAACACC CTCAGATGG	GGTATTTTAT GGTTTGTTTAT AT
2FH21 F_17_0 _23	21	39486 997	F	G	102	17	41025 858	R	A	101	AGAAAGGTCC TTTCAAAAT	AGTCTTTGCC TCCATTTTC	AACCCAAATTC TCTTTAG
2FH21 F_18_0 _02	21	13557 219	R	A	102	18	15086 411	F	G	101	AGATATGCCA GCCACCTAC	TAAGAGAGCTA CAGGTGGTG	AGGTGGTGGTG TCAGTAAATGG
2FH21 F_18_0 _05	21	13583 906	R	G	86	18	15072 086	F	T	86	GAGGGCCACAT TTCACATG	CCCTTTAAGG GGAATGATT	GGGAAATGATT AGAAATAGAAAC TTC
2FH21 F_18_0 _06	21	13585 163	F	T	119	18	15070 881	R	G	119	TAGGGTAAATG GTGAGAGAG	TTAGAAAGAG ACTAAATTC	ATTTACATAGT CCTTAAATTTG T
2FH21 F_18_0	21	13585 166	R	C	119	18	15070 878	F	A	119	TTAGAAAGAGCA CTAAATTC	TTAGGGTAAATG GTGAGAGAG	TAAGAGTGAAG CGAAATC

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
07													
2FH21 F_18_0 19	21	13607 464	R	A	108	18	15048 533	F	G	109	TAGACGTTT GAATTG	TTCGGATGAA GATAGTGGC	AGAATGGAGG ATCTATTAGCAA AAA
2FH21 F_18_0 20	21	13608 759	F	T	100	16	15047 227	R	C	100	GACCAAGTGT ATACATAG	TCCTCTCTCC CTGAAAAG	TGAAAAAGAGA CACATTTCCTT TG
2FH21 F_18_0 21	21	13609 221	F	C	97	18	15046 765	R	A	97	GTGTAGTAAGC GGGAATGAG	GGGATGATTCT TAAAAGG	AAAAGGGATTCT GGAAAGTGG
2FH21 F_18_0 23	21	13613 775	R	T	111	16	15039 544	F	C	111	CAATAAGGTGG TATCTCTCC	AGTGGGGCAC ATGTATTG	TGGGGCACATG TATTTTGTAGAT T
2FH21 F_18_0 31	21	13676 899	F	C	80	18	14843 884	R	A	80	GTGTGAGGCTT CACTAAAGG	AGCCTCTATTG ATGCCTCAG	GCCTCAGAGAG TGAGAA
2FH21 F_18_0 35	21	13677 129	F	C	96	16	14843 654	R	A	96	GCTGCTGTGTA GTGAATTAC	GTGTCTAGTAA GACAGTACC	ACCAATTTGGCA GAAAGATT
2FH21 F_18_0 42	21	13678 531	F	T	119	16	14842 335	R	C	119	GAAGTTAACA AAGCAAGG	CCATAATTGAA TACCTCTC	ATAATTGAATAC CTCCTCATTTT CTC
2FH21 F_18_0 44	21	13678 653	F	T	86	18	14842 213	R	C	86	AGGAGTCTCTG GAGCAGAAA	CTAATTGCTGT CGAAGCCAC	ACCTATTTTGGC TTTCTAGTT
2FH21 F_18_0 45	21	13678 937	F	T	120	16	14841 929	R	C	120	CAAGAACTTGCT TTCCACAG	GTGTATGGAG CACCTCATG	ATCAACATTTCAT TATTCCTTGCAA A
2FH21 F_18_0 46	21	13679 258	F	C	81	18	14841 608	R	A	81	TTATTTTCCCTT CACCTGG	TGCCATGCTAA AACTGGAAG	AGTAGCCACAC TGAANC
2FH21 F_18_0 47	21	13679 689	R	G	108	18	14841 172	F	T	108	ACTAAGGCTCTT AGTATGGG	TAAAGATTAA TCAATTGAC	AAGATTAAATCAA TTTGACTACATA C
2FH21 F_18_0 48	21	13679 727	R	G	85	16	14841 134	F	G	85	TATATGTAGCAC TAAGGTC	TGGGTTTACAC TCTGATGTC	TTACACTCTGAT GTCTAACCTATA CAA
2FH21 F_18_0 50	21	13680 033	F	T	108	18	14840 828	R	G	108	CTTTACCACCTT TGTTTG	GGACTTCTCCA CCAAATCTC	CAGTTAATCTA CTGGGTAATA
2FH21 F_18_0 51	21	13680 058	R	C	113	16	14840 803	F	A	113	GGACTTCTCCA CCAAATCTC	ATGCTCTTAC CACTTTG	ATCTCTTTAGC ACTTTTGTGTTG A
2FH21 F_18_0 54	21	13680 768	F	C	103	18	14840 088	R	A	104	TGTCATTGGAA GAGGTAC	ATAAAATTCCT ATATTCCTG	TCCTATATTCCT GAATTTTTTTT

Marker_I D	CH R_1	Marker POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_18_0 55	21	13680 786	R	T	107	18	14840 059	F	G	108	CCTATATCCTG AATTTTT	TTTCTCACTA TTTTCAAG	TGTCATTGGAA GAGGTTAC
2FH21 F_18_0 59	21	13686 501	R	T	101	18	14834 328	F	T	101	ATATTCAAGTA TCACTATG	GCTTTAATGTT OCATAGGTC	ACAGTTTTCAC TTTATTAAAGTA GA
2FH21 F_18_0 60	21	13688 840	F	A	100	18	14833 989	R	C	100	ATTATTCCTATG CATGCTT	AGCAGTTGAAA ACAAATTC	ACAAATTCCTAC ATATTATCTATG ACC
2FH21 F_18_0 61	21	13686 860	R	G	111	18	14833 969	F	A	111	CTACATATTATC TATGACC	GTAACAATTTG TCTAAACTGG	TATTATTCCTAT GCATGCTTAAA
2FH21 F_18_0 63	21	13687 524	F	A	98	18	14833 315	R	C	98	GTAGCTTTAATT TCAGGTG	TAAGTCATACA GACATTCCTC	CAAAACATTACA GTATGAGGAC
2FH21 F_18_0 65	21	13687 741	R	A	120	18	14833 088	F	A	120	TGGGGGAGATG AGACTATTA	GGAAGATMAA CAAAACATTG	AAACATTGAGA GCAGGT
2FH21 F_18_0 66	21	13688 025	R	A	116	18	14832 818	F	A	112	CAGCCACAAT GAATCCAG	CATACCGAAA GAAAACCCCC	GCTGAGAAAAA GGACTTAG
2FH21 F_18_0 67	21	13688 314	R	A	115	18	14832 529	F	C	115	AGGAGCAAATT ATGAOCCAG	GATATAAATTA TTCAAGTGT	AGTGTATTTAC TGAATATATGG
2FH21 F_18_0 68	21	13688 562	F	T	111	18	14832 281	R	G	111	TTTGCAATGAGTG AATCAAG	TGTTTCCATA TCCTTGCG	TATGCCTACATT GCTGTATC
2FH21 F_18_0 70	21	13688 877	F	C	118	18	14831 966	R	T	118	GAGATATTTGAA TCTAAGAGC	TATGGTAAGTG TCTAATAG	ACCAAAACAATT TGCTTCATTAA
2FH21 F_18_0 71	21	13689 014	F	T	90	18	14831 828	R	G	90	AGATTGTGGGT ACTCCAGAG	AGTCACCATG GTTTACTCC	TCCAAATCTAGT AATCCTCC
2FH21 F_18_0 72	21	13689 107	F	T	117	18	14831 735	R	G	118	ATAGCCAGCCA ACTTTGGAG	CCCAACAATCTA ATCTTCTGG	TGAATTCACCTCA AATTTCCITT
2FH21 F_18_0 74	21	13689 632	R	C	111	18	14831 211	F	T	111	AAGTGTGAAAA CTTCTCGTC	CTGCAGTATGT GAATATAAGC	CAGTATGTGAAT ATAAGCATATTT
2FH21 F_18_0 76	21	13690 806	F	T	88	18	14830 029	R	T	89	CCTTTTAAATA TGCACGAG	GACTAGGTTAC TGACCAAGG	GTTACTGAGCA AGGAAATATA
2FH21 F_18_0 78	21	13691 635	R	G	114	18	14829 201	F	T	114	TGCTGCAGTAG TAGGAAGAG	CTCTAAGGAA CATCTCTG	TTTTAAAGAAAA AGTTACAGTAAT TT
2FH21 F_18_0	21	13694 498	F	G	89	18	14826 337	R	A	89	AGTGTGTGAGC ATTTCATGG	ACTGTGTATC TGGTTTCC	TGGTTTCCCAT CCTAGTAAATA

Marker_J D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
83'													CA
2FH21 F_18_0 86'	21	13695 423	F	T	120	18	14825 419	R	G	120	GAATCATAAGTA AGGGAAGA	TATAAATATC CCCATTCG	TATCCCCATTGC AAGAGATA
2FH21 F_18_0 90'	21	13697 020	R	C	83	18	14823 821	F	C	83	CTCCTTTTCTTT CAGGACTG	CGGAAGAAAC AACAAAGAGC	CGGAAGAAACA AACAAAGAGCCA TGAT
2FH21 F_18_0 94	21	13708 648	R	A	100	18	14814 186	F	C	100	GTGGCTATGAA AGACAGCCT	AGCTCCGCTTT GATTTGAGG	ATTTCAGGCTTC ATAGTTTG
2FH21 F_18_1 01	21	13713 284	R	G	103	18	14807 188	F	T	103	GACTCTCTTCAT GATGACTC	GAACTAAGAC ATACACTTA	AAGTAAGACATA CACTTAACAAA
2FH21 F_18_1 03	21	13714 932	F	G	99	18	14805 576	R	A	99	AGCAACATAAG GCTTCTCC	CTTTCATGGGA GAAATGTGG	ATGTGAAGAA GAGTAATTGGAT AA
2FH21 F_18_1 17	21	13723 486	R	A	115	18	14718 593	F	C	115	GCTATGATGCAT TTGCCAAT	AGCACTGCAG GTCCAAAATG	AGATTTTAGAT GCCTTCTTC
2FH21 F_18_1 20	21	13724 769	R	A	85	18	14717 315	F	G	85	AATGTCTCTTC CTCTGCTG	ATGCATTCATC AAGCAACT	GCATTCATCAAG CAACTGGAGAT
2FH21 F_18_1 22	21	13725 010	R	A	85	18	14717 074	F	C	85	TAGCATACAAG TTGGTGAG	AGTGAACATG ATAGGAAGC	AAGCTAATTGG CACATTT
2FH21 F_18_1 23	21	13732 060	F	C	93	18	14710 050	R	A	93	CCCTTTTCTTCA TAGGTAGG	GAGCTGGATC CATCCATCAC	TCACCAGGGAA TCCTTACTA
2FH21 F_18_1 26	21	13734 197	F	G	104	18	14707 921	R	T	105	TTGTGACATGAT AAAGCTGG	GTCTGAAAAC TGTCATTC	CTGTCAATTCAGC GACTA
2FH21 F_18_1 27	21	13734 217	R	C	102	18	14707 900	F	A	103	AAACTGTCAAT CAGCGACT	TTGTGACATGA TAAAGCTGG	AGCTGGATATT GAAAACCAAAA
2FH21 F_18_1 32	21	13735 676	R	C	106	18	14708 441	F	T	108	CAGTACTAAGTA TGAACATGA	TATACCTTAGA ATAGTCAG	ATACCTTAGAAT AGTCAGAAGTC AG
2FH21 F_18_1 33	21	13736 390	F	G	116	18	14705 733	R	T	118	GGTCTAGAGAA CTCTGAAAG	TGCAATTCAT TGGACACGG	TCACCTGGACA CGGCCTAAC
2FH21 F_18_1 36	21	13739 171	F	C	97	18	14702 950	R	A	97	AGGAAGTTGCA CTCTGTTGG	ATATACACACC CTCCCTGC	GCACATTTGACT TTCTGTACAACA
2FH21 F_18_1 37	21	13739 241	R	G	110	18	14702 680	F	T	110	TGCAACTAAGA GACATCAGC	AGTCAAATGTG CAGGGAAGG	AGTAGCCAGAG GGCAGCCAGG

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_18.1_38	21	13739 280	R	C	111	18	14702 841	F	A	111	AGCTGATGCT CTTAGTTGC	TGGTAGAGAC TCACGCAAG	AGCTTACCAG AAACCCAGAG
2FH21 F_18.1_39	21	13739 359	F	C	115	18	14702 762	R	A	115	AGTCTCTACCAC AAGAACAC	ATTAGGGTGC AGACAAGGAG	CTTCTCTAGCCT ATTGTCTCC
2FH21 F_18.1_41	21	13739 493	F	T	104	18	14702 628	R	G	104	TAGTGAAGCTG TCGGTAGTG	ATTCAGCCTG GTGAATGAAG	GCCCTCCAATA ACAAGA
2FH21 F_18.1_42	21	13739 495	R	T	104	18	14702 626	F	G	104	ATTGAGCCTGG TGAATGAAG	TAGTGAAGCT GTCGGTAGTG	GTGAGAGACAT TGTCACCCAGA CAC
2FH21 F_18.1_43	21	13739 563	R	C	100	18	14702 558	F	C	100	CAATGTCTCTGA CACTACCG	TGACITTTGGAG GTGGGATACG TGTG	TGACTTTGGAG GTGGGATACG TGTG
2FH21 F_18.1_44	21	13740 079	R	G	100	18	14702 029	F	T	100	CAGATGCCATT GATGGTGC	TGCTCTCTCTA AACCTTCTC	CCTAAACCTTCT CATCTGCTGTG
2FH21 F_18.1_45	21	13740 111	F	A	108	18	14701 997	R	C	108	CTGTACCACCT TGCCTGC	GCAAGATGAG AAGGTTIAGG	AGAAGGTTT GAGGAGCA
2FH21 F_18.1_49	21	13740 288	R	T	108	18	14701 820	F	G	108	TGGTGGCACTA GTACACAAG	TTCATAGAACC ATGCCACCC	AGAACATGCC AACCAGATATTC TC
2FH21 F_18.1_51	21	13740 658	R	A	81	18	14701 478	F	C	81	GTTTATTGCAAC ATCTACA	GAAGCAATTT AAGCTAACAG	AGCAATTTCAAG CTAACAGAAA AG
2FH21 F_18.1_53	21	13740 789	F	T	108	18	14701 347	R	G	108	TCCATGTTGCCA GTAACAC	CAAGCTTTTCT CTTGTAGTC	TAGCTATCTTA CAGGTACTTCC A
2FH21 F_18.1_54	21	13741 100	F	T	81	18	14701 038	R	G	81	TAAATGAGCAG AGACTCAAG	TTAGATTGTTA TCCCCACT	TTGTTATCCCA CTTCTTTAA
2FH21 F_18.1_56	21	13741 318	F	C	85	18	14700 818	R	A	86	AGGACGTGTAA GAGAAAGGG	GTCTTCGTAA ATCAAAACC	CGTAAATCAAC CCTTTGTCTTT
2FH21 F_18.1_58	21	13741 417	R	A	118	18	14700 718	F	C	118	CGTCTTTGACA CATTTIAG	GAACACTTCA GTTTCTTG	CTCAGTTTCTT GAAATGTTT
2FH21 F_18.1_59	21	13741 498	F	C	112	18	14700 637	R	T	112	CCAAACATTIAT AATCTGAC	GTGTTTCTTTT TTCACCTGC	TCTTATTATATC TGGATTTTAACA TTT
2FH21 F_18.1_60	21	13741 575	F	T	115	18	14700 560	R	G	118	AACCAGTACAG ATTAGTGC	AATGATCTGA CTGGTTTCC	TGATCTGACTG GTTTCTCTACATA TA
2FH21 F_18.1	21	13741 601	R	T	112	18	14700 531	F	G	115	GATTCTGACTG GTTTCTTAC	AACCAGTACA GATTAGTGC	TGCAATAATTA GAAAGTAAAGG

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
61													
2FH21_F_18_1_62	21	13741741	R	A	114	18	14700391	F	G	114	TCTCATGAAAA GCAGCAG	GCATGCTCTA GTGGTTAC	TTACTATTAGAC AATAATGGGTTG GC
2FH21_F_18_1_71	21	13748965	R	C	114	18	14895171	F	C	114	GGGAAGATCTT AAAGGGAGC	TTCCTGATGAT AATCTTCCC	TATAGCCAAATA ATTACTCTTATT TTA
2FH21_F_18_1_72	21	13753480	R	C	114	18	14898687	F	A	114	TTCTGCAAAATTA CCATTTC	TCTATGCCCTAA AATAAGTG	CTATGGGTCAG TTGGAG
2FH21_F_18_1_73	21	13753479	F	A	114	18	14898688	R	C	114	TCTATGCCCTAAA ATAAGTG	TTCGCAAAATT ACCATTC	TCCAACCTGAOC CATAGA
2FH21_F_18_1_74	21	13754373	R	G	90	18	14887774	F	T	90	GATCTCTGCAAA GAATACC	GGGAACCTGTT AAGAAACTC	AAGGAAGTGAA TGGATCTTAC
2FH21_F_18_1_75	21	13754850	R	A	98	18	14897294	F	G	98	CAGGAGTATGC ATTTCTCTC	GTCCACACAGA GTCTGTGAG	AGCACCACCTA AATACTTTTCA
2FH21_F_18_1_76	21	13756658	F	G	104	18	14885428	R	A	104	ACACCACATTTC TACCACCTG	AACGGCCAGG GTGGACACT	GGCCAGGGTGG ACACTGTTACT
2FH21_F_18_1_78	21	13769627	F	C	100	18	14872247	R	A	100	TCTGTGACACA GAGCATGAG	GCATCAGGAC AAACTGATGG	TAAGCAGCCTA GGTTTCTCTC
2FH21_F_18_1_86	21	13771387	F	C	98	18	14870492	R	A	98	CAGAGCTGATTT GTCCAGT	ACCCAGTCTTC CTGAGTATG	CTGTGGGGGA TGTCTA
2FH21_F_18_1_88	21	13771486	F	C	111	18	14870393	R	A	111	AACTCCAGGGC TACTTGAAC	GTGCTATAAAG CTTTAACAAG	TAAAGCTTTAAC AAGTTGGCGA
2FH21_F_18_1_90	21	13771524	R	A	107	18	14870355	F	G	107	AAAGCTTTAACA AGTTGGCG	AAGAACTCCA GGGCTACTTG	ACTCCAGGGCT ACTTGAACAATT
2FH21_F_18_1_91	21	13771649	R	T	90	18	14870230	F	G	90	TGATACAGAAAT GTCAACCC	GATGCTTCTAA GGACCATGT	GGACCATGTAA TTTCTTTAATC
2FH21_F_18_1_94	21	13775207	R	A	120	18	14866674	F	G	120	TGTGACAAATTC TATGCC	TGCACAGTTGA AAAGTAACC	AAAGCATTTAAG AAAAGATTAGGA G
2FH21_F_18_1_95	21	13775250	F	T	119	18	14868631	R	C	119	TGCACAGTTGA AAAGTAACC	CAAACTCTATG GCATCTTTC	AATGCTTTTGT TGGTATTGATA A
2FH21_F_18_1_97	21	13775571	F	C	101	18	14868302	R	C	101	GCCATTGGAAG AATGGTATG	GCCTACATAT TGATGCAC	ACTAAGCAAGTA CTAGTAAATTA TT

Marker_ID	CH R_1	Marker POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_18_1 98	21	13775 577	R	A	101	18	14686 296	F	C	101	GCCTAACATATT GTATGCAC	GCCATTGAAG AATGGTATG	TTGAAGAATGGT ATGAAGATGATA A
2FH21 F_18_1 99	21	13775 783	F	C	101	18	14686 090	R	A	101	AGTCTGTCTATT GTAGGATG	GTACCTTATT TCCTCACAC	ACACAAAAATGT AAACATTAAAGGA
2FH21 F_18_2 00	21	13775 825	R	C	85	18	14686 048	F	A	85	GATTCATCCTAC AATAGAC	GAGAGTGAGT GAGACTTCAG	CAGCCCAATCA ATGAATGACCC
2FH21 F_18_2 01	21	13775 885	F	C	96	18	14686 988	R	A	96	GTGTAGTAGATT TTCTAGGC	TGATTGGGCT GAAGTCTCAC	ACCTCTATTAT TTCTAATTTTT CA
2FH21 F_18_2 02	21	13777 903	F	G	96	18	14683 972	R	T	96	TCTTATCACCTA TGTTCTGG	ATTGAGCAGG CAATGGAGAG	CAGAAAAAGCTTA AGCAAAAATGA GCA
2FH21 F_18_2 03	21	13777 939	F	T	119	18	14683 936	R	C	119	CCAGAACATAG GTGATAAGAC	GCCTTTATCTT CACAGCCC	TGTTATAACCT GATGTTTCATA
2FH21 F_18_2 04	21	13778 733	F	C	96	18	14683 146	R	A	96	AAATCTTTATA TAGCTTGG	GGTTAGTCTAA GATAAACTC	GAGTAAAAAGGA AGGAAAAGGA
2FH21 F_18_2 12	21	13783 264	F	T	96	18	14658 612	R	C	96	GTCTCTCATGTC AGCTCTTG	ACAACCAAGTC CTACTGAAC	TGAAGTACTGAA TGTTAGAAC
2FH21 F_18_2 13	21	13783 324	R	G	100	18	14658 552	F	T	100	ACTCAAGAGCT GACATGAGG	GTCTACCTGT CCATTGAAG	TCCATTGAAGAT GAGGACTCTTA
2FH21 F_18_2 16	21	13784 000	F	A	101	18	14657 872	R	C	101	CTGTGTTGATGT GGTAGCCC	GTCACCCAGT ATATTCTCC	TTCTCCCAATA AAAGAGGA
2FH21 F_18_2 17	21	13784 009	R	C	101	18	14657 863	F	A	101	GTACCCACAGTA TATTCTCC	CTGTGTTGATG TGGTAGCCC	GTGGTAGCCCA TCACTGGGTTG TAAA
2FH21 F_18_2 19	21	13785 807	F	C	120	18	14656 075	R	A	120	TATGTGTATAT TTTTTTCTG	CAATGCAAAACA CTTTTAAGAC	TGATCCCTTTTAA CTCAATCCAAA
2FH21 F_18_2 23	21	13787 653	F	T	83	18	14654 244	R	C	83	CTTTAGAGGAT TTTCTTAT	GTCAATAACAA CAATGTCC	CAACAATGTCCA TGAAAAACITGA TT
2FH21 F_18_2 24	21	13787 882	F	C	95	18	14654 015	R	T	95	CCAAATTAATCT TCCATTCTG	TATAGATTATT GAATCTGAC	ATTGAATCTGAC AATAAATCATAT T
2FH21 F_18_2 26	21	13788 781	R	A	100	18	14653 118	F	G	100	AGTACATCATTG GCACCTTG	ACTGCATTGA AGTAGATGG	ATTGAAGTAGA TGGTAATGTAAT AC
2FH21 F_18_2	21	13809 100	F	T	101	18	14633 715	R	G	101	GATGGAAGGAG TGGTAGTG	TGTGCCTTTGC CGAAACGAG	TGACCAGCATG ACAAGGTGA

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
33															
2FH21 F_18_2_34	21	13617 921	F		F	T	110	18	14624 683	R	G	110	TTTTCTATTTTA ACTAACTG	TACCTCTGATG AGCATCAGC	TGAGCATCAGC TAATATTTAATC
2FH21 F_18_2_41	21	13625 443	F		F	C	87	18	14617 161	R	C	87	TGACACATGACT TTTGTGCC	TCATTTAAATTA ATCATCAGG	AATTAATCATCA GGTCTTTTATOC TTA
2FH21 F_18_2_43	21	13625 600	F		F	T	108	18	14617 004	R	T	108	CAGTATTGGCTT ATTATGTC	CAGAGTAGGT GTCTTACAG	GACAGGTTCCA GTATAAATA
2FH21 F_18_2_44	21	13625 929	R		R	G	116	18	14616 676	F	T	116	CCAGGTACTGT TGTTTTTGAC	CAGGTGTTTTT GGTAACCCAG	AAGGCACAGAA AGAAGTAATATC
2FH21 F_18_2_45	21	13625 963	F		F	G	116	18	14616 642	R	G	116	CAGGTGTTTTG GTAAACAG	CCAGGTACTG TTGTTTTGAC	CTGTGCCTTCAA AATTTCA
2FH21 F_18_2_52	21	13637 138	F		F	A	103	18	14605 452	R	G	102	GAACACAAATGT GCATTAGC	TACTACGTTTT TATACTTAC	TACTACGTTTT ATACTACTTTTT TTT
2FH21 F_18_2_54	21	13646 782	R		R	T	92	18	14595 816	F	C	92	GCTTCTTAAGC TACTTTA	TAGTCGACCCT GGGCAATT	CCTGGGCAATT CCTTAAATACCA GAIA
2FH21 F_18_2_55	21	13647 349	R		R	T	112	18	14595 239	F	G	112	CGTCTCTGAG TAAACTCAC	GTAAGATGAAT ACACAAAGGC	AGGCTAAATCTT CTAAATCAAG
2FH21 F_18_2_60	21	13652 890	R		R	T	120	18	14589 935	F	G	120	GACAGAGAGGG TTAAGTTCT	GGTTACATATC ACTGCAAG	ACTAAATCAATC TCATCATACATT C
2FH21 F_18_2_61	21	13653 735	F		F	C	113	18	14589 078	R	C	113	CCATAGCAAAG TGAATTCAC	ATGATACTCCC CAAAGTCTC	CTCCCAAAGT CTCAGATAG
2FH21 F_18_2_62	21	13653 770	R		R	G	107	18	14589 043	F	T	107	CCATAGCAAAG TGAATTCAC	CTCCCAAAGT CTCAGATAG	AATTGCAAAAGC CAATTAATAAAC
2FH21 F_18_2_68	21	13656 320	F		F	C	93	18	14586 489	R	A	93	ACCTCATATGT CTGGTAGC	AGAGAATTGG GGCCTGGCT	GGCCTGGCTGA CAGTAAC
2FH21 F_18_2_69	21	13656 700	F		F	C	83	18	14586 110	R	A	83	AGTCCACATGA ACCTAGCG	TGAGATAAGTG GCTACGTTG	TAAGTGGCTAC GTTGTGTGCTA TTG
2FH21 F_18_2_70	21	13656 880	R		R	A	104	18	14585 922	F	C	104	GTGTGACTATT GTTATAG	TGGTCTCAAC ACTGACCAC	CCACTAGTATTA ACATACAGTTTA
2FH21 F_18_2_71	21	13662 329	R		R	G	105	18	14579 738	F	T	105	GAGTGTAGAGC TGTACTGG	GGACATATGG CCTTGCTTAG	AGAAAGGTGAC TAAGAAATTGTAG TTC

Marker_I D	CH R_1	Marker POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_18_2 72	21	13862 406	F	T	110	18	14579 661	R	G	110	CTCAGATTATAG GAGACAGAG	GCTCTACACTC TAGAAGAAG	AAAATTGATGAA TACTTAGTTCCC
2FH21 F_18_2 73	21	13862 436	R	A	116	18	14579 631	F	G	116	TGATGAATACTT AGTTCCC	ATCTACAAAGG ATAATCAG	TGCACCTGGAGA AATTAANA
2FH21 F_18_2 74	21	13862 459	F	T	97	18	14579 608	R	C	97	AGGAAATTATCT ACAAAGG	ACTCTGTCTCC TATAATCTG	TAAATTTCTCCA GTGCAGTG
2FH21 F_18_2 75	21	13862 500	F	A	106	18	14579 587	R	C	106	CCTGAAGTATGT TAGTAGAC	TCCTTTGTAGA TAATTTCC	TGTAGATAAATT CCTTTGTAAAGTA
2FH21 F_18_2 76	21	13862 519	R	A	106	18	14579 548	F	C	106	TCCTTTGTAGAT AATTTCC	CCTGAAGTATG TTAGTAGAC	AGTAGACAAAG AAGAAAAGTGA AG
2FH21 F_18_2 77	21	13868 305	F	G	102	18	14567 749	R	G	102	TTTGTCCTTCAT CTCTTACC	TAAGTCATTTA CTTCTCAG	TAGAAGACAGC ATTTCATTAA
2FH21 F_18_2 84	21	13877 545	F	A	83	18	14559 489	R	C	83	ATATGACTATA ACITAAATAT	TGGTGGAGCA ATGTCAAAA	CGAATGTCAAAA ATTTAAATAT CA
2FH21 F_18_2 92	21	13895 590	F	C	98	18	14541 965	R	A	98	GTGATTGTAAAA ATTATAGC	CAGATTGACCA CCTCCAAAG	AGAAAGAGGGG AGGTAAATATA AGA
2FH21 F_18_2 93	21	13896 370	F	C	99	18	14541 176	R	A	99	TGCTTTCGAATT TTTTAC	CCCATCTCTCT TAATGTCAG	AATGTCAGAAG CCCTTA
2FH21 F_18_2 96	21	13897 380	F	G	105	18	14540 150	R	T	105	CCCAAAGATTTA ACTTGAT	ATATATCTGGG CCTGGCTAC	TTCTCTTGGTTC AAATTTCC
2FH21 F_18_3 00	21	13898 483	F	C	111	18	14539 080	R	T	111	CTCTCCATGATG TACTGTAG	GCATACAGAG AGGAGCTAGT	GAGGAGCTAGT CAGAACA
2FH21 F_18_3 01	21	13898 486	R	A	105	18	14539 025	F	C	105	AGAGAGGAGCT AGTCAGAAC	CTCTCCATGAT GTACTGTAG	ATGATGTACTGT AGTAACACAC
2FH21 F_18_3 03	21	13898 901	R	C	118	18	14538 622	F	T	118	GATCTAGGTTG AAACTAGTTG	ATTGGCCCAAT GCAAGCCAG	CAGAAGTGCAA GTTGAC
2FH21 F_18_3 04	21	13898 936	R	A	111	18	14538 585	F	C	111	GTTGAAACTAGT TGGGCTTC	ATTGGCCCAAT GCAAGCCAG	GCAAGCCAGTA AATAATAAAC
2FH21 F_18_3 05	21	13899 002	F	C	110	18	14538 521	R	A	110	GGCTCTTTCAC ACCATGAG	ATCTAACGAG GATCTGCACC	TCTGCACCACC TTTCTT
2FH21 F_18_3	21	13899 589	R	G	95	18	14537 930	F	T	99	GTTAATCAGAG CCAGCCAAAG	TCAATTCCTCT CTAAGAGCC	AGCCACGGTAA CTCTTTC

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Marker_POS_2	CH_R_2	AMP_LEN_1	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
07												
2FH21_F_18_3_14	21	13958 107	F	14479 443	R	G	18	92	92	GAAGGAAGGTG GGTCTGTG	CGCCGCACAT CCCCTCGCC CTC	CGCCGCACATC CCCTCTCGCC CTC
2FH21_F_18_3_19	21	14043 808	R	14396 652	F	C	18	90	90	CTGAATTCCTTG GGAAGGC	TGAGAGTCATC AAAAAGTC	GTCAAGTTTAG TGAAGATG
2FH21_F_18_3_26	21	14121 932	F	14347 928	R	T	18	114	116	AAAGGAACGAA AGCAACGGG	AACCTGTTTCTG TGTGCC	CAGTGCTGCCA GTCAAC
2FH21_F_18_3_27	21	14121 941	R	14347 918	F	A	18	109	111	TGTTTCAGTGCT GCCAGTCAA	AAAGGAACGA AAGCAACGGG	TGATCCACGC TGCTACTCA
2FH21_F_18_3_28	21	14121 971	R	14347 887	F	A	18	109	111	TGTTTCAGTGCT GCCAGTCAA	AAAGGAACGA AAGCAACGGG	CGAAGCAACG GGGAAAAAAA
2FH21_F_18_3_29	21	14122 272	R	14347 585	F	C	18	110	111	COGCAAAAGT TTCAAGAG	ACTGATTTCCC AGCACCAC	CTGATTTCCCAG CACCACTGTC CC
2FH21_F_18_3_30	21	14124 875	R	14344 986	F	C	18	81	81	TTCCCTGATTAC ACTGTGCC	CATTATAGTC TATACGTGC	ATAGTCTATACG TGCAAGTGCAGG GTT
2FH21_F_18_3_32	21	14128 493	F	14341 370	R	G	18	81	81	ATGTAGGCATT GTAATGAGG	GACTTGAATTT AACTGCTCC	TTGAATTTAACT GCTCCAGTAAG G
2FH21_F_18_3_33	21	14221 264	R	14222 905	F	C	18	116	118	AGTATAATATT TGGCATT	CTGGGGCAAG GTTGGGAT	AAGAGAAACAA CATAATCTGA
2FH21_F_18_3_40	21	14274 503	R	14168 976	F	C	18	114	114	AGCGCACACGG TTTCGGCA	TGGGGCTGCA GCTGGGAGA	GGGCCTTGCCA TTCTCA
2FH21_F_18_3_44	21	14282 925	R	14159 539	F	T	18	92	92	CGAGTAAGTAA ATGTGAGTGG	CCCTTTTCTAC TCACATTCC	GCTAATTAGTGC TATTGGCTG
2FH21_F_18_3_46	21	14283 763	F	14158 701	R	G	18	116	118	AACTTGCTTCA AGATCTG	GATAACATAAG ATTAGGAAC	AACATAAGATTA GGAACAAGAAAT A
2FH21_F_18_3_49	21	14296 262	R	14146 201	F	T	18	119	120	TCAGAACCTTTT TGAAAC	CCAATAGGCAT TGCTAAACT	CTTTGCATATT CTTTTACGAAA CGC
2FH21_F_18_3_50	21	14296 320	F	14146 143	R	A	18	119	119	TTGGGTCAAGG CTTACTATG	GTCTGGAATTT AGATGTACGG	ACGGAATAGGA AAATTTCTCCA
2FH21_F_18_3_51	21	14296 558	F	14145 905	R	A	18	115	115	AGTGTGCTATAC TGGACTAC	ACTCTAGGCC TTTCACAGC	CTCTAGGCCTT TCACAGCAATTG AT

Marker_I D	CH R_1	Marker POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_18_3 _52	21	14286 560	R	A	115	18	14145 903	F	C	115	ACTCTTAGCCCT TTCACAGC	AGTGTGCTATA CTGGACTAC	GGTAAGGTGGC AAGTCAA
2FH21 F_18_3 _54	21	14298 284	F	A	119	18	14144 164	R	C	114	TTAGCCTTTTCC CTGCTTTG	CGTCAAGTGA GTATACCTGTG	AAACGCTGGAA AATACAAAAAA A
2FH21 F_18_3 _55	21	14298 299	R	G	110	18	14144 174	F	T	105	GTTAAACGCTG GAAATATAC	AAAATATATAT TGAAGAAGAAAC T	TTAGCCTTTTCC CTGCTTTGATTT T
2FH21 F_18_3 _57	21	14298 722	F	C	100	18	14143 752	R	T	100	AAAGAATAAAAC GTAAACTC	TGGGAGGAAT GTGAGTTGGG	TTGTAGAAATTGG AGTTAAGATAG GAT
2FH21 F_18_3 _64	21	14301 415	F	T	119	18	14141 056	R	G	119	TGCACGACGCA TCACCAGT	CCACACACAG TAAGAGCCAC	CACAGTAAGAG CCACTCGGACA
2FH21 F_18_3 _65	21	14301 450	F	A	117	18	14141 021	R	C	117	ACACACAGTAA GAGCCACTC	TGCACGACG ATCACCAGT	GTGCCCGGCTG AGGTGGGT
2FH21 F_18_3 _69	21	14301 678	R	G	106	18	14140 795	F	T	106	CCCACGAGGCA CCTGCTCT	AAGATCAGGA ATGGACAGGG	CCCACGAGAGG GCAAG
2FH21 F_18_3 _70	21	14301 937	F	A	83	18	14140 537	R	C	83	AGCCTCTGCTT CCCCACA	ATATGAGGAG GGACTCACTG	CTGGAGCTGGG AGGGGTTTGA
2FH21 F_18_3 _75	21	14302 380	F	C	118	18	14140 084	R	A	118	TGAGGTGGCCCT ATGTTCCC	ATGGGTCTGG CAAGGTTGG	TGTGGCTTTTAG GGCGA
2FH21 F_18_3 _80	21	14302 721	F	C	109	18	14139 753	R	A	109	GAGTCACCAAC TGCCCCCA	AGTCTGTGTTG GCAGACTTC	GTGGGCGACAC TTCTGTGGAGA CC
2FH21 F_18_3 _86	21	14302 985	R	G	104	18	14139 489	F	T	104	TCATAGCACAA GTCTCAGGG	ACATGTGGTGT GCCTGTGTC	TGCCTGTGTCC ACCTAA
2FH21 F_18_3 _88	21	14303 082	F	A	108	18	14139 412	R	C	108	AGGAGACCCCT CACCTATG	ATGGCCCCCTC CTCCCTATAC	TCCTCCCTATAC CGGTACAA
2FH21 F_18_3 _98	21	14303 787	R	A	117	18	14138 698	F	C	117	AGCGCCTGAGT GCCCTGAG	TCCTAGCAGC CATGGCAATC	TGGCAATCCAC AGGGAGC
2FH21 F_18_3 _99	21	14303 884	F	T	91	18	14138 591	R	G	90	TCCTGGCTCCC AGCACCAT	GGACACACTGT GGACTTGTG	TGGACTTGTGA GGAGGCT
2FH21 F_18_4 _02	21	14304 050	F	G	100	18	14138 425	R	T	100	CTGCACACTTG CAGGGTATG	AGGCCAAGAG AGGCACAAG	GCACACCTGCC TGCTCCTCTTG GAC
2FH21 F_18_4	21	14304 105	R	C	107	18	14138 370	F	T	107	CAAGTGTGCAG TCTGTCTCTC	AGAGGTCCTC AGAGACCAG	AGGACAGGGTC TGTGTT

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
03													
2FH21 F_18_4 _05	21	14304 976	R	C	117	18	14137 500	F	T	117	TGAGGACTGCT CTATGACCG	CTGCTGGATCT GGTAGTCA	GATCTGGTAGT CAGAGAAG
2FH21 F_18_4 _08	21	14305 188	F	A	108	18	14137 291	R	C	106	GGAGATAACAG GTGTTTC	TGCTCATCTGA GGCTCAGT	GGGGCCTCAGC ACCCTCA
2FH21 F_18_4 _09	21	14305 214	R	A	101	18	14137 265	F	G	101	TGCTCATCTGA GGCCTCAGT	TAACAGGTGTT TCCAGTTGC	GGGTGCTGAGG CCCCCAGTGAG
2FH21 F_18_4 _12	21	14305 608	R	C	96	18	14138 938	F	C	96	TGCGGAGATC AACTTCAAC	TGCCTGCATG ACCCCGCAC	TGCTCACAAC GTCCTC
2FH21 F_18_4 _14	21	14305 697	R	G	101	18	14138 849	F	G	101	TTCGAGGCG CTCAGGCGG	TCCACAGAGG GGCCTCTCC	CCAGCCCGACC GCACAGGCCCA
2FH21 F_18_4 _15	21	14305 767	F	C	108	18	14138 779	R	A	108	AGGCCCTCTG TGGAGCTA	GCTTAGTTTCA GATGTGGGC	GCCATGGGCTG GAGGGCATGAT GGG
2FH21 F_18_4 _17	21	14305 947	R	A	115	18	14138 603	F	C	115	GCCTTCACTG GGCAGCAC	TGAGGCCTGC TGCAGCGAC	CATCCAGCACTT TGATGA
2FH21 F_18_4 _19	21	14306 173	R	T	110	18	14138 378	F	G	110	GTCTGCAAGC ACTGGCG	AGAATGCCCT GAGTGAGGAG	TCCAGGCCTCA GCTCCG
2FH21 F_18_4 _27	21	14306 777	R	A	115	18	14135 780	F	C	115	TGGTGTTGTC CACCTAGT	GCTGGGGTGG GCATCAGG	CTGGGTGGGC ATCAGGCCTGT G
2FH21 F_18_4 _28	21	14306 802	F	A	88	18	14135 755	R	C	88	CCTAGATGTC GCCGTGAG	CACAGGCCTG ATGCCAC	CTGATGCCAC CCCAGC
2FH21 F_18_4 _29	21	14306 814	R	C	88	18	14135 743	F	C	88	CACAGGCCTGA TGCCCCACC	OCTAGATGTC GCCGTGAG	CGTGAGGGTGG AGGCCAG
2FH21 F_18_4 _30	21	14306 846	R	G	99	18	14135 711	F	T	99	AAGGAGAGGGG TCTTATCAG	CCTCCACCT CACGGCTGA	CACGGCTGACA TCTAGG
2FH21 F_18_4 _32	21	14308 875	R	C	98	18	14135 682	F	A	98	ACCTCAGGCG TGACATCTA	GGGTAAGGAG AGGGGCTCT	GAGAGGGGTCT TATCAGCC
2FH21 F_18_4 _34	21	14307 076	R	G	117	18	14135 479	F	T	117	ACGTCCCAGAT AGGAGGAAG	AGGACCCGAT CCAACAGAGA	GCAGCTCACCA AGCACAC
2FH21 F_18_4 _35	21	14307 099	R	A	118	18	14135 458	F	C	118	TCATCCTTGAG GCCAGGAG	ATGCCACTGC OCTGTCTAT	CCAGGACCGCA TCCACAGAGA

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_18_4 41	21	14307 877	R	G	118	18	14134 766	F	T	118	TTTCTGCTGGTA ACAAATG	GAGGACAGGG TCAGTCCCG	CACTTCTCTGACA CGGCCCG
2FH21 F_18_4 46	21	14308 106	F	T	92	18	14134 537	R	C	92	TCTGTCAGAGG CCTAGCCCT	TCCCACTGAC CCCAAGGAG	GCTGGGCTCAG GCCTTA
2FH21 F_18_4 57	21	14311 562	R	A	104	18	14131 075	F	C	104	TGACACTGGGC ATAGTGTGG	CAGAGCAAGC CCCTTAGATG	CCCTCCTCTGTA CCTTGG
2FH21 F_18_4 59	21	14311 633	R	G	101	18	14131 004	F	T	101	TGGGATCATG GCACAGG	TCCAGGCTGC GTTCAAGTTC	TCAAGCACCTC ATTCTC
2FH21 F_18_4 60	21	14311 656	R	G	118	18	14130 981	F	T	118	TGATGACCTCAA ACCTCCG	TTGGGATCATG GCACAGG	GAGATGAGGT GCTTGATGATG
2FH21 F_18_4 61	21	14312 314	F	C	103	18	14130 330	R	A	103	TCCTTGTTCGT GGGTAGTG	GCAGTTTAAAC CACCATTTC	CCACATTTCTG TGAAGCTTTCT
2FH21 F_18_4 62	21	14312 342	F	C	92	18	14130 302	R	A	92	TGCTGTGTACCA GGTACTAC	GTGCAGCACA GAACAACGC	CTTTGTTCTGG GTAGTGT
2FH21 F_18_4 63	21	14312 574	R	G	80	18	14130 070	F	A	80	CTGATTATCTTT TCTAAGC	AGTCTTAACCTG AAAGACAGA	GAAAGACAGAC AAGAACATCTTA
2FH21 F_18_4 66	21	14312 692	F	T	117	18	14129 952	R	G	117	AATCTGGGTTTC CTTGAGGG	TTAGCAACTGA CTGTGATA	AACCTGACTGTCA TAAGAGAT
2FH21 F_18_4 67	21	14312 732	R	C	114	18	14129 912	F	A	114	GCAACTGACTG TCATAAGAG	AATCTGGGTTT CCTTGAGGG	GGTTTCTCTTG AGGGCTAAGAT TACT
2FH21 F_18_4 68	21	14313 209	F	C	118	18	14129 421	R	A	118	GGAGAATCTG AGAAAGTAGC	ATAAGGTGAG GCTTGGGCTG	GGATGCAGTTC TGGAAACAAGA
2FH21 F_18_4 69	21	14313 390	R	G	100	18	14129 240	F	T	100	AGCTCTTAGTTC CTCCAGAC	CCTCCCTGATG ATGAATGGC	TGAATGGCTCAT CCAG
2FH21 F_18_4 70	21	14313 610	F	T	100	18	14129 020	R	C	100	GCAGCCCAGAT CTTGTTAC	CCTCAGAAATA GCATGCAGG	TGAAGTGGTGG TGGTTG
2FH21 F_18_4 72	21	14313 630	R	T	109	18	14128 800	F	G	109	TCCTAGACTCTT TCCTGTGG	ACCTGAATGTG CATGGGAAG	GAATGTGCATG GGAAGGTTCTG GAAT
2FH21 F_18_4 74	21	14313 944	R	A	120	18	14128 688	F	C	120	TGAGATTGAGTT CGCTCTG	CAAGGCTTGG GTAAGAAGGG	TGGCATTTCAGA GAGCAT
2FH21 F_18_4	21	14314 051	R	A	115	18	14128 579	F	A	117	AAGGACACCTG ACAAGATAG	AAGAAGACCC CTTCTACCC	GGATAAAAAAG CAAGACTCT

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
75													
2FH21 F_18_4_76	21	14314 089	F	T	101	18	14128 541	R	T	99	AGAATCAGAGT CCAGCTCAG	CTGCTCTATCT TGTCAGGTG	TCTTGTCAGGT GTCTTGAAATT
2FH21 F_18_4_80	21	14314 502	F	G	102	18	14128 129	R	T	102	GACCCACAAAT ATGAGTCAG	TAGTGGAATA GGGAGTTCGG	TAGACCCAGAG TCCCAT
2FH21 F_18_4_81	21	14314 586	F	C	104	18	14128 045	R	A	104	GGAAATGGATT ACAGCCCTC	CGTCAAAAGT GAGTGGGAAG	GAGTGGGAAGA ATACAGT
2FH21 F_18_4_82	21	14314 685	F	C	119	18	14127 936	R	C	119	GGGCTGTAATC CATTCTCTG	TATGAAGGTTG CAAGAGGG	GAAGGTTGCAA AGAGGGGTGGA AT
2FH21 F_18_4_83	21	14314 743	F	C	108	18	14127 888	R	A	108	TCTCTTCCATT CCAGTGA	CACCCCTCTTT GCAACCTTC	AACAGCCCAAG GTCTTAC
2FH21 F_18_4_85	21	14314 908	F	C	103	18	14127 723	R	A	103	GTGTAAGAGAG AGGACCTTT	TGGATGGAG GCACAGTGAG	ACAGTGAGAAAT TTGGTCTG
2FH21 F_18_4_90	21	14315 928	R	A	99	18	14126 706	F	C	99	TCCCTTGAATGT TGAAGGA	ATTGAGTTAGC ACTGGCTCC	GCAGTGGCTCC AATCTGATCAAT T
2FH21 F_18_4_91	21	14316 557	F	T	119	18	14126 077	R	G	119	AGAGCCAGTTTT GCATTAC	GGAACAAAGG CAAGATGAG	CACCTGTCAAC AAGACAC
2FH21 F_18_4_94	21	14316 694	R	C	95	18	14125 936	F	T	99	TCAGATGGGT CTGAGTTTC	CAGGCAAGAG GTCTTCCAG	TCTTCCAGATT CCCCA
2FH21 F_18_4_97	21	14317 060	F	C	99	18	14125 570	R	A	99	CATGGGCTAAG CCATGTAAG	GTTCCTCATC TTTCCCTTC	TCCCTTCTGAGA AGTCTA
2FH21 F_18_5_01	21	14318 861	F	C	98	18	14123 660	R	A	98	CACATTACAGGA GCAGCTATG	CAGGCTGAGG AATACATTGG	GGAATACATTG GCTGTATGTGAT TTT
2FH21 F_18_5_02	21	14319 138	R	G	90	18	14123 483	F	T	90	CTAAATCAAAT ACTGTGCC	TCAGCAGCTGT GTCTTTATG	CTTGCCTTCAA GCAAAAG
2FH21 F_18_5_03	21	14321 397	F	T	112	18	14122 673	R	T	113	TGGCTCCAGT CACTTTCAG	CCTTCATAACG TTATACACC	ATACACCACAT GCTAAAAA
2FH21 F_18_5_04	21	14321 408	R	T	112	18	14122 661	F	G	113	CCTTCATAACG TATACACC	AGGGCTTTCT GTCTGTGCTG	TCTGTGCTGGG CCTGGCTCT
2FH21 F_18_5_05	21	14321 469	R	A	96	18	14122 600	F	A	96	TGAAAGTGACT GGAGCCAAAG	TGCGTGTGAC AAGATGCTAC	ACGGAATGAGC CGAGAGTG

Marker_J D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS_E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS_E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_18_5 06	21	14321 489	R	A	98	18	14122 580	F	C	96	TGGGTGTCAGA AGATGCTAC	TGAAAGTGACT GGAGCCAAAG	CTCTCGGCTCA TTCCGT
2FH21 F_18_5 08	21	14321 836	F	A	117	18	14122 233	R	C	117	ACTCGCAGACT AGGTCCCGT	CGAGAAATGG TGAGTGTGGG	CCGAGACTGGG GAGGGG
2FH21 F_18_5 09	21	14321 892	R	C	111	18	14122 180	F	C	108	ACGGGACCTAG TCTGGGAGT	TGCAGGGACA GGACAGGAG	GAGGGGACTGA GGGCTGAGCTG CAGA
2FH21 F_18_5 10	21	14322 704	R	A	98	18	14121 367	F	C	98	CTTGCTGACATT CCCCAAG	CTGAAATGTGC ATAAAGG	ATGTGCAATAAA GGACAAAA
2FH21 F_18_5 11	21	14322 742	F	T	92	18	14121 329	R	C	92	CAAAATGCCATC CACTGCTC	GTCTTTTATTG CACATTTCAG	TATTGCACATT CAGAAACAGTAT TT
2FH21 F_18_5 12	21	14322 792	F	G	105	18	14121 279	R	T	105	GAGCAGTGGAT GGCAATTG	AGTGCAGGG GATTATTTTC	ATGTGAAATATT TGTAAGTAGAAA A
2FH21 F_18_5 13	21	14322 852	R	G	105	18	14121 219	F	T	105	AGCAGAAATAA TCCCTGG	TAAGGGCGTTT GTGCTAAGG	AGAAACAGCAG AAAGATTTTAA CAG
2FH21 F_18_5 15	21	14322 938	F	C	109	18	14121 133	R	C	109	AGCAGAAAGC CCTTATTAG	CCGAATGTGG CTAAGGAAAC	AAACATTGCCC CATAAAGTTTCC CAA
2FH21 F_18_5 16	21	14323 047	R	C	100	18	14121 024	F	T	100	GATGGCCCAAG ATACAAACC	CTGGAAGATTAA CCAAAGGGC	TATTACACAGAA CTCCAAAA
2FH21 F_18_5 17	21	14323 089	F	T	100	18	14121 002	R	C	100	TGTGCTCTCTG GAAGATTAC	GCCCAAGATA CAACCAGAG	TTTGGGAGTTCT GGTGAATA
2FH21 F_18_5 18	21	14323 100	F	A	92	18	14120 971	R	G	92	CATTGAGCTGCT CCTTTGAG	CAGCCCTTTG GTAATCTTCC	ATCTTCCAGAG GACACA
2FH21 F_18_5 19	21	14323 115	R	A	105	18	14120 956	F	C	105	GGTAATCTTCCA GAGGACAC	GATATTTCTCT CACCCCCAG	CTGCTCCTTTGA GAAGCTG
2FH21 F_18_5 20	21	14323 420	R	G	103	18	14120 854	F	G	103	AGTGCAAGAAC CTGCAAGC	TCACTGAAGTG CTCAATGCC	CTGCACTGTGC CCCACT
2FH21 F_18_5 21	21	14324 503	F	C	100	18	14119 577	R	A	100	CAGAAGAAAGA CATCACTGG	TGTGTGCAGA ACAAAGCCTC	TTCCCTCAGACA CCTGGAGTCTC CTT
2FH21 F_18_5 22	21	14324 706	F	A	99	18	14119 374	R	G	99	GTAAACCTTTGT CGTGGGAG	CCTACATGCTT CTAACCCAC	ACCCACTCCTG AACATA
2FH21 F_18_5	21	14324 731	F	T	118	18	14119 349	R	G	118	CTTCTAACCCAC TCTGAAAC	AAGCTGTTGTG AGCACAATT	GTAACACTTTGT CGTGGGAGGA

Marker_D	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
23													
2FH21 F_18_5_24	21	14324 792	F	A	94	18	14119 288	R	A	94	TAAGCCAGGAG TCTCTAGG	TGTGCTCAGAA CAGCTTTC	CAGCTTTCTCC TAGAG
2FH21 F_18_5_25	21	14324 801	R	G	94	18	14119 279	F	T	94	TGTGCTCAGAA CAGCTTTC	TAAGCCAGGA GTCCTTAGG	GCACCTGTGTA TGTTCT
2FH21 F_18_5_26	21	14324 841	F	A	89	18	14119 239	R	G	89	CAGGTGCGGA TAGAGATTC	CATACACAGGT GCCTAGAAG	AGACTCCTGGC TTATCT
2FH21 F_18_5_27	21	14324 931	R	G	118	18	14119 149	F	T	118	TGCTACAGATAC AGGCTCAG	ACCCAGGTTTC TTGGACTAC	ACCTGATCATAA TCTCTTCTGATT GT
2FH21 F_18_5_29	21	14327 004	F	T	105	18	14117 104	R	G	105	CAGAGCCATAA TCACAACCTG	AGCTAAGTCTG AGGTAAGGG	ACTCTACTCCAC TAACAGTTTACA
2FH21 F_18_5_30	21	14327 071	R	C	86	18	14117 035	F	C	88	TGTTCTTCCCT TACCTCAG	CAGATDCCGA ATCTAGCTGT	AGATCCCAGAT CTAGCTGTAATA TCCC
2FH21 F_18_5_34	21	14327 453	F	A	102	18	14116 663	R	G	102	GACCATGACTG CTTCATCTC	GATCTGGAGA CTCAAACTGG	GGAGACTCAAA CTGGTCAATAA GCTA
2FH21 F_18_5_35	21	14327 664	R	A	104	18	14116 442	F	A	104	TTGATGCCACC AACTGAAGG	AATATTATTC TTAGCAAGG	AATAATAACTTC TCTCTGTCC
2FH21 F_18_5_36	21	14327 693	R	G	112	18	14116 413	F	T	112	ACCTTACGTTT TCCTAGAG	GGACAGAAGA GAAGTTATT	ACAGAAGAGAA GTTATTATTGT ATT
2FH21 F_18_5_37	21	14327 880	R	A	90	18	14116 226	F	C	90	TTGGGACAGAT CTCCATGC	CAGATTCTCT TGGTCAGGC	GCITAGAAAAG ATAAACTGAAA
2FH21 F_18_5_38	21	14327 930	R	A	103	18	14116 176	F	C	103	TTTCAGTGTGG GATCAGACC	CATGGAGATCT GTCCCAACC	GCGCAGATCCA CCCTCT
2FH21 F_18_5_39	21	14328 545	F	T	105	18	14115 563	R	G	105	GCTCATTTTGA CAGATGGAG	TTCTTCACAAG TCTCAAAG	GAATTGCAGTTA ACAGTTCTTTTC
2FH21 F_18_5_43	21	17841 257	R	G	111	18	14469 188	F	G	111	CCAGAAGTTTG AGTATCAC	GGACTAAGCG TAAATTTGC	TTCCCTTTGG CTTTTCAATCA TCT
2FH21 F_18_5_45	21	25676 417	F	A	102	18	13654 900	F	G	99	CTATTTCAAGTC TAACCCCT	GCAGATAAGT CAAAACAAGG	TCAAAACAAGG ACAATCTAA
2FH21 F_18_5_48	21	28391 001	F	T	111	18	15073 195	R	G	111	GAGACATATAA GGAATAA	GTTTCAAAACC AACATGGTA	AAAGCAACATG GTAAATCTAAA TA

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_18_5 49	21	28291 458	F	C	96	18	15072 736	R	A	96	CCTCTGACAAA AGAGGAGC	GAGGTCTTGG CCTTATCAC	GTCCTTGCCCTTA TCACCACCATT
2FH21 F_18_5 55	21	28308 411	R	G	104	18	15055 759	F	G	104	CAAGGAATTTAG AAATGC	AAGTTCCCTGT AGAAAGAG	TTCTGTAGAAA GAGTTAAAGTG AAT
2FH21 F_18_5 65	21	28318 201	F	T	96	18	15046 074	R	G	96	TCACATTTACCA ACTACTG	TTCTACATTCC TGGCCTGAG	AACAGAAGTAC CTTTGCTTAT
2FH21 F_18_5 66	21	28318 283	F	G	119	18	15045 982	R	T	119	AATGTCAGGTT GTTGACTGC	TTAGATATGGC TGAGAAGTG	ATATGGCTGAG AAGTGGGGTGA
2FH21 F_18_5 67	21	28318 296	R	C	117	18	15045 979	F	T	117	AGATATGGCTG AGAAGTGGG	AATGTCAGGTT GTTGACTGC	TAAGTTAAAGTG GGTCAGGT
2FH21 F_18_5 70	21	28318 429	F	A	100	18	15045 847	R	A	99	GACAGGAGCTC TATATTTA	CATACAAGTAA AGAACCCA	CTAACCTGCTAC CTACCTT
2FH21 F_18_5 71	21	28318 455	R	A	94	18	15045 821	F	C	94	CTAACCTGCTAC CTACCTT	TGAAGTTATAA ATCAGTAAG	GTTATAATCAG TAAGAAACAGG A
2FH21 F_18_5 74	21	28318 711	F	G	114	18	15045 585	R	A	114	TCTCTCTGTAAG ATGTGAAG	ATGGAGAGAT GGCAAGTGAG	GCTGAGGAACA CAGCTCCCTTAT G
2FH21 F_18_5 76	21	28318 759	R	T	95	18	15045 517	F	G	95	TCTTCACATCTT ACAGAGAG	GCTGACAGCA TCAGCTTTAG	AACAGATTAGAT TCCATGTAACTA
2FH21 F_18_5 77	21	28318 824	R	G	89	18	15045 452	F	T	89	CTACTAAAGCTG ATGCTGTC	CTCAAAATGTG TCTACAAGC	GTGCTACAAG CATAATGAA
2FH21 F_18_5 79	21	28318 862	R	A	111	18	15045 414	F	A	111	CTGTCAGCTGC CATGCTTAG	ACCTTCTTAGA AGTTTCTC	CTTCTTAGAAGT TTCTCTTCTAGA T
2FH21 F_18_5 83	21	28319 085	R	T	115	18	15045 191	F	G	115	CTTGGTAATAT ATATAGTG	GAGCACTATGT ATTGTTTC	ACTTGCTTGCAT CATACAT
2FH21 F_18_5 85	21	28328 803	F	T	120	18	15040 341	F	C	117	TGAATGTCTTCA GGGTGAGG	CTGAAGGAGA AGAAGGGAAC	ACTTCCTCCCT GAGTC
2FH21 F_18_5 90	21	28349 711	F	G	80	18	15014 464	R	G	80	AAACAAAGCCTT TGAGACC	ACAACATACTC GTATCTCC	CGTATCTCCTGA AATCCTG
2FH21 F_18_5 94	21	46813 934	F	G	94	18	95365 8	F	A	94	AAACATTTTAA TGCACCTC	GTATTGAAAGG TCAGTGGTG	CAGTGGTGGTA AGACAA
2FH21 F_19_0	21	31210 897	R	G	117	19	53404 855	R	A	117	AATTTTCATCTA TTCTCAAG	CTTTTATATCC TTCTCATGT	AATTCATATGCT TTGCTACTC

Marker_I D	CH R_1	Marker POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP LEN_1	CH R_2	Marker POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
04													
2FH21 F_19_0 05	21	31210 922	F	T	120	19	53404 880	F	C	120	CCAGGAGGGCT TCAAAATAAG	GAGTAGCAAA GCATATGA	GTAGCAAGCA TATGAATTTTA
2FH21 F_19_0 06	21	31210 930	R	A	120	19	53404 888	R	G	120	GAGTAGCAAG CATATGAA	CCAGGAGGCC TTCAAAATAAG	AACITTTATATC CTTCTCATGT
2FH21 F_19_0 07	21	31210 962	F	C	120	19	53404 920	F	T	120	CCAGGAGGGCT TCAAAATAAG	GAGTAGCAAA GCATATGAA	GAAGATATAAA AGTTTGTCTTCT
2FH21 F_19_0 10	21	32791 147	R	C	89	19	77851 66	F	A	99	GCAACTAAAG AAACAGACC	CCATGCTTTTA TTAGCAACC	GCCATAGATGA GATCTCCAACCT
2FH21 F_19_0 12	21	33743 482	R	C	80	19	57303 531	R	A	80	TCATCAACAAG ATGGTAT	CAGAGTATGAA GCAGTTG	AGAGTATGAAG CAGTTGTGGAG
2FH21 F_19_0 14	21	33743 785	R	T	119	19	57303 833	R	C	119	ACTGCAAACTCA GTAAAAGG	GCTTAGCTCT CAAGCTTG	TCAAGCTTTGG GTGAAT
2FH21 F_19_0 15	21	33743 831	R	G	115	19	57303 881	R	A	117	CCAAAGCTTGA GAGCTAGAG	TCCCAAAGGG AATTATCACC	GCATTTTCATCTA CTCAGTTAC
2FH21 F_19_0 16	21	33743 853	F	A	115	19	57303 903	F	G	117	TCCCAAAGGGA ATTATCACC	CCAAAGCTTGA GAGCTAGAG	GTAACGTAGTA GATGAAATGC
2FH21 F_19_0 18	21	33743 924	F	A	120	19	57303 974	F	T	120	TTCATAGCAAG CAAGTTT	ATTCCCTTTGG GAAGAAGTG	ATCTTTAATTAT TCCACCTTTTGT
2FH21 F_19_0 22	21	33744 128	F	C	117	19	57304 180	F	T	119	AGAATTCCTCTA ATATGAC	GCTGCCCTTACA CAGTCTTTT	GTTTATTGTATC ATGTATTATCCC
2FH21 F_19_0 26	21	33744 255	R	C	83	19	57304 303	R	A	82	CTTCTTCAATAC ATAAGAAC	TTTGGCCTAAA AATGAGGT	TTGGCCTAAAA TGAGGTTTTTTT
2FH21 F_19_0 27	21	33744 288	F	G	83	19	57304 334	F	A	84	GAGCACTGAGC CATAAAAGG	AAAACCTCAT TTTTAGGC	AAOCTCATTTT AGGCCAAAATA
2FH21 F_19_0 28	21	33744 302	R	A	87	19	57304 351	R	T	88	CCTCATTTTATAG GCCAAAATA	GAATGAGCAC TGAGCCATA	AATGAGCACTG AGCCATAAAG
2FH21 F_19_0 30	21	33744 768	F	A	118	19	57304 825	F	G	114	TTTTTCATTTGCA TAGACTG	GATCAAGTTTCT AAATCTCAGG	AAGTTCTAAATC TCAGGAATAAAA
2FH21 F_19_0 31	21	33761 256	F	T	106	19	57305 651	F	C	102	GTITTTTACAGG CTGGTGG	CACATGTGTGA AAGGCATGG	ATGGTTCAACTG TTCTGGC

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Mar_ker_1	AMP_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Mar_ker_2	AMP_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21_F_20_0_03	21	10014 053	F	T	109	20	51652 429	F	C	109	AGAAGGATAGG ATTGTGAG	GTTCTACGCTA GAAATCAAC	TAGAATCAACT TTCCTTCTATGC
2FH21_F_20_0_04	21	10014 083	R	G	109	20	51652 459	R	A	109	GTCTACGCTA GAAATCAAC	AGAAGGATAG GATTTGTGA	GGATAGGATTT GTGAGATTTA
2FH21_F_20_0_05	21	10014 138	F	C	98	20	51652 514	F	T	98	AAGAAGAACATG GGTGGTGAG	TCTCAGAAATC CTATCCTTC	CTGAATGTATG TACCCCTTTC
2FH21_F_20_0_07	21	10014 203	R	C	105	20	51652 579	R	T	105	TCACACCCCAT GTTCTTTG	TGGACTAGAAA GAAGGCAGG	AAGAAGGCAGG TACAGGAG
2FH21_F_20_0_08	21	10014 238	F	G	100	20	51652 614	F	T	100	TCACACAAAGC AGTAGCAGG	TCCTGTACCTG CCTTCTTTC	CCTGCCCTTCTT CTAGTCCAGAAT AC
2FH21_F_20_0_09	21	10014 255	R	C	100	20	51652 631	R	T	100	TCCTGTACCTG CCTTCTTTC	TCACACAAAGC AGTAGCAGG	CAGTAGCAGGA TGGTTATT
2FH21_F_20_0_10	21	10014 324	R	G	119	20	51652 700	R	A	119	GGGACCATGGT GTGGTTTTG	TCCTGCTACTG CTTTGTGTG	AATTTACTTTT CCAAAATAAGTC A
2FH21_F_20_0_11	21	10014 342	R	A	118	20	51652 718	R	G	118	CTGCTTTGTGTG AAATCTCC	ATTGGCTGGG ACCATGGTGT	ACCATGGTGTG GTTTTG
2FH21_F_20_0_12	21	10015 428	F	C	109	20	51653 799	F	T	109	AGGTGGTTAC AGTTGTATG	TGCTCTATTCT GACTGCCTG	CTCTATTCTGAC TGCTGCACCC CTC
2FH21_F_20_0_13	21	10015 493	F	G	89	20	51653 864	F	A	89	GAGAGTAACTG AAGGAGGTG	AACATCAACCT GTAACCAAC	CCTGTAAOCAC CCTAATC
2FH21_F_20_0_14	21	10015 509	R	A	88	20	51653 880	R	G	88	ACATCAACCTGT AACCACCC	GAGAGTAACT GAAGGAGGTG	AGTAACTGAAG GAGGTGGCAIT T
2FH21_F_20_0_15	21	10015 560	F	A	106	20	51653 931	F	G	106	AGAAATAACATA CCCAGGGC	CACCTCCTTCA GTTACTCTC	CTTTGTTCATG CCTCCTTTAT
2FH21_F_20_0_16	21	10015 572	R	A	106	20	51653 943	R	G	106	CACCTCCTTCA GTTACTCTC	AGAAATAACAT ACCCAGGGC	CCCAGGGCCTAG GCATAA
2FH21_F_20_0_17	21	10015 607	F	C	98	20	51653 978	F	T	98	AGGAACTGGT CTTCCCTTG	TATGCTAGCC CTGGGTATG	CCTGGGTATGT TATTTCTCTAC
2FH21_F_20_0_18	21	10015 518	R	T	98	20	51653 989	R	G	98	TATGCCCTACCC CTGGGTATG	AGGAACTGG TCTTCCCTTG	TCTTCCCTTGGG AGAGCCTCCCC
2FH21_F_20_0	21	10016 927	F	T	116	20	51655 279	F	C	116	TTCAGCAAGG AGAGAGAOC	ATGGCCGGGC TCGGTTAGT	GCTCGGTAGT AAGTGG

Marker_I D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
20													
2FH21 F_22_0 12	21	10131 022	F	G	120	22	41759 869	F	A	120	GTGTTAAACGG GGTTTGAGC	GTAGCGTGCG CTTTCTGAAC	GCAGTTACCTC CTTCTAC
2FH21 F_22_0 16	21	10131 733	F	G	100	22	41760 983	F	C	101	TCAGCAGGAAC AAGTCTAGG	GAATGTTGGC CAAGTGCAG	AGGGTGGGCCT GGGCCTGAGGG AA
2FH21 F_22_0 17	21	10131 740	R	A	100	22	41760 991	R	G	101	GAATGTTGGCC AAGTGGCAG	CTCTGTCAGCA GGAACAAG	TCAGCAGGAAC AAGTCTAGGGG
2FH21 F_22_0 18	21	10131 768	F	T	100	22	41761 019	F	C	100	CTCCAGTGACA GATGCAAC	CCCTAGACTTG TTCTGTGCTG	AGACTTGTTCCT GCTGACAGAG
2FH21 F_22_0 19	21	10131 932	F	A	115	22	41761 183	F	G	115	TGAGGACCCCTT TGTGAGCAG	GGGCAATCA GTGAAGATCA	GTGAAGATCAA AATCCCTC
2FH21 F_22_0 21	21	10132 070	F	A	104	22	41761 321	F	G	104	TCCTCTGCAGG GCCCTGCCT	GACACACAAA CAGCCTGAG	GCCTGAGGGTG CCCAGTC
2FH21 F_22_0 25	21	10132 318	R	C	108	22	41761 569	R	T	106	ATGGTGTGTGG CACTGTGAG	TCCACACAGT GGTCTTCAG	AAGCCTCCTAT GCTTGCC
2FH21 F_22_0 26	21	10132 343	F	T	108	22	41761 594	F	G	108	CCTCCACACAG TGGTCTTC	ATGGTGTGTG GCAGTGTGAG	GGCAAGCATAG GAGGCTTTATG GA
2FH21 F_22_0 28	21	10132 521	F	A	90	22	41761 775	F	G	90	ATCCTTCACCTC CITTTGCAC	AGTGAGAAGG TTGTACCAG	TCACCAGGCC TCACTAATACCC
2FH21 F_22_0 29	21	10132 527	R	A	90	22	41761 781	R	C	90	AGTGAGAAGGT TGTCAACCAG	ATCCTTCACCT CCTTTGCAC	CTCCTTGCACA CGGGCT
2FH21 F_22_0 30	21	10132 914	F	A	103	22	41762 133	F	C	102	GGTCCCAGGCC AGAGGGTT	GAGGATGGGT TTATATTG	GGATGGGTTTA TATTGGGAAA
2FH21 F_22_0 35	21	10133 104	R	G	111	22	41762 322	R	T	111	TGTTCTGGGCC CGACAGCCT	GGGCAGATGT TTCTCTGA	AGGGTGGCGGTG TTGGCAGC
2FH21 F_22_0 36	21	10133 131	F	T	80	22	41762 349	F	C	80	GGGCAGATGTT TCCCTCTGA	CTGCCAACAC CGCACCCCTT	AACACCGCACC CTTCCCACC
2FH21 F_22_0 37	21	10133 227	F	G	101	22	41762 445	F	A	101	GTGGTTAGTTG CTGGTGAC	GAGACAGTCA CTATATGACA	ATGACATAAATC CACTTAGC
2FH21 F_22_0 40	21	10133 361	F	A	106	22	41762 579	F	G	106	GCTCTTCACCC GGTTTTTAC	AACCAGGGAC TCCACCCCTC	GACTCCACCCCT TCTCCAGAG

Marker_ID	CH_R_1	Marker_POS_1	SE_NS_E1	Marker_LEN_1	CH_R_2	Marker_POS_2	SE_NS_E2	Marker_LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
2FH21 F_22_0_42	21	10133 484	F	93	22	41762 702	F	93	CTCTGGCGAGC CCTCTTAC	TGAGGAGCC GAGGTGGAG	GGTGAGCCGC CAGCTGT
2FH21 F_22_0_43	21	10133 506	R	97	22	41762 724	R	97	TGTAGGAGCGG AGGTGGAG	CTGGCTCTGG CGAGCCCT	TCTGGCGAGCC CTCTTACC
2FH21 F_22_0_44	21	10134 693	R	119	22	41763 868	R	119	TGTGGGCAATT GGGAGAAC	CTGAAGTTTCA CTCGCTGTC	TTAAGGCTTGGC ACCTGTTTTGT TG
2FH21 F_22_0_47	21	10136 147	F	110	22	41765 342	F	110	ACAAACAAATC TTATAGAC	CAGTCAAGTAA AAAGAAACGC	GAACGCAACT AAAAGAGC
2FH21 F_22_0_48	21	10136 171	F	97	22	41765 366	F	97	ACAAACAAATC TTATAGAC	AGAAACGCAA CTAAAGAGC	TCAGTTAAATAC ATTCCTCTCT
2FH21 F_22_0_51	21	10136 258	R	119	22	41765 459	R	119	TTAATGTTTAA ACCTTGTC	TAACTAAGCA GAATTTTC	TTGACAGAAAG TAACAGCTTCA
2FH21 F_22_0_55	21	10136 453	R	113	22	41765 655	R	113	TAACCTTCCAAA GAAGTGCC	CTGCTGAAGC CCTATTTTG	AGGCTATTTTG AAATTTCCCTTT T
2FH21 F_22_0_56	21	10136 486	F	109	22	41765 688	F	109	TCACCACCTGG AAGTGAGTC	GGGAAATTTCA AAATAGGCG	GAATTTTCAAAA TAGGGCTTCAG CAG
2FH21 F_22_0_57	21	10136 520	F	102	22	41765 722	F	102	TCAAAATAGGG CTTCAGCAG	CTCACCACCT GGAAGTGAGT	CCTGGAAGTGA GTCCCAACC
2FH21 F_22_0_59	21	10136 569	R	115	22	41765 772	R	115	ACTTCAGGTG GTGAGGAC	CTGACCGGGA GCTGAGAAG	GGCCAGAGCA GGCCGAT
2FH21 F_22_0_61	21	10136 684	F	84	22	41765 887	F	84	TGGCCCTGGCT GTTGGCTT	TACTGGAGA CAGAAACAGC	GAGACAGAAAC AGCAGGATCA
2FH21 F_22_0_62	21	10136 700	R	98	22	41765 903	R	98	TACCTGGAGAC AGAAACAGC	CACACAGCAG CCTGGTGG	GCCTGGTGGCC CTGGCTGTTGC CTT
2FH21 F_22_0_67	21	10168 905	F	115	22	15875 490	F	116	CATGGACCTTC CAGCTTATG	TTCTCTCCTTC TATAATGGC	TTCTCTCCTTCT ATAATGGCTTAT TTT
2FH21 F_22_0_68	21	10169 081	R	111	22	15875 667	R	111	GCCAACAATTAT GAAGGCAG	GGAATATCTCC TTGGCCTTC	GAATATCTCCTT GGCCTTCTCTAT CTAA
2FH21 F_22_0_73	21	10169 966	F	109	22	15876 544	F	110	TTGGGGGCTTTT TCCCAAGG	AGGACCCACC CTGGCTCTCA	TCAGCGGAGA GCAGGGA
2FH21 F_22_0	21	10170 094	F	112	22	15876 672	F	112	ATCAGGAGCT GGTGGTCTCT	TATTGGAGGT CCGCATGAG	CCCTGCTGCAC TCACTC

Marker_J D	CH R_1	Marker _POS_1	SE NS E1	Mar ker_1	AMP _LEN_1	CH R_2	Marker _POS_2	SE NS E2	Mar ker_2	AMP _LEN_2	PCR1	PCR2	Extension
74													
2FH21 F_22_0 75	21	10170 089	R	A	83	22	15876 677	R	G	83	TGGTCCCTGCT GCACCTCAGT	TGCTCGATGCT CACCACATCAG	TCAGGAGCTG GTGGTCTCTT
2FH21 F_22_0 76	21	10173 355	R	G	102	22	15879 914	R	A	102	TCAGGTATGGTT TTGCTGGG	TTTACCACAGC TATTCGCC	GCTATTCCGCT AATCCTA
2FH21 F_22_0 77	21	10173 724	R	A	101	22	15880 283	R	G	101	GTTTGAACCCA CTCTTCCTG	GGTCCAGAAA TAGCTACAGG	CAGAAATAGCTA CAGGAGAAGA
2FH21 F_22_0 78	21	10173 774	R	A	106	22	15880 332	R	C	105	CTGTAGCTATTT CTGGACCC	TTCTTGCCTG GATGATTTC	TTCTCTTTCTC CTCCC
2FH21 F_22_0 79	21	10173 857	F	C	100	22	15880 415	F	G	98	AAGTAGCAAAAT CAGCTTC	AGAAAGCAGA GGTTTAGGAG	TTAGGAGAAG AAAAAGAAGAG A
2FH21 F_22_0 80	21	10175 430	R	A	118	22	15881 989	R	G	119	GAGATTGCTTG CCAATAGG	GTCTCTCACC CTTCATTT	TTATTTCTCTT GAGTACACTCTT A
2FH21 F_22_0 81	21	10175 471	F	A	118	22	15882 030	F	C	119	CTGTCTCTCACC CCTTCATT	GATTGCTTGC CAATAGGAG	AGAAAGAAATAA CATTTCTCTGTA TA
2FH21 F_22_0 82	21	10175 474	R	G	118	22	15882 034	R	T	119	GATTGCTTGGC AATAGGAG	CTGTCTCTCAG CCCTTCATT	TCACCCCTTCAT TTTAATTTA
2FH21 F_22_0 85	21	10176 077	F	C	99	22	15882 635	F	T	99	CCAATGAATGTC CTCATCAG	GCAGCGTGAT TCCTATGAAG	GAAGAAGGCAT CTCTGGATAATG A

La tabla 4B muestra la secuencia de nucleótidos común para cada ensayo y un emparejamiento erróneo entre corchetes entre la especie con la primera secuencia de nucleótidos y la especie con la segunda secuencia de nucleótidos

[illegible]

[illegible]

Marke r ID	Secuencia genómica común
	TGAGTGTCTCTCTCAGGATCATTATGGAGGRTCAGCCCATAGTCAC CAAATGGGGTNGTCTGACTCAAGGTTTAAITCTGCCCATTTAGAGG TTGTACCCAGATGGGAGTTCTCAGITTTCTGGTCTTGGTGAAGAT TTAGAAAAGAGATGAAGCAGTATGGTCCCTACCACTGAAGAGCTG GAAGGTGTAGAGGAGACTTAAGCTTCATTTGGGTCACATCCCTGTT ATTNTTTTACCTTGTAGAAATAATTTACCTTCTAATAATTTGCTTA GTGGTAAATAGRTTAAATTTGCACAACTGTAAGATCAGATCTCTG CAACCTTGGCAGATCCACCTCTNCTGCTAACTTTCTCCAGTCTGAT CCCTACTGCTCTCCACAGCTGGTGTCTCACAATTTCTGAAACCCAA A
2FH2 1F_14 _011	ANTTCTAGGTTTNAATCCAAATTAANAATGCTGTTCAAGATANYGT AGAAAAAGACCATGTACTACCAAAATTTCTCATCTGTTGAAYTGCAT CACACATTTGAATATTTCTATTACTNACAAATTTACTANTGGAACTA TTCATCACCAGAAAGATGNTTANITCTTATTTAATGGAACCATCCAT NNNNNNNNNNINGTCAATTTGTTTCTATCTGAAGATGCAACCATCA GC(G)ATCAAAACACCATTTCTCCGAGNTTACAGGCTTACTGAATCA GACTGACAGTGGCAGTATGACCAAACTTTGGACACCATAGGTG GTACATCAGCACAAGGAATTCACAGCATCAGGATGCTTGGTGGCCAT CTCTGATGCTGGACAAAGAAATGACATGATATACACTTGAGACGAG ATGAGGACATTCATTGGGAAAATGTGCAATATTTGCTGATATCAAAAT TTGCTAAACCAAAACGAATAAGCCAGGATATCTTTGTAATTTAT GCTCAGGAGGAGGTTGGTCAGATGGAGAGGCCCTCATCACTTSTGC TTT
2FH2 1F_22 _085	TTTGGTCTCTCTCTCTGATCCGCTGGTGTGTAACAAATATAATATC GGTAAAGNTATTCCTATCATCCTCTAAAAGTCCAGCAAGTTCTAGTGA TGTATGAGGCCCTGTAGATGATTAACATGCTAGGCTCTGAGGAGT GGGACAAAGCTCCCTTTAGAAAGNAGTGGGACCTGGAAGGCCCT CCTGATTTGGGCTGTAGAGGAGAGCCCTATTGGGTGACAGGTTAAN CCATNTTGGGTGACCTCTGGAAGATGACCAAGATGCACAAACCTCT CGCTGCAGGGATAACAGAACTTAAGTATTTCTATCTGGGAAGACAC GGCAATNGTGGTGGAGTGGTGNACAGCCTCAGGCTGACATGAGGAG AAGGATTAGGAGATCATGGAACATCCTTCTGCGGTGCTGCTAGAG CATACAAATCTGATTTCTCAAAGCTTTGGAGGCTCTGACATGACCA GGNTGCTCCTTTGNSGATGATATTTCCAGGCCCTNGTCTCCCTGCT GGTCTCAGTTTCTCATCTCTTGTCTCATGTTCTCTCATGTTGAGT AAATTGSCAAAGGAGACCCCAAGTTGACCATCCGCTAGCTGACAGT CTTTATTAGCAATTTCTCGAAGATTTCTTAAACTACTGCTCATTT TTGATGCTCCTGNTGTTGNAAGTTTGTGACTTNTCACTTCTTAATTT CAAGNTATTTGACGTTCTCATATATNTTCAGCACCCTCTCATCAT GCATCCTCTCTAAATTTCCACGAGCCATTTTNTGTTATTTCTACAG AAAAAANCATTGTAANAAGTAATGCNGTAATTTAAGAGTAAGT TCATAGTATGATTATCTCTCTCAGTTTAAATTAATCTGCTACGCA GATACCTCCACAGACTAACCTAGNACCTCTCAGGAGTGCCTGAGT CAGCCATATGGGACAAATTTGAATAATTTAGATAAAGCCCAACTG GNGTTTCTTTTNTCCATAGAGAACCTGCTAAGCCACTGTCGAAGT GTAGCTGTTGTTAGGATAGGAGANGTATCGTAAGAACTAGAGGGA GGAGAAITGACTTCAGTCTCTCCAGTCCCATANGAGTATTATACCA CAATACTATTTCCAGTATCTCTCAANGCCCCCAATTCAGAGAGCAC CAAT
2FH2 1F_15 _015	

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Marker ID	Secuencia genómica común
_035	TTATTAAGTGGCTCAGTYCTTNCCTGAGAGCTCTGCACCATATCTCTCCAMACAGGTGCAGATT
2F2 1F_12 _013	CTCTGTCCCTTNTTATGGTAAAGTAGGGAACCTCTGCTTATGCACATCAACGGAACTATTATTAYANCAGANCCCTGGGACTGGGNAATTTGACCCCATTTGGCTCA CCTTTORNTTACNANAGAGGCTTCTNACNGAGTTTGTGACACTCTTCCCGGCTC/AJGTGCCCCCTGCTGTGCTGAAGATTMGCTGWTGNCGCTGANG AAGAAAGTNGTCTGCCCTACGACCAAAAGCCTGTGGCAAAATTTGAGTNCCTTTCNATCAGGGCCGCTTGCCTGGTGCATGNACTCACCCCNAAAGTCCCTCCTNTTAT C
2F2 1F_12 _095	CCTCATGAGAGNGGAATTTGGTNCATCCAGTTNACGCGAGGCATATTCATGCTCTCTTTCTGAGANACNACCATCCCCACTCCATCTCTGCACATC[C/A]IGN TAACAGNATCCCGAGCTTCTCGCNTGTGATCCTTCAGGTCTCCAGCTGCTGANKGANGAAGTCC
2F2 1F_16 _005	GAGAAAGGCCAGGAGCTGAGACTTNGAGCCTATNCAAAAGNGNTTNGCAAGGAGCATGCCAAGTNGAACCT[CT]ACTGCAGGGGTGGCTTTTGAATAC
2F2 1F_18 _046	ATTTATTTCCCTCACCTGGTGTGAC[CT]GTTTCAAGTGGCTACTTCCAGTTTAGCATGGCAATTTCTTTTCAACATGCAATTTTTCATGAAAGAGATC
2F2 1F_20 _013	TACACACTGTGAATAAATGTTTACTAGTCCATATCTGCTTTTGGATAAACAATTTGATACACCATTTACTTACTCTCTCTTTGCTCTTACTTCTGACTGCTGCAC CCTCNCGCCACCAATCCCAACATATATGCCATATATATACATCACTGTAACCACTTAATC[GA]GCCCCCAAGGTCACCTCNAAATGCCACCTCTTCAG TTACTCTCTCTTGTCAATGCCCTCTTATNACACTGTCTGCTAGCCCTGGGTATGTTTCTCTACNACCTGAATAGNGGGAGGCTCTTCCAAAG GGAAGACCAGTTTCTCCTCATGNTGTGGAANGGTCAACACACAGAGGTGCTCAATATTTARCTGTTCCNGCTGTCTGCTCTCTGG
2F2 1F_09 _004	CTTTATTGNATTGCTTTCCTTATTCCTAAGTTTATGGCTGTACCAACAATCTATCAAAACAATAGAAAATTACANTANGAGGCAACATTTACACACAATGGNA TAACTAGACATNAANCNTANATTTTATTNAGACCAAGTACACAGCAATATGAGCAACAATGAGNCGACAAATGAGANCATCTTAGTGTAAATAATNA GTGAGYAGCAAAATAAAGATGANGAGTACTCTTAACAAAATCTGTATTACAAATATTGACAGGAGCAGATTAATNTGACNAAAGNATCAGTCACATATTTGACA CAGTNAACAGNAATTTCCCTCTNTNCAATTCACCTTCTNTCTTC
2F2 1F_05 _097	GCAGTGTGCCAGGTGATTGGGATGTACGACTACACCGCGCAGAAATGANGATGAGCTGGCTTCAACAAGGGCCAGATCATCAAC[GA]TCTCTCAACAAGGAGGACC CNGACTGGTGGAAAGGAGAGTCAATGGACAAGTGGGCTCTTCCCAATTTATGTGAAGTGAACACAGACATGGACCCCAAGCC
2F2 1F_17 _023	TTTCCGCTTATTTCTTCTGATATCCACAGCAGAAATTCAGAGGTAACTTCAACATTAACAGGTGAAAAGTTCTACAATGACTNGTTGCACCTCYATCACATTANA ATAATTTGAACATAATTTCCATACAAACANAAGAACTACAGTATTTTNGKACAACTGNAAGATACCTGATAAATAATATCAACTTACTATCATGAAAGAAATGGA GCTGGTATTTCAGCTNTAAAGGCAAGCAAGCAACCAATTTCTAGCCATTTTNAAGTTTACTCAAAATTTGATAAATGANTGAAAGGAAACAAACAAAAGAT YGTAAAGCANCCTTAACAATGTTCTTGCATTTCTACTGATAYACAACCTCTRGGTTTCAGTTGRCACAACTCAAGTTCAACTTGTACTRACAGAAAATATTAAANCTTC CTATTNTTAAATCAACAGGAGGTAGTAAATGTTTCTGATTTCTTAMAAAAAANGTCTAGAAGANGANGGAMTGTAGTGTGCACCCNTTATTNCTAA GTNATAATTTTACTTACGAGGTCAACGAGTGCAGAGGCTTGTGATGATCTTATCTTANTTTTGGACAGTAAACCCCTCAGATGGTATTTTATTGGTTTGT TTATNCCCCTTTCCATTTGCCCTCTGTTTGAAGTCTTTTCTTAAACTTAACTTCTTTCCTCCTCAATTTCTTATAAACCCCAATTTCTCTTTAGIG/ JTGANCCTACNATTTGAAAGGAACCTTCTNTTGAATTTACAAGCTGTGANTACNGCTATNTNATNTTCCAGGATTAATAACTGAGANATGATTT
2F2 1F_03 _008	ATCAAGCCATTAGCCTAANGACAONAAAGCTCAGAAANTGGTGAATAATTTACAGGTGAAGATCCAAAGAGATTAAAGTGCAGAAAAGTGAATCCAG[GA]CT GAGAGGTAATTTTCCCTTGGNATTAGCTGCTNAGGACCTGGCAGACCTTTTANGGCTTCCAGGATAAGACACAAAGTGGNATGAGCCCACTTT TAAGCTTGGGCGCTTAAAGACTACATCTGAACTCAACTCAAGTAKACTGCCCTCACACWAGCTGCAGCCANTTCAAGCAGCTNAATCTCNGAAATTTNGTAA GGTGTCTAAGGCTACNAGCAATTTAGAAATTTGTTTTCAGCCNTTTTCATGTTCCCTTACAGTAACTTCTTCTAGTGCACAGGTGGAAATCTCAATGAGAAA AGATATTCATGAGACTATTAGGAAATATAAAATGANGTANCATGTGTGNTGCAAAAGGGAATTTTATTATTGCTAAGAAATTTAGAGGAAACATTTGCAGCTTTG
2F2 1F_14 _037	TAGACCTCCCTCTGNTTACNTTGGTGTCTCTACTTTCTAGNACAGCTCTTAGCTTCCACCTTCTCT[GTG]TGTGCTTCANAGCCAGTCTTTTNCCTTCATCTCAACCA CCAAATTTCTNAACTCTNCTGTCTTCAITANACCAATGAANCCTTCCACCTGNTCTTTGTTAAT
2F2 1F_22 _037	GAGGATGGTTTATTTGGGAAANCAANCNTATCAANTTTGGTGARACGACACAGGATGYAACCTCTGGGCTGGGAGCCCANCCCATCAAGTNGTGGGGG CTGACAAGAAAAACANACGCTCCNGCAGAGCTCCAGCAGGCTCACTGCTNCCCGCTAGCGGTGANTGGGCTGTCTCTGGCCBACAGCCTCCCGA GGCNGCTGCCAACACCCGACCTTCCCAACCGTGTCTCTGGAGTCTCAGAGGAAACATCTGCCCRGACATGACATCAATAATCATTATGAGACAGTCACTAT

Mark r ID	Secuencia genómica común
2FH2 1F_05 _035	ATGACATAAATCCACTTAGCTGAGAGCCTCACYCTCACTAGCAACTGGGTACCCAGCAAACTAACCACTTTRGTGTGACTCTTCCATTAGGACACTNCTGCGCCCGCNG AGCTGAGAGCCAACTGTCACCAAGGAGCTCACCTCTCCAGAGGAGGCAAAACAAACAAATGTAACCTGANAACCCNGGTTGTAAACCCGGTSGAAG AGCTGGGAACGATTAACNGGGGTGCTCTACACCTGCTAGGAGCCGAGGTGGAGCCGAGCTGNCANAGGANCCCTCTCTGGGNGGTAAGAGGGGCTCG CCAGGCAAGNAGNGGNGGGGCTGGCTGCTG
2FH2 1F_05 _035	TGNAACCTTTTGTGTTTNAATGACACATCCACAGTACAAAGCTGCTAATGAATTAATGAGTATCCAGTGCCTTAAACATTAATATAGCAGTAATTTACATTTGCTCANTTATGTTTCA AAACATTAATTTGGCAACATAATTAANTACAAGTTAGAATTAGACTATCCAGTGCCTTAAACATTAATATAGCAGTAATTTACATTTGCTCANTTATGTTTACAAAA TAAAGCTCAGAGATGGCTGGGAATTATTAATCCAGAAAGTCAAGTCCGTTGGTGCCAAAGTCCCTGCTATTAATAGTAGGACAAATTTCAAGGCTTG TNTNCATATCAAGAGGCATCTCCCAAGGAAGNAGGAGTCTCTATTAATACANGCAAAACAAACAAATCNATTCATTGNCATTCATTCGNCCTCTCCNC TGCCCCNTNCTCTCCCTCTCCCTNANAGTTGATATGAGNITGAGGAGAAAGNGGTCAAACTCAATTCATTCAACAAACCCATCAAGCTTACAA CATCTGCAJCTTATGAATGGAGGTTTATGTTTACNCTTGAGACTCAACNCTCTCAAAACATAAATANGTAACAT
2FH2 1F_13 _101	TGAATTAANTGAANTATCTAATTAAGCANTCTNCCAGNCTTGGACATTTAGGTCAATCCAGNCTTCTTCTNCTGNACANCCCTAAYGATGAGAGAACCCAAAAAGCTTAA NTNCAATACAGTACAGAGGAAATTTMTTTCAGTTGAAGGAATGAACATTTNCCANCATAAANTGTAACAAATTTAGTTCTNATANCAAAAATNGAAATTTGGAGTTT TTTNTCTGATGATGGGAAGAAACAAAAAGACAACATCCJCAJCTTGTTGTTTTCAGAGTGANACTGAAACCTGNAARGGAGGAGAAATCCCTTAANAATGSGGTGCAGGA AT
2FH2 1F_07 _064	TAGTCTCCCGTGAACCATCATCTCTTACCAGACCATTAGTGCTCTCATGCAATCCACCTAGGACGTTTATTGTTTGTAAATTTATTTAGTGTGAGCAGTG GGGNCANAGACTTAATTTACTTCTCTCAATTTCTCAATTTCTCTGAGATTTGGCTAACATACATCTTAAATTCNTTTTAGTCNATAGTTTAAATATATGTTG CGCATAGAGCTCTNMAAAATGAGACAGAAAGTCACTAGTAAGTAATAATGTTGAATTTATTTTCAGAAATAGAAATTTCTGGTAAATTTATGTTATTT CATCATATTTAAAGTTAGTTGATGCCAAATTTATCTCAGTTTAAAGANACAGACTTTGTGTAATTTATAGTTCTGAAGAAAAATTTATCATTTATCTATGATAT TCTGACAAATATCTAGTATATCTCTTAGACCTTAAACTAAATATAGCTATTAATAYCAAGTTTAAATATCTCTCAGATCTAGCTTTGATCAAGAAATTTACACAA CCATTCAGAAAGGTASCTGCCCTGTGAATGTAGGTCTTCCNCTCAATCCAGTTCGACCATTTTACACGTAAATTAAGATNATGCCCTTTCTGTCTACAT GCTANGTTAAGCACTGTTTCAAGCTTANTGAATTTTCTGCTGAGCATCTATCTTTTGTGATNGTGTATGAATCATCAATAAACAATGANCATATGATA TGAACACACTAATGCTCCACAGTAACCTTGAATTTCTTCACTTAAAGAAANGTTACTAAAAATCTATAAATGCTCTAATGCTCTTAACTCTA CAAACTGAATTAAGCAAAATAGTCTCTAATGATCAATTAATAGTTGTAATAGATCAACTGCTATCAATACAGAACTAAAAAACACACTACCTGGCAGG GACTGAATTTGAACCTJWAGAAATAATTTAACCCAAAAYGTTAATAYAGCATTAGTTCTTCTGNTTGAAGCCAAATTTCTCAGGTAACCTGTCACAGCT AGTAANTTATCAAGGAGTGGGATGGGAATGAGACAAATGATGACANGTGGAGGATAGGCTATTTAGAGCACTTCTATTAAGTCAATTTCTATTGCTGN TGTAAATANGATCAAGCTANTCTTACGCCCAAGAGTACTACGTTTAAAGCCAGCCANAGAGGTTTGGTGTCTCANGGCAAACTTCAACCTCCAAATCT AAATCAACCCNGCCACACTCTCCACATRCTATGTAAGCCAAAGTTGCTTATAACAGTAACTGCTATAATNGAAGTGAAGCAATGAAGANAGAGNCR AAAGGAAGTAACCTGTAAGAAACAAAGATTTACAGTTTGTCTTTTGGTAAATAANAATCACTGTATACANTGGATACAGCAACACTTCACTMTTIA GGGAATNTTAAAGAGCTCTCATATAAAATTTGATCTGNATCAAGTAGCAACAAGAAATTAGACCYAATCCCTGTTTGTATACAGACNAGTATATTACGCT TTAGCCTTCAATATTTACATACAAATATTAGTNGNCTAGCACAGTAATNTCTCCAAAATACACACAGCAAGTGAACATAAAGRAAGTGTGGTACTCTA ATYNGCTGTGTGTAGTGTGTTCCAAAGGGTAGGTATTTTAGTTTAACTATGCTGCTGCTACTTTTAAACTGTAAAGTACTCTCTTATAATATAA GTAACTTCTNATAATTTGTCCAGAGATATCAAAATACAGTACCTATGTTTNCATTTATGAAATTTCTTGAAATATTTACTGNA
2FH2 1F_18 _002	CATAATATTGTTGCAGATATTGCCAGCCACCTACCCAGAACCAATTCACCAGTGTACTAACCCJN-JCCATTACTGACACCACCCTGTAGCTCTCTTACCTT
2FH2 1F_19 _005	TGATGMITCAACATAAATACTATGGYTTATTTCTANATGGCAAGGAANTCACTGTGAAGAGGTTCCWTTTNAAGAAATTCACACTATTCATCAAAATTTTCATCTA TTCTCAAGANTGTNTTNAACACTAGTTTNGAGTAGCAAGCATATGAATTTTATTCJANTAGANACATGAGAGGATATAAAAGTTGTTTCTGNAATTTCTTTCAA AATCTTATTTGAAGGCCCTCTGGGCANATAANCTATTGGAACCTTGTGCATCANTTAACTATNTCCTATAAAGATGARANTCAG
2FH2 1F_08 _001	CAACTTCACAGAAACCCGTTCCCAAANGTGTCTCTGYATAGNCTGTCNACAGANTCAAAAGACAAACNTMTGGGJATGTTTGAAGATGCATCTCAGAAAGGAGAAAGAA AAACNGGAGCTGGTGC
2FH2 1F_04 _014	TGTANTGAGAAACTGNITTTATGATCACTTGAAGATTTGTATAGTTTATAAACTCA[G]ATTTAAATGTCTGTCTTCAATGACCTGTATTNTGCCAGACTTAAANTCACA GAYGGNATTAATAACTTGTGAGAAATTTCTTNTNCTATTCAGGC
2FH2	AGCTGCACNACACATTTNCCAAAAGCAGNTNAAAAAANGCAAGGGTCTCAGGGCTGCTCAGGCTGCTCAGCTCCTTATGTGTCAGGGGAGANACAGNACATTNT

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Mark r ID	Secuencia genómica común
	AAGCTGCTTTTANGAGAGCAGTGGTGGCTGACAGCTGCTTACACAGTCTTTTACAGTAACCATAAAAANCTGAGTTTATTTGATCATGTATATCCCTTNTCANATAAN GTCATATTAGAGGAATTCCTNRNAGANGNTTCAAACTAGTCCCTTGGGATTTAAATAATMTATTATAAANGTACACTCTTCAATACATAAGAACAANAATTTTIN CTTTACNAAAAAACCTCAATTTTAGGCCAAATANTACACTGCTGAANACCTTTTATGGCTCAGTGCCTCATTC
2FH2 1F_08 _004	CTATTCTACCTTCTAATGAGAAATTTTAAAAAATAAAGATGATTTTAAAAAANAATTTAGTTTCCAAAAGAAAGGAANGANGATTAAATCCAGAAACCTCCACATC TTCTGGATTGGAGGGTACCTATCNITCAAAATTTCTCAGAGTATCATATGTTTTCAGATGGAATTCAGAGCAGAAATATTTTCAAAAGATCAGTAAGCGGTGC[AG]
2FH2 1F_12 _039	CTTAGAGAGAAACAGCCTCTCTCATCTAAGACTGTGAGTATTANA TAAAGCNAATTTCTTTCTTNTATCTTAGATCCATGNTTNAAGAGAGGGAATTTNCAAAATTCACCAGCAGTCTTAGGATTACATTGGTACTGAAGTANAGQT/ GAGGGAATAAAAGTAAATTTGGAGATGAGATAAACT
	GCTNACCGTTCTACTNGTTGGCTAGCTGACCTCAGATACATCTGATATCCAACTACAGTATATCAAACTAGATCTTTCAGATGTTTCTTATTAATAATGTTTG TTTAANTTTGAGGTGAATTCCTAGAAAAGCTCATATAACTATTTTAGAAAATCAATAAATCACTTAATTTGCCACCATGAACAGAACTTAANGTAAATCTA CATTTCTTTGGTTAGTATTACTACTGTTAAAGACCAAGAAATGGTAATGTTCAACAAATATGAATAATGCCAGTGANTTAACAAAANANTAGCTGGAAACCAAG AATCTTGCITACATCAATACAGCNAGGAAATGCAGCTTATTTACNGCCMNTCCCNANGTGAAGAAATGTAGAAARMAACAGTAATAAAAAANAGNAGTATAA TACRGAATGCCTAAATCAAGAAATTCATGTAACAGATACTGAACTCAGTATTTCTAATACGKATATACATCTCTGTAATGTAGTAATTTCTCTGCAAGT TATGGTCCNGTGGCTCACCATGSAAGATCTATCTTGTACTTCAATTCATCTCCTTAATAACAGCAGCTATATTAGCAGTTTCATCAAGTGAAGGCTGTT GCTAGATAACTAAACCAAGATTGGAATACTAAAGCTGGAGGAGGAAACACAGCTTACAAATNCTTACAAGANTAGCAG[AG]JAAATGATGAAGTAGTAACA AGAGGGGAGAAATAATAGAAATATCATCGGATTTGGAWTNCAGRCAGCTCAGCAAAATAGTAGGACATGGCTCATATAAAGATGGAATAAGCCTGGAATA CACCCCTCCCAATATTCNGAACATAAAGCTACAGAAANAGAGCTCTGATGTTGAACTGGTTTCTCAANTGAACAAAGCTTWCAGGAAGGAGAGATA NGTAAATTTAACAGGAATACATATGAGCAGTATCTTAAAGATGTAAATATATCAACCAAGTAAANTTGAATTCAAATTTCCATTGNTAAAGTCTTTTCAGAGT CAGAAACATAATATATATACTATTCAACAAACAAACAAANANCTTCTNGAANAGNACAACTGGTTGAGAAAGAAANCTTTTCATGGTAGAGAGAAATAA CTGCAAGGAAATACITTAGAAAAGKATATATAAGAGTGGCTAGTTTACTGCACAGCTTTNGCCATGCAGAAACAGCTAAATCCCATCTGCACAACTACTTT CCCTTCTGTGACCTGTCTTAGAGATAAATATATCTGNTTGATAGAGGAGTAAATTTCACTTAAAGANTGTTTCTTAAAGCTYTGCCCTTACAGTTT AAAAATATACGATTAAATCAANATATTATCTGATAAAGCCAACTTAAATCTGAACTTAACTTGAAGCAATTTCAATCATGAAACTT AAACTCCAAATTTACTATTGAAATTAACACTCTCCACTTTTNACTTGTGCAATTTTAAANANCTTTCAGAAAGYAGCAANTTTGTAACCAATTAATTTONTAC CTANAGTATCNCTATTTGCCATGCTTTTACTTAACTTANGAATGGAACCTCTTAAAGGGTAGAATGNACATGATGTAAGCAGACAMAGGAAGAT TTATCTTACTTACTGARAATCAAYAGTACAACTTCAAGATTTTTCNCAATGAACACTGTAATGCTACTTTGAAAAAAGAAATCCACAGAGTTAGCAATTAAT AAAAAYCAAAATGAGAAATTTCCAGAGCATGAAATTTCTGTGATMATGTGATGTTTATCCAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN ATTAGAACTATTATCNATAGNTTGCATCTTATGRCCTCARCTGAGTTGAAATTCAAATAGAACTCMCTTCAAAATTTAATAATGGCATCTTCTCATTAACAGCAATTA AAATATGGCTGAACAYATAATCAACATTACACTGAAGTCTTATGGAAGACAGAAAGTTGCCATCCACCAAGCTACACATATACCTTCTGATTTTATAGAA TGTTCCAAATCTTTTTCWGTCAATATCAATAAATCAMCCTAAGTCTGTTGGCCGAGGTTACCAGGAGAAATTTCTCTTAGTAATAGCTGGTTTACCCATGCCAD TTTTNGAGTGACTGAGATGTAGTTGTTGGCATGATTTCCAGCAGASBACTAAGAGCTGAAGGTAATTANGCAGCATGTCATGYGAAGGCAAGCTGGAAG AGGTGTTGGKGAAGAGACACATCTGYCTTGTATGCTGCTGATRAATGAAATGAGTCTGCTCAGATGATACTTATAGATTTGCTCTGCTGATGTAAC ATCTTTCACACAAACCTCAATTTAGGAGTCAATTCAGAGTCCATCAATCCAGTAGAAGTTGAGATTTCTTCTGCTCTTCTGAGCCTTTCTATTAACCA ACTGTTCTCAGGACATAAATGAANTNCTTCTCATGTGGGACAMTAAGGTTTCTAGTGAAGAGTACAGATTCNATGACNAATTTTGGAGGCTTGGATCTTCT NTGATACCACTGTTNAGGTTCCCTTAACAAGTGCAGTGTGCTGCTGCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTT TTGATCTCCCAAAATATGCTTCACTTCAAGAGACATTTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTT ATANTACAAATTCAGAAATTTGTTTGNATGTACAAACAAATTTTAACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTT TCATCAAGCAGACRATTTAAGTGAATGAAAGTCAAGTACAGGATTTATGGAATAGAACTGAGGATTTATGGAATAGAACTGAGGATTTATGGAATAGAACTGAGGAT NAGNANTTCCAAATGGAATGAAATTTACACAGGAAAGTCTCATCTATTTTATGTAAGAAATGAGGATCAATCATGTTATGAGGATCACTAAGTTAAAG TAAAGNTGATAGATGTGAGGATTTCTTAATAGTAGATCCAGATGNAAGTTACTAGACTCAAGACACAGAAAGATTTTCTAGTAAACCCCAAT ATTTATTTGCTTAACCATACCTGCCAACCTTCAATTTTGGATATATCCTTTGATATATCCTTCTCATCANTGCTNTAAATTAAGAGCAATATCTCAGGAAATCTATAA ACTTAGATATCAGAAACATAGTACNGGTAATTTAAATCAGATACAGATGTTAAACCTTTAACTCAATCTCATCAAGGTAATTTTAAAGTATAGTAAAGAGACA CTGCTAGCCTCATTTACCAATCAGTGAATAAATTTATCTN
2FH2 1F_07 _094	GCTTCTAGCTACTTANCCCTTAGTATTAGGAA[GT]ATCTGGTATTTAAGGAATTTGCCAGGCTGACTANGGCTCTTGGGT
2FH2 1F_18 _254	

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Marka r ID	Secuencia genómica común
057	CAGGGTTTACTCCAGTGTTCACAGATGGTGGCTAGCAAGCGAGCTATACCATCTTAATTGAGGTTCCTTGTTGCTGAGGCGACTGGAGCAATTTATGTGGAAT TAAATTTCTTAGTAAAGAACAAATATGATCAACTGGTCTGTAAGAGGCTATTAGTGGGAGTMAACTTCTTT TTCNTGTCATGCTNTGCTGTCAGAGTGTCTMAATNAAGGTCCTTGGTCTCAAGCAAGCAAGCACTACACTGAGATCCANTCTTTGGGAAGNGCCTCTCC TTCAACCTGNGGTACCACATCATTAACACCAACACATNTTTGGCTCTTTGTGTATCATAAAGTCCCTCATTTGAACAGCCNTTAACTCCAGTCTGGAAACACAAA NCCACTGGGCTACANTAAAGJAGJACCAATTTTAGACACAGACATCCTCCNCCTTCTCTTGACCCCGAGGTATTTCTCTGCCAACTACAAANTCCTCCAGGAAATCAGCA CTAGCAGACCCCCAC
2FH2 1F_06 168	TNCATGAGTGAACAGGGGAAGCAGCTAGYATTCAGGTGTCTAATATCCTGGGATGGATGTGTGGTGGTNTTGAYCTGYTGATGAAAGATGNCNGCTCCTCTCTGN GTCTGTGAGGCGAATGCAAAATGAGGTTTCATCNCNTTNTAAGGCTTGTAACTAGATGTAGCTGGTATCANAGRCGACTATNCGCTCCCTCTACCCCTCTGG CNGCTCACCCNGCGTATCCCTGCTCCTCNRGTGGTCCAGTCCGAGTGAGACTAGGACGNGAGCTGGTCCCGCAGCAGCACTGCTGTTGACAAACATNAG TGCAAGTTCCAGCTCTGTGTGACGAGACCTGAAAGCANGAGCGAGCGKCTCACCAANTCCCGAGGNGCTGTTCAACATGAACCARCTGCTAGCCAATGA AATCAAACTACTGGTGGACTGACTCCACTGGTAAATTAACCAACAAACCCCTGTGTAACACTTCTCTCTTTT ICTTTCTAATTTTAAACCAACTTGCATGCTGTTCTAGGAGGTCTCAGSAGATGAGAGAAAATAGTAGGATAGTGGAGAGAGTGGGAGATAGANGAGACC NNGCTAGTAGAGTACTTCAATTAACAAATCCTACAGAGAGYAGATAGGTGGGTATAGAAAATGTACGGCTNTCANGTTTACCCTTTTAAATGTCTAAAA ATNTGTATGCTCATAGNCCATGGAACAAATACTTTTTTNCATGTGCTCTGCTTTGTTGTACAAAATAAANTGGTGTCTCACTAATCCAAAGTACAT ACTTCACATGTGTGGAGATTTGTCATCAGTGAAGAAACATCGCWTAATTACAGGAATTTTGTATTATACAGCTGTGAAAATTTGCGATTTTCTTATTAACT AGCAGCTTAGTGTGATTATGAAATCTTGAGGGGCTCTTTACTTGRGATTTCTTATTTTTNTNGTTTTTCCNCNTAAATTTTGGTGGGAGGNTCAANTGAATATA ACCCAATAAG
2FH2 1F_12 081	TTATANACAAAGTTNCCTCTGCAACAGACAAGTGTCTGTCACAAAATCAACNTTTTAGACTATGATGATNTCCACAAATTCCTTACTGANAACCTTGCCTGTGT TNTNTGATTACTATGATTCATTTGGTAAATAATTTAGTCAAGAAACAAACATGTAATCATCNCNTGGTGCANAACACTTAATATGCTTATGTGAANAACATAATTT TTAAAGCACTACACAAAGAAATGAGGTTGGTTCACCCCTCCAGTCAGJGAGAGAGATGTGTGGGAATACTGAAACAACTTNTGGAGGTCNTGTANAAGANT TATCNAATCTACTGGATGNTTTGGTGTCAATNAGAAATTAATATGAATATTAGACACACATGTCTGTAGCCAGAGACAYTAAGTTTAAAGCAATAATCAACTAA GAAATTTTCTTTAAACAGTTGAAAGCAANGACAGCTATACTAAGATAATTTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN GGCATANATGAAGCTAAATGAAGTAAAGGGAGCAAGGTTCTTAGCCAGGAAAGTGTGAGAGAAACAAATGATCATCTTTAGANAAGGTCATTTCTAANAAGAC AGCNGTAAACAGAGAGATTAATAAAGAGACAAACAACTTGAGCTTAAATAGAACAGAGCTTATCAGAGATCTTAAACNTGTAGAACTATTCCTTAAGAAANT CCAGACAACATAGAATAAAGAGCTTTGGTGAACGACNAANAAGTCAAAATAGCTGTCTACAGTGTGAATNAAGAAAGCAACAAATCAGCATGTCTTTCTAAATTT CCATCACACCTATCATCTGCCAATTTTCATCAGTGGCAGACATGKGTGAGTGTGTTGCTATAAAGAGAGATCTCTGNAAGAGAAATAAATCANGGATGTCA TCCAAAGAGGCTAGACCGTATCATTTGSCAGGTAGATAAGAAAGGTCAGAGGACTGACAGAAATTTAGGGYAAAAGAAAGAACGACAGGACTTAATGTGCAAGAAATACA AAGATAACCAAGAAAGAGGCTGGAGTTAAGCTTAAGTGAAGTAAAGGAAATTAAGCTTAATGATGAGTAAATACATTGAGGAACAGGGGG
2FH2 1F_07 220	TGATGNCMAANGCATNTCTGGCCACTGAANCAGGNTCTANGTTTAAACATAAAGANTNGTCTCATGGGCTGCAACACCCAAAGCAGJATAGAACTAAGATT GATAAGAAAATANAGCTTTACTCAAAACAGATTAACGACCTACNTATTAATGTCTCTATANANGGTTGTACAGTCTNTATCCTCAATTAATCAGTAGGTAT CYNCNTAANATCTATTTGAAATCCCCCNAAATAACATTTAGCANTAGTCTNTAGAAATGNTGCTNTATTTCTTAAACATTTGATATGTTANACCACC CAGNGNGAAATAGAACACAGAGTGTAGGATACACACNTACTCACCANAACCAACCATANTGTAAACNCAAAATNTATTATNAATTTGGTCAAGGAAATTTGAAATTT AACATATGCTGTTANTACAGNAATTTTAAATGAATTAACATTTGTATNTATATAGCACCCTTCTACTAAGGAGCAAAAATATGGCTCAGAYATTATTACTCATNTC ACACNATCTNGACAGGTGGAATAGTAAAGTAAACCATTAANAACCAAGTTTAAATCCTGGGAACAAAGACATGCANAAANAGAGCAAAATAAACCAACAAATGGTAACCCA GAAAGTTGGCATTTCCACCCCCCAATGCCACNGTGGTCC
2FH2 1F_08 085	GAAAAATNANCNAATTTATAAATAAATGAGGTGTTTGGATGAAAAAATAACAAGAGCTTTGGCTCATGCTNAGATCTCTTAATATATTNTGGCTTGCANCTNA GATATCAATAAAGANTACTAGCTTGACACAAAGTTGGTAGCTGCAAGGTTAAGCTGTATTAGTTGATGATGGCCAGGAAATGATATATTTCTTAAATTTTNTCCT TAAATTTGGCTGTAAACAAATGCTGATAGCAAAAGTAAAGCTTCTATTAGACAGCAAGAGGAACTTGAGTGAATGAATGCAACTTACTCCTCAAGTCTCTTAA GGAGGTAAANAATAAATACTGTGTTTACCAGTGTCCCCNCAAGCAATTTCTTAAGCATCGCAGGAGGTATGATGAGAGCTACATAAGTAAAGTCAACCCAG AGGTAGGTTTCAAGGCCAAGTAGGAGAGTGTGAGGAAATCCTCCTGAGGAGTACCATTATAGAGTCCCATTTGTGNTGSSNGATGAKTCTNGGCCAT TTCTCTGATGATCAAAAGNACATTTCCCAATTTCAACCTTCTGTAANAANAGGCAATTTTGTACTGCTNTTAAAGACAGCTAGGATACAGGATAGGCTGGCATAAAT TATTAGCAAGCACATGTAGCTATCCAGTTTGAATCTACCAACTGTAAANTTGGGAGAAATAAAMAGTTGAAGNTGNTTGTCTCAAGNTGAGGGAACAAAA TCTTACAAAAGGNGGATAGGCACTCGCTTAACTCTATATGAGAACTCTTCTCAAGCTAGGTGGAAGTGAAGAAATATACCAAAAGCTGACAGGC CATTTGGAGACCAAAAGGNAAGAAAGGCAATTTAGSAGCAAGCTAGTAAAGAAAGTCTCTGGCTGACTARGTAAGTAATTAAGNACCATTACCAAA GATATGTTACCATCTCCAGCATGAAGCCAGTGGCAAAATACCTCAAGANATTTTAAANCAGAGAGAGTATGAAAAATATGATASTTAAACCAAGCANAATTAAT CAAAACCAATTAATGGTAAATACTCTCAGANTGAAATCCAGATACTCCTTTCCATTTAATCTGTGNTANGGGGGAAGAAAAAGTACAAAYGTAAAGATTTT
2FH2 1F_01 018	

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Marke r ID	Secuencia genómica común
012	GAGCTGGTATTTCAGCTNTAAAGGGCAAGCAAAAGACCATTCTTCTAGCCATTNAAAGTTACTCAAAAATTTGATACAAATGGANTGGAAAGGAAACCAAAAAAG ATYGTAAAGCANTTTAAACAAGATTTCTGCAATTTACTGATATACAAACCTCTRGGGTTTCAGTGRCAACAATCAAGTTCAACTTGTACTACAGAGAAATATTTAAANCT TCTATTNTTAAATTAACAAGAGGAGGTAGTAAATTTGTTTCTGATCTTCTAMAAAAAAGAGGCTAGAGTGTGCACCCNCTTATTNCT AAGNATAATTTTACTACGAGGTACAGAGGTAGGAGGCTAGTATGATCTTATCTTANTTTTGAGACGTAAACCCCTCAGATGGTATTTTATTTGTTTCT TTTATATNCCCCTTTTCCATTTCGCCCTCTGTTTGAAGTCTTTTCTTAAACTTAAGTCTTTGCCCTCCATTCTTCTATAAACCCAAATTTCTCTTTAGNTGCANCT CTACNATTTGAAAGAACCTTTCTNTTGTAATTTACAAGCTGTGANTTAAGCTATNTNATNTTCCAGGAGTTAATAAACTGAGANATGATTT
2FH2 1F_20 _004	TGGGAGAAAAATGTAATACAAATTAATATACCAAGCAATAGTGAAGTACTTTTCTCATGAGCTGGGAGGAGNCAATNGTTTGTAAAAATTAATAATGTTCTACGCTA GAAATCAACTTTCTCTATGCTNTCTTANTTACCCCTATAGCTANTTAAGTAAATCTCAAAATCCTATCCTCTNATCTCTGAAATGTATGATCTTCCCTTCC TCTATTCTCACCAACCCATGTTCTTTGTTTCTCTAGCCCTGTGTAATAATCTCATATKYANCCTCTGACCTGCTCTCTCTAGTCCGAAGATAGCTNTTCTTCAA TTCCNCAATTAACCATCTGCTACTGCTTTGTGTGAATTTCTCCAAAAAATTTTACTTTTCCAAAAAAGTCANGCTCCCTCTCTTAGGATNCAAAACCAACCATG GTCCAGCCCAATCTTTCAGCCTG
2FH2 1F_08 _016	RYGTTTACNCTTAAAGCTTTTCNITTCACCAATATAAATAATGGGCATTAATTTCTATGCTTAAGSACTGAAGTATTACAGCAATGTAGTAAAAAGTAAACACATTA TACAGCTCAKGTGGAACAGCTTTCTAATTTTITP/JAAGACTAAGATTAGGATGCAATCCAAACC
2FH2 1F_16 _015	TTACCAACAGAACCCACNAGCTANGAGGATANAATANTTCCRTGTTCACTAGCCATTAAATNAACATAGCCACTTGTGCAGGAAGCCTAACNTTTTANANTTCCCT AACTTTTAAACCTTAAGGATAAGNCCATTTCNACAAGCTAACTTTTACAGCTCCTTAATAATCTTMACTCGGANGTTNANTTTGCAGACTTTGTTGGTGCTC
2FH2 1F_05 _041	ANAAATCACATACACACACANTGATCCCCACACCGTTCTCAATGCAAGGCAAAATCNAGGCCCAANGNCCCTTCCCTTTAGTAGTAGAGNTGCTTCCACNGGGAAGA GGTTTAACTTATAGGAGGCTGTTATTGGTCTTTTAAATGNT
2FH2 1F_19 _012	ACAATTTGCTTAGAGCATNACAGAGCTTACTNACATTTTNAAGNAAAAAANCANCAAGAAAGAAARTCATCAACAAGATGGTATCTTGACAAAAGGCACAGCAGTCC ACAATGCTTACTGCTACNCAACANAAATCCTCTCAGAGANGANAGAGGTGNCANAAATGGCTTNCATTNGASCNGTGGACACTANCACTGGTATTATTCTCA TANAACCCANGCTCTANANACACCCCTCTGGAGANAAGTGCAACAAATCTGTGTACAAAAGGCAAGCAAAAGTAGCAATANG
2FH2 1F_11 _012	TCCNCAATCCATCTACATCAAAATTTGNGAAGTAGAGANGATTTCTTCCNNGGCTCTTAGTTGAGTGCNCGCAAGCCATGGATNCCNCTNCAAAATTTTA ACAATGAA/GTGTGCTATCTCATAGGATTTGGGCTGTAGCTCCTCTCTCTACTCTNCCATTACCCNGACACNCCCTCATCCAGATGCGNCGNCTCAGACT CTTCATGAAACNCTTTCNTNATTTGGCCAGTANGACTTTAAGGAATCATAGTACTTNGCCAGAAAAACAGACCTCACCTGAAATGCTCATTTTGAGCAAG CAAGATNTATAGNCAATTCNTGGTGGGNCAGCTATTCTCTTTTNAACANAAAAACAATTTTAAANGGATTTT
2FH2 1F_11 _012	AAGATATTATANGATGGGCAATGATTTGTAAAGTTCAAGGCAAGATTTGTGTACAGATTTGTGACTTGAAGACTCTTANTGGATACAGTGCAGCGGAGTT GAACCGTTTGGTACAGAAATGTGAACAAGAAARCTTGAAGAGTGCAGCTCCAGAAATGCCAGAGTGCAGAGCTAGCTCTGKCTACTGCTCTCTGCAA ACGAAAAAGGATAATTTGACCCAGGACATTCNNGACTCCAAAGTCTTCTTAAATGTTTAGAGCAAGTATAGCTCTTACCCTTATTAATCTGRTTGAATCTCTCTT TATTTCTAGGCTGTAGCTGTGATGCTATTTATAAATTTTATACATCTTGTGAATTTGGAATTTTANTTTGAGCATATATTTAGAAATGTGTRTGTAA GGATCTCCCAATGCTGCGNGTGTGAAGCGAGGTTCATTTGTGGAATAGTTTNAACAGTCAAGARGCTAAATGTGTAGCCCTCCCAAAAATAG CCAGTAGTATCTGAAAATNAAAAAATAAGATTTCTTAGGAAACAGTGTGCTTAACTTATTTTGAATAATAACTTATTTCCCTCTGCTGCTTGAAGATG GCTTTACATAGAACAGAAAAATGGAATTTCTAGNTAAAGATGTGTGCGCTGTTTCTCATCTAATCAAGCAGAGCTAAATGTTCATACCNNNNNNNNNNN NNNNCTAACTAAGAGTATCAGGTTATTTATATATTTGCAAGCAAGGACATGAAGGTTGNCCTGGAAGAGAGAGTGCCTGAAAGAGGAGATCCAGGTTTAAAT CTGGCTTAACTAAGCAATTTAAGGATTTCTGATAGATTAATCTGATAGTANTCTGACAGCAAGAAATTTAAATTTTGGAGAGGCAATTTAATCTATAAACCAAGCTG TTNAAAAATTAATAATGATCTGTTTCTGTCAGAGATTTAAAAAATGAAAGGATATACCTCACTCACTAAATAAGAGCTTTAAATCACTCAGNAGTACTTACCTTCAA TTTNNAAAAATACCCTGTAGTGCAGTTTATTAAGCAAGAGCTTATCTTGTGTTGTTCTGATTAATAAGAGCTTTTCCACTTNTTTCCTTATTTCCATAT GGCATAGTAAATTTACTGTCAATAGTTTAAAAAGGAAATNCGACNTGTTATAGGCACTCTCTTTAAGCAATACTTTTCCACTTNTTTCCTTATTTCCATAT ATATGTGTATTCATANTNCTATACATATCAGTTGATCATTTATAAACATATNAGAGGCAATNAGAKATACAGAGAAAAATTTAATAACAACATCTATTGAAGT CAAAATTAANTAATCTCGCATATGACATCTCTAGTAAGGAAACACTAAACAAAAATGGCTAGAAATGCTTTTCTTTCTCTNTNTTGTGTNTNAGGTTAT AAGCAGCAATTTATACATGAGACTGGCAGATAGCTATTATCTCTTACAGATTTGAGAAAGTGTATCTCAAAATTTATGCACTTCTTCCATGTTCTTAA TMTGTCNCTTAAAAAGCTCTTAAGAGCTCAGTTAATGCTTTGACTAAGGAAAAAGNCAATGATAATACAGGCAAGTGGCATTTGTAGCAATTTCTGGTAG TGGTTGGAGTACCTTAAGAGGCGAGKATCTTAAGGACAAAGAAAGAGAGAGAGAGNAGNATCTTGATCTCTCTCTGGTATCTTAANGCAATTTT ACTANWACATGTTCTCAATTCATYATATTAITANAGCTCTNCTGCAGTTGATATCTGRGCGAGTAGAATTTGATTTCCATTTTCTTGTAAAGAGAGATATAT GGACAGATTTATTATYAAATTTGGSCACTGGTGTNTAAGAAATATCTGAGTAAAAATAACAATATGAATTAATAACAGAGAGCTCTANYGTCAGGTAACAATATAGACAG
2FH2 1F_07 _428	

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Mark r ID	Secuencia genómica común
2F2 1F_08 _047	TTATCATCA/CN/ATATGTTGGTGA/CCTC/TCACTTTGACATAGGCTGA/CACAGAAATCTAGGAA/CCTGATGANA/CAGAAAGCTAGGGAAGGAGAAAGCCCGGGA AACCCCTGGGAAAGGAGGATATATATACACATGTTANGGGA/CCTAGTTGATNCGGGGACAGAGCATACACTTAGATAAGAAAGGGGCTCATAAAAACCCAGAAA GGCAATAAATAGAT
2F2 1F_08 _047	TAATGACAAATAAANCTGNGCCNCGANGGTCAGCTAATGCCACATGGTAATTTGCTGCGIA/TGTGTGAGTAGGCAAAAATCA/CATGGAAGANGAGCTGGCCTTTGGGG ACAAATGCCACGTTACAGTGAAGAGCTCAGAAACCCANGTNAANATTCCTAGGTTACCGNTGGTGCCCATCTCTNCC/TGAYCCNCAAAAARAATAAAGATC TTAYAAATATCCAATGAATACAGGATGGAAATAACTTTGTTTCYGGCA/TCAAGACAGAGGAATCCTTACTAT
2F2 1F_08 _529	GCATCAGTTTCAGAGTGGAGCCCTTGAGTTTTCCAGATCTTGTCCAGTGA/CCTGCTGCAGCTCTGTGAGAGGCTTCTGGTGTCAACAGAAATCCTGTAAGTTAAACA AGCACTTCAGAGTGGAGGTCAGAGCTACAAATTAACAGAGCCATAATCAACATGTGCCTCTCTGTTGTAAACTGTTAGTGAGTAGAGTATTTTGTCTTCCTC CTTACCTTCAGACTAGCTGAGCAGGACGGGAGATATACAGCTAGATCGGGATCTGTNGTCCACAGNCGCAGAACCTTTTCTATAATATTGCAACCCCAAGCTC CCTGAGTGTCTCTCAGATCATATGAGGCGRTCAGCCCATAGTCACTGGGACGCTCAACAGCAGCAATGGTTCAGCCAKGGTTGTTCTCCCTCACAGAAATAATTTCTCT TGCAAATGGGGTCTGCTGACTACAGGTTAATTTCTGCCCAATTTAGAGGAAGAGAAATGGTTCAGCCAGGTTGTTCTCCTCCCTCACAGAAATAATTTCTCT GATTTGTACCCAGATGGGAGTGCTTCAGTTTTCTGGTCTTGTGGTAAAAATGAGGAGATCGAGAGATCAAACTGGTCAATAGCTANTGCTTATTTCTTATGT CATTTAGAAAAGAGATGAGCAGTCACTGGTCCATCAGTGAAGGARTTCGARTCGAGCAGCAATAGTAGTTGAAATCGACATCTGTGTAAAGCAACAAGA CGGAAGGTGTAGAGGAGACTTAAGCTTCATTTGGGTACATCCCTGTTTGAGTTTGTATGCCAACACTGAAGGTCTATTCAAGGACAGAGAAAGATTTATTT GTATNTTTTACCTTTAGTAATAATATTAOCTCTTAATATGCTGTAGAAACCTGAAGGTTTGGTTAAATTTCTTATCGTATGTATACAAAKAGGG AAGTGGCTAAAAATAGTTAAAAATGCAAAACCTGTGAATCATGATTTCTGGTCAAGCTTAGAAAGATAAACTGAAANTTTCTTAGCAGCATGGAGTCTGTCC CAACCTGGCAGATCCACCTCTNCTGCTAACTTTCTCCAGTCTGATCCACACTGAAATCTTCACAGAACTGCTTACAGAGAGTCAAGATTTGGAGTGACT CCCTACTGCTCTCCACAGCTGGTCTCACAATTTCTGAAACCCAAAGGAGATAAAGGGGAAAACTATATACTTTGGGGCTTAAATCTCTTTTAAAAAAAT A
2F2 1F_18 _529	CNACCCAAAGTGTTTANGCAGTGAATAAAATCAAAATATGCATCTTAATAAATCCAGCTGTTAAAGAACAAACTTAGCAATATATACAGTTTTGCTANCAAGGATT TTTGACTATTCACTTTGGGAGTTATTTTINAATAATCCACTTTTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN GTTAAGATAGGAAGAACCCATAAATCANTCCTTGNATACCAATNCAATTTTAACTTTCAACATCCNCAAGATCAAGAACCCCTAACTAAAAATACAYACCCCTTC TAAGTGTTTATGATTTATAGTGAAGAGGGTGTGTTGTAAGGTCNTGAACCNCTATTTTGTGTCATTTATCCAAATTAANANGTGTCAAAANCTAAKTTGTTATTTT CTAATGGTTTTAAGATYGGCATTTCAGTTNTTACCATGTGGTTCANTGATTTCAACCCCTAACTGCACACTGCTCAAAACAGCAACNACAGATGTGONTTAN ATGAAATAGTNTTTTGATACATATCTTNAANTTCAATNCAAGTGTAGGTCNTGAAGNAAAGATATCCAGTTATCGGGTGGNAAAGAGCAGACAGRAGTAAACTAG TNAAGATTATAAKATNCAGTGAAGTNTATTGCTNTCTATCTCTTGGTAAACAAGATGCTAACACNCTTTCAANAAAAANNNNGCTTAAACATGTCTAAAGGCC CATGNRNTGACATCATCCTCAACACCNCTTATGTTTACATAAANONGTTTTCTAAGGTNAACTATTAANGCAATAATTTGGAAATTAGCAATAGCCAGCAATGAACAAAT ANAAATAGCAGTAAATACCATCAATATTTTGAACACATTTTGNACACATTTANVNCATCTGCAGTATGANGWCCTATAGACTCTCACTGAGTTTAAATTTGTTCTG GACTGAATGACANGAATGGCTTTATGAATTTCTCATAGACATTTAANTAGTCTTAGGTTCCANCCCTTTTGTAAATATTTATCTGACATGCAATATA NCTACAATANAATAATATGTTCAATTTCTAAATGAAACCTAAATGCCAATAATGGTAAACAGATTTGACATGGAATGTTNAGATCTCTCTACRTAATCTGNCAN CGNGATTGAATTTGAGAGCTTGAACACTTCAGATTGAACCAACCAATNTGANAATTTTACTONTGRTCA/NCAAGATCTCCATAAAATTAACCTTAAGCACTAGAGATC TCAGATTATTAGTAACATAAANAACCAACCAATNTGANAATTTTATCACTNATTTTTNGNTTTAGTGTGCTCACAGAAAAATAGAACCTTAAGNAGSAGTTT AATAGCAATTTTGTAGCAAAAGTACATCCATCTCTAAGTCAAAATGGTGTGJANGCTTCTCCAGNATTTCAAAACATGATAGACAAAGTGTCTACACAAACACTT GCATCTGAAGATTTTTTNTCTTCAAGANGAGCTGGAARGAAGCAATATCTGCTGTATCAAAACATACCCACAGTATAACAGATAACCAATTCCTCCTTA TCAGAGTTGTTTGTAGTTTAAATTTGTTTAAAAAGGTCACAGATGACTGCACTTTTAAACAAATGGGAGGGTGGAAAGTNRCAAACTTCTGATGTCTGGATA TCAAGATTGTTTTTATACATAGTCACTTAAACACCCCTGCTGTTGATACRTAATACACTTATTAAGCTCATAAACAGCAATAAACAATANAGCMATANAA TTGTAGTTCTACTTAATCACTGACTGTTACANCTAACATGAGATAAGTGAAGTCTCTATGGTTAAATGAACCTCTAAGACTATGATCTTTTTTTTAAWATN TGGGTATGGTGTCTTTCTTCTTCTTCTTCTTANTCAAGACTTTGAGTGTGTAAACCTGCTCAAAATACATGGTAAATACCTTTCTTNAAAAAAAGA CAGCCCTTACACCATTTCTAGTGGCACAANTATTTGGCAATGTTATGNACCATCTTNAATTTCCCATGTGACCCCTACTTCTGATATCCCTTTTGTACCCAC CCATCTNITTCATATGGGCATNTCCATAGTGAACAAGAGTTTACANTTTTGRATAAGATGNAGATGCAAAACATTAATACTGATGMNAAAAATAAAA AANANAGAAACAAGCAGAGGAAGAGGTGTTAAGCTCTCCTCGACTGTTGGAAATGGTGGTTACAGAAATGATTTGAGATGGGATCTGTGGGGGGGAGAAAA AAANCAAAATTTNGTGTCTTAAAAA
2F2 1F_18 _314	CGCGGCACATCCCCCTCTCGCCCTCTGTGJGCCCCCGGGGCGAGGACCTTCTCGTGGCCGACAGAACCCACCTTCTCCGNTGNAGAGCTGCTCGCCTTCCCCNA
2F2 1F_15	AAGTGAATAGTGTGTTGANGCTAGTGTGACCAAGGAATATTGAGTGTGTGTGCTCTTGTGTCTTGTGCTGAGTGTGTGCCCCNTGNTGTTGTGNGGG GTCACTTACCTGTGACTCTACATATGANGGTTGTGANAAGTGTGTGAGTCTGTGAGCATGTTTATATNCAIGGATGTGTAGTATGCATGCTTTTAGAG

[illegible]

[illegible]

Mark r ID	Secuencia genómica común
2FH2 1F_15 _182	TAAAAAGTAGGGTGTGCTGAGGCCATTTTAATTGTACATCCCTGTTGGTAG TAGTGAGTGTTCCCATGAATAAAACATAATAGAGAGGCGAACACAGG ATTATGCTCTTCAGGTCAGGCTCTAGACATGAAGCTCTCTTGAGCTC ACTAATTTAAATAAATCTTCCTCTTTTCCCATGTACCTATCATCTATTA CCTAATCTCTTCTCCTACACCAAGACTCTCAATACCTCTGAAATGCC GCTTACANCTTTAAATATAATACNATCATCCAGGTGGCTTACCCANGAC AGGACCTCATGGACANTCTCTGTTGGAAATGTAGGANGTTGGAGANAG GAGTATTAAATAGATGGGAATAGATTAAATGTCCATATAAAGAGTAT NATCNATTACCAGNGTAGAACATATNAAAAATAGATAGATTTTATAACA TTGGTCTCTTCTTCCGTGGTATCCGCTGGGTGAACAAACATAAATATCT GGGTAAAGNTATCTCATCCATCCCTTAAAGTCCAGCAAGTCTTAGTGAN TGATGAGCCCTGTAGATGATTAATGTTACACTGTAGGCTGTGGGNG CAGGCAAAAGCTCCCTTGTAGGAAGNAGGTGGGACCTTGGAGCCCT AGCCTGATTGGCTGTAGAGGGAGAGCCCTCATTTGGGCTACAGAGTTAT TGCCATNTGGGGTGACCTCTGGAAGATGACAAGATGCACAACTCTCT CGCCTTCAGGSGATAAACAAGAACTTAAGTATTTCTTATCGGGAAGACA AGGCATNTGGTGAGGTGATGNNACGCTCAGGCTGCACATGAGGAGG GAAGGATTAGGGAGATCATGGAACATCTCTCTCGCGTCTGCTANGG ATACAAATCTGATTTCTCAAGCTTGTGGAGGTCTGACATGACCACAT GNTGCTCTTGGNGATGATTTCCAGGCCCTTNGCTTCCCTGCTCAT GCTTCAGTTTCTCATCTTCTGTTCTCATGTTCTCATGGTGTGAGGT AATGGCAAGGAGACNCCAAAGTGCACCATCCGCTATAGCTGACAGTGA TTTATAGCAANTTTCTCGAAGTTTCTTAAAACTACTGTGCTCATTTCT TGATGCTCCTGNTGTGNAAGTTTGTGACTTNTCACTTCTTAATCTTCT AAGNTATTGACGCTTCTATATATNTCAGCAGCAGCTCTCATCATCT CATCNCCTCTAAATTTCCACCAGCCCATTTTNGTATTCTACAGGTGA AAAANCATGTAAANAAGTAATGONGTAATTTAAGTGAGTAGGCCG ATAGATTGATTATCTCTGAGTTTAAATAGTACTGACGCAAGTATAGT TACCTCCACCAAGATAOCTAGNACCTCTGACGAGTGCCTGAGCTGAT GCCATATGGGACAATTTGAATAATTTAGATAAGCCCAACTGTGATAGT NGTCTTTTNTTNCATAGAAOCTGCTAACGCCACTGTCCAGTCTG AGCTGTATTGAGGATAGGAGATGATGCTAAGCAACTGAGCAGGATC AGAACTGACTTCAGTCTCCAGTCCCATANGAGTATTACCAAGTGT ATACTATTTCAGATCTCTCAANGCCCAATCAGAGAGCACCACAGT AGTTATCTNCCGCATCTGCTCAATAAAATTTGAAGACTGTTCTCCGCTC TGAGGTGGTGACAGAAATANACCATAATAATTTGTTCTCTGAGCT TCCCTGTCATATTTGGGCTACATTTGCAGCTACCAGAGAACAAGAA AAANTGCTAACCAAAATCGAGATGATCAAGTATCAAGGACACAG GAACCTCGAGCTCTGCCCCTCTGTGAGGAAATCTAGATGGTGGAGG CAAACTTGAGCCTCTGAGACATGTGANGTCCATGGAGACTGAGACG AGAACAATTGTGTGAAGTGGATGATGTCATACAAACNNNNNNNNNN TAAATGAGTACTTANTTTGATTGTGTACATATATCTTCGACCAGTGT GTGTGTGATGAGTGGCTTCTCAATATTTGAGCCTATCAATTCATGAAT GAGCAGCATTTGAGGCCCTCTGCTGGTCTCTGCCAAATCACTACTAT TGAAGTAAAAATGTAAATATTTAAACTCTGGCTGGAAATGAGAGGCGAG GTGCCCTCTACCTATTGGGTCAAAGAAAAGTAATNTCTCTATTGTAAACA
2FH2 1F_07 _305	GAGCAGCATTTGAGGCCCTCTGCTGGTCTCTGCCAAATCACTACTAT TGAAGTAAAAATGTAAATATTTAAACTCTGGCTGGAAATGAGAGGCGAG GTGCCCTCTACCTATTGGGTCAAAGAAAAGTAATNTCTCTATTGTAAACA

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Matrícula ID	Secuencia genómica común
2FH2 1F_18 _161	TGGAATNGTCTTCGTAATCAAAACCCCTTGTCAATTTNCTTGCAATAGCCACCCCTTCTCTACACGTCCTTTGACACATTTTATAGATGGTTTNGCCCATACAAAACNTT TCNAATTTNAGTTAAAGTAGGCTNAGNAACACATTTCAAGAACTGAAGTGTTCTTTTTCACCTGCTTTTAAATCAAGCTCTTATATATCTGGATTTTAAACATTTNT AAAAGTAATGTACAGATTAAATGTTTGGATTTTATCAATTTCTAAATGATCTGACGGTTTCTACATATANAATNATGACCTGCAAAAAGATGTGTGTCCTTTA CTTTCTAAATTTTGGCAACTAAATCTGTACTGGTTTATACATCTAGGAACTGATGAGCAACTGCTGGAGGTGTATCTTTTTCATATGAAGCAGCTCTCTAGTGCTTT ACTATTAGACAATAATGGGTGGCTTTTGGCAATATATCCAAACCAATATATTAAGGATTTCTGCTGCTTTTTCATGAGANACCNAGATGATACATTATTTCTAGTAG TTCAATATATAGAGAAATGAATTAAGATTTTATATAAAATTTCTGTGTTCTGGATAAATCTCTAAATNTGAAATTCACCTGTAGAAATATAAA
2FH2 1F_18 _576	CAGCTGCAGAACACANANGACCYNAGTCCCTGTCTATTNGTCTGATTTTCTAARTCACTGTAAATTTTCTACATCTCTGGCCTGAGAACAGAGATGAC CTTTGCTATTNTCAATTAATTAATTCAGTAGTTGGTAAATGTGAATAGGAAATCAAAACCCCTACTYTAAGAGATTTATAGATATGGCTGAGAGGTGGGTGANCANAC CTGACCCACCTTAACTTTAGAGATTCAAAATATAAATTAACCTAGCTGAGTCAACAACTGACATTAATAATGCAATCAAGTAAAGAACCCANNTAAACAGAAACAA ANCTAACCTGCTACCTACCTTNAACCACTAAATATAGAGCTCTGCTGCTGCTTCTTACTGATTTATACTTCAATTAANGGTCAAGAAAAAGCTANATATATGAA AAGATGAGATCTGNGTTTCAATCCAAATCTTTTCAATAAOCCTACTTCTTGAACATAGAGGAGACAGCACTCCCTTATGNAATTTSCAACAGCTCAATCANTCT TACCCACTAATCTTTTAAATAAAGTGAATGTGAGAGATGGCAAGTGAGCAGAGAGCTGGGAACACAGCTCCCTTATGNAATTTSCAACAGCTCAATCANTCT TCACATCTACAGAGAGATCTGTATCTGTAGTACATGGAATCTAATCTGTCTACTAAAGCTGATGCTGACAGCTGCCATCTGTCNCNTCTTCAATGCTCTGAG ACACATTTGAGAAANACNTNATCTAGAGAGAAATCTCAAGAGGTTTIANACTATATGATGCTAATATTTTAGATAATNTTTATGCTAGTTTANTCTTGTGT ATTGAAAGACTGTGATTTCTGGAAGTCCCTAGACAGTACATTAATTAATCTACCTGCTANTTCAACAAAGTGCCTTTTANTTTAGTCAATANAATCAATCTCTGG TAATAATATATGATATCCAGGNATGTATGATGCAAGCAAGTTTTTAGTTTAAAGCTAAGGAAATAAATGAAACAAATACATAGTCTCTCTCTGTA
2FH2 1F_18 _329	TACCCGCAAAAGTTTCAAGAAGTATTACAAAAAGAAAAAATTTTTTNNCCCCAGGAATKGGGCA/GGGGACAGTGGGTGCTGGGAAATCAGTCCCTTGGGACA GGGGGCGCGCCAGGATGTAA
2FH2 1F_13 _112	TCATAGGGCAAAACNTTAGCCACNTGATGACTCCNACTGAACTCTCTATAGACTCCAGGACAAAAATTTTCAGTTTCTAATTTGATNTTCTCCATCTTGCATTTNA AAAAATTAANACATNTTTCNCTGATTCNACTAAAAAGAAAAAATTAATGATCCCTTTGCCAAGTCTTTCAATTAATGTTATTTATCTGTTTATTTGAGGTTTGA ATCTCATACGCTTTAACTCTTTTATCTTATCTTATCTAATCAGCACCATCTCTCTGCTGCTTNTTCCNAAAAGGNTNACATTTTCTTANTTTGAGGCTGAAATTA NACATGTTTGGGCTGAGCAGTGAAGTGGGACCCCTTACCTNTCCAGCTNAGAGCATTTNTTNGCCAACTGTCAAGNGGNGAAGCAAGAACNCNGNAGCAGAA GAGTGCNTTTGATGTAGCAGNAGAGAGATGCAAGCTTTTGGCTCCTCTTTCAGNTCTCTCCACCAAGTCAATATNCTCCCAAGNCNTGACC CATTCGCCAAAAATGAATGATCAGCATCTTCCACTAACCAAGAGTCTCCACCTCTCTCTGCTGCCACCATAGAAAAATCAAAAGCTGACTNTAGNTTTGATTTA GTTGNANTTAGGAATTANACTCTTCTTCTACTACCAATTTCTCCAGTAAATGAATATGAATGTAAATNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN SNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN CTAANATACACCTGATCATNTGNTCTONANCAAAAGCTTCAATGGTCAAGTACTGAACACATTTGCTTATNTATCANAKATTTGCTAGTATNCCTGCTATAACAA GTTCTNCTANTCAGAATNTTAAATGTAGTNCAAAAACANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
2FH2 1F_07 _187	TTTCAAAANACGAACTGTGATATTAAGAAATATANTTGAACACCTAAAAACCTTCTNTAAACACTCTTCTGCCCCCAAGATTTGGGCCCTGTGCTCACAGCNT TATCTCTGTGAGATTTTGACTATAATNACTTTGAGATCTATGATTTTAAATTTCAAGAGAGGGGGAANAAGAAAGGAAAGCAAGAGCTGAGAGAGG AATCTCYGAATGAATCTGGGGATAAANAGAWGTCAACGAGAGATGGGTGACTGCTCCATATTTTTCAGTTCACTCTCCATAAAAGTCACTGTTTAT CTCTYCACTACRTGNAAGAGCTTGAGGACAAAGTACTCTCTCAAGTCTTTTAACTCTCCCAAGAACTGAGNCAGATANAAGGTATCGAATAATGTTT CTGAATATTTTCTAAATTTTACCAAAATAGNAGGTACATAGTCTATTTATGTCANGTAACTTAAGTANTTACGNTTATTTCTTATNAACATTAATAAATAA GACTGTGATGGCAGTGGGCTAAATTTCTGCTGGTTACCAAAAAATTTTCAGCCTGTAAATGAAGTCTGTTAAACATCCCCCAATTTATCATGCTCATTAAGATCA TGGGGGTGCAAGCGGAATACAGAACTGGAGAAATGACCAAGAGATGAATACACATATAGAAATAATAGACCCCTTTACAAATTTGTAAATGCCCACATATTT CNITTTGGAATATGCTGACGAGGCTACTCAAGTGGCTTTAGAGAGATGCAATGATACATTAATAATAGTAGAAANTGTCTTCTCTGGAATGGAATTCAAA CACATGACTGANITTTGNCTCAACTCTAATCTCTACNTCTGTAGTNAGANGTTTAAATCCTATNANATCNCCTCCCC
2FH2 1F_20 _006	TGGGAGAGAAATGTAATACAAATTAATACCAACAGCAATTAGTGAGTACTTCTTCCATGGAGCTGGGAGAGNGAATNGTTGTAAAAATTAATAATGTTTCTACGCTA GTAATCAACTTCTCTATGNTCTTTTANTTACCCCTTATAGCTANTTANTAAATCTCACAATCTCTCTCTCTGAAATGATGTACCCCTTCCNTT CTATCTCACCCCACTGTTCTTGTCTTCTAGCTGTGTAATATCTCATATCKYANCCTGTACCTGCCCTCTTCTAGTCCAGAAATACATGTTTCTCTAA TTCNCNAAATACCACTGCTACTGCTTTGTGTGAAATTTCTCCAAAAAATTTTACTTTTCCAAATAGTGCANGCTCCCTCTCTTAGSATNCAAAACCAACCATG GTCCAGCCCAATCTTTCAGCCTG
2FH2 1F_06	NANATTTACTTTAATCTCATGAGATGCTGAGGACTAAGACNCTGCTCTCCAGGGGCCAAAGCAAGAAATGT- /A/SGNTGNGANGAGGGCCCACTCCANAGATCTACCCTTGGAAATAGGGTCTTTTCCCANACCTGNTGACATCTATTCCNCTGGGCTGTTTTTATTTTCCCTANCC

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Marke r ID	Secuencia genómica común
009	TGATGAGGCCCTGTAGATGAGATTACNTACACTGTAGGCTCNTGGGNTG GGGACAAAGCTCCCTTTAGGAAGNAGGTGGGACCTGGAAGGCCCTC CCTGATTTGGGCTTTAGAGGAGAGCCCTCAITGGGGTGCACAGTTATAAN CCATAGJTGGGGTGCACCTCGGAAGATGACAAGTGCACAAACCTCC TGGCCTGCAGGGATAAACAGAACTTAAGTATTCTTCTGGAAGACAC AAGGCAATNGTNGGTGAGGTGATGNACGCCCTCAGGCTGCTGCTANG GGAAGGATTAGGGAGATCATGGAACATCCTCTCGGGTCTGCTANG CATACAACTGTATTCTCAAAGCTTTGGGAGTCTGAGATGACACCACT GGNTGCCCTTTGNSGATGATTTCCAGGCCCTTNGTCTCCCTGCTCA GGTCTCAGTTTCTCACTCTTTGTTCTCATGTTCTCATGTTGAGTGT AAATTGGCAAGGAGACNCCAAAGTTGACCATCCGCTATAGTGCAGTG CTTATTAGCAANTTTCTCGAGAATTATCTTAAAACTACTGTCTCATTT TTGATGCTCTGCTGNTGTTGNAAGTTGTGACCTTNTCACTTCTTAATCT CAAGTNTATTGAGGTTCTCATATATNTTCAGCAGCCACTTCTCATCAT GCATCCTCTTAAATTTCCACAGGCCATTTTNGTTATTCTACAGTGAT AAAAAANCATGTAAANAAGTAATGCNGTAAATTTAAGTAAGTAAGT TCATAGTATGATTCTCTCAGTTTAAATTAATCTGCTACGCAAGTTTAG GATACCTCCACAGACTAACCTAGNACCTCTCAGGAGTGCCTGAGCTG CAGCCATATGGGACAAATTTGAATAATTTAGATAAAGCCCAACTTTGAT GTNGTTCTTTTNTCCATAGAGAACCTGCTAACGCCACTGTCCAAGTT GTAGCTGTTGTAGGATAGGAGAGTGTGTAAGAACTATGACGAGGAT GGAGAAATTGACTTCTCAGTCTCCAGTCCCATANGAGTATTACCAAGT CAATACTATTTCCAGTATCTTCAAAGGCCCAATCAGAGACCACTTCT ATCAGTTATCTTNCAGTCTCTATAAAATTTGAAGACTGTTCTCTCC GTCTGCGGTGATACAGAAATTAACCATATATAATTTCTCTGAGGTT GGATCCTGTCTATTTGGGCTACATTTGCAGCTACCAAGAAACAGAAA TAAANAATGCATCAACAAATGCAGATGATGATCAAGTCAAGACAA ACCTGAACTCTGGAGTCTGGCCATCTCTGAGGAGATCTAGATGGTGG AAAGCAACCTTTGAGCCTCTGAGACAGTGTGANGTCCATGGAGACTG CTNTAGAACATTTGTGTAGTGGATGATGATCATACACNNNNNNNNNN ATAATAAATGAGTTACTTANTTTGTGATTGTACACTATATCTCGACCA TGAGTGTGTGAGTGGGTTCTTCAATATTGAGCCTATCAATTTGCATGA GCTCTGCTAANAANTAACNTCTTNCANGACTTAGGAGGNCACATCAG TTTCYCTAGCANCCAAAGCCTGTCGAGCCNCCCTGACACAGCCTGGN ACAAGGCGGCTNTGCCCTNTCTGCAAGCAATCANCACAGGCCCTNA TGCCATTTCTGAGCANACCTCGGANGAACCTGGGAGCTGCANATTA CCNGTGACTCAATGNAGGCCCTCATCAAAACCATGNGAGCCCTCCT NNGGAAATTTGACTCGCAGCCCGGAGTGACSAATGNCCTTTTCTGCC AAGNCAAAAGNTTAAANAAGAGACATGCTCTTTGAAGATGGAAGTA GTGCAAAATTTGCCITTAATNTTAGCTTTGTATACCTCTGCTACACAG ACTTNGTTGAAATATATATTAGCAGACAGANTTTCTTRACATTTCTG TCTCTTTTGA AAAAARAANTTTGTAACCATCTCAAGTTTGAAGCAAG GTCTCTTAAGGAGCAAAACTTCAACAAAGGNGAGGACTATTTAAGN AGTGCTTTAGGAAGTGGATAAAGTCAANAGCAACAACTTTCTGAT CCAACGAGACNCGTAACTCTTGTGTTCTGTGGCTGTGACATTCANT GGCTGNGAGCCCTGCCACTGCACAGGAGGAAAGGAGTCACTAGCTAG CTGGACAGCCAGATANAAGCAGCCTNGAAGAAATCTCTAGAGGAGAAA TTTCTCCTCCTCCTCCTCCT
2FH2 1F_06 _129	

Marke r ID	Secuencia genómica comUn
2Fh2 1F_06 _051	AAGCTCTANAAATCTACTANAAAGTNCCTGCAAAAANTAGNAGATGANGAGGACTCTGAKNAGANAGNRRATCANANGAGATGAGTGAGCAGGAAGAGGAGCTTGAG GATGAGJCNCNACNATAGNCAAGACTATCAAGACCTGGAAANAGNAGTGCNGTCTTTTNGNATGACGNTGTCTCTGAAGACAGCCTNGATATTGGNAGAAACAAA GTGGAGATGCTNTCTNCAAAAGGTGAANTCAGGCTG
2Fh2 1F_05 _110	TTCTNACTCTCGGTATTTCTTAAAAAGCANANCAAAATCAATTTACANCCAAAGACATCTTGANATNTCCAAACTTGGGCAAAAGTTGACANCNCAATTCGJTAAGGA GCTGCTTCCCATTAAGAAGAGGATATTAGGAAAGAAAATNATCAGAAANTCTNGNTTAAAC
2Fh2 1F_02 _175	CAAGTGATTCATCNCCTGGTGCCAAACAGCAGCAGCGAGNGTTACCAAGTCTGNTGGGGCCCGGAGCTGGGGAACCTGGGGTCTCTGGAGGGGCAAGAAAG CAGCGATGCTGGCCCGCTCCATCTGCCATCCCATCTGNTCCACACAGCCCTGCNGTAGCTGTTCAGCCCTTCTCTGTGAGTTCCTCATNCTTNTGG TTGGTGAATAATGAGATCTCCCATCGGNGTGCACCCCTCTGTGACGGGAGCAGAACCCCTGCNTNAGCTCTNCTGGGGRAGAGTGGAANATGCTGG GACAGCCAGCTGKAGGGGTCTCAATCCAGCAGGGAGGCCACGATGCTAGGATGCTGAGTGCACAGCCAGGNACTGNAGAGTGGAAGAGGAGGCGGC CCNNGTCTTAACTAAGGTTAGACNCCCNCANACATCCAGGCACNCCCACCCCTAGGCTGTTTAGGTCTGCMAGCTCYGAGAAGGCCCTTAACAA TGNGCAGCTNAGGGTGCMNGCNRGCTCACGNCAGTCCRCCTGCCCCNGGGGTAGATNYGGCCCTGGCCNCCGCTGTGGAGCCTNGGATGTCTGTG CGCCCTTCTTGGAGGCGAGCYGCTGAGGGCTGTGGGACNGGGAGCTCTCTGCGCAAGACNCTCCCAATGCTGNGCNGGGGACGCTGTGATGNGAG AAGATCTGGCTTTGAAGAAAGCCCTTCCACCTGTCTCATGTGGGGTCTCCGGTCCCTGAGCGAGCGGCCCTCTGCAAGCTCCGAGGACTCCCT GCTGCTATCTGGCTGCTATCTGCTGACCTCCAAAGCTCCCATCTGGGSCACAGGCTGCCNGCTGACCCCACTCTGNCCTGTGCCGTGGTGGGCGAG CATCTGGCANGGGGAGNRCNTTTCTCCACACTCGGGCTCTCAGCCCAATCATCCGGTGAAGTTTCCAGCAAGTGGCTCCCTGCCCTCCACCT TGCCAGTGTGGCTCGGGCTCGCMGTCTCCTGCTGNGCTCTGCCCTGGCTGCAGGCTGCATCCAGCTCCAGCTCAGGTCAGGAGGCCACCTCTCCCT CGCTCTCNACCACCAAGCTGCCGGGACCTGTCTATCTCTTCCAAAGTCTCAGGACCTGCTNTCTAGGAGCTCCCAAGCCCTCTGAGCTCTCCN GGGGCTCTCTCTGCTTAATATGTCACANGGTGTGCTGCTGGCCCAAGAAAGGACCTGGAGTGAGTTCTGACACAACTCGATGAAGTGG CCCTCTGCTCCACTGCCGAGTNGCCCTDCTCAGACTCTCCCTTGGCGGAGAAACCTGCCGJGJGCTGACTGTTCTTCTGAAACAGCCTCAGGCTGG AAGGAGAGGATCCACCTTGGCACTTGAAGCACTCAGCAGCAATCAGCCCTGNGGACNAGACCTGNGACCCGCGCCGACAGGNGCCGTCTGGG CAGCTCCCTTCTNAGGCCACNCTGCTCCCAAGAGCCAGATGAGCAGCTCCCAATAGGCCCCCNACACGACAGAGTGCCANGCNGAGGACGGGCGACCC CAGAAATCTCAGACACTGATGCTCTGGAGCCCGGCTGGGAGAYGATGTGACGTGGCTCCAGCTCTGACCTCATGAGCCCAAGCTCCGCTACACACTG GGTCTGACCTGACCTGGGTCCGNGGCTCTCCGGCAGGCTCTCCGGCTGCTCCGGCCCTGAGGCGGNCACCCAGCATCCAGGCCCTGTNTAGTCACTC CCCTCTCAGGAATCTGGGTGATGGCTGACAGGATAGGGGCTACCCAGAGCAGGATGTGGAGGGGGCGGCAAGGNGGAGAGAAATCNACAAAGGCACTATT AGCCACCTGCCCTGATCTTAATCTCAG
2Fh2 1F_07 _179	TTCAAAANACGAANCCTGTCAATAATTAAAGAAATTAANTTGAACACCTTAAANCTTTCTNTAACACTCTCTGCCCCCAAGATGGGGCCCTGTCTCTACAGCNT TATCTCTGTGAGATTTGACTATAATNACTTTGACTATGATATTTAAATTCAGAGGAGGGAANAANCAAGAAAGCTGAGGAAAGAGCTGAGAGAGG AATCTCGAATGAACTTGGGGATAAANAGWGTCAACAGGAAGTGGTCACTGNCCTCCCAATATTATTCGCTTCARCTCTCCCATAAAAGCTCAJTA/ JGTTTATCTCTCAGCTAGTGNAAAGATCTTGGAGCAAGTACTCTTCTCAAGNCTTTTAACTCTCCCAAGAACTGAGNGCAGATANAAGGTATCGATAA ATGTTTACTGAATATTATCTAAATTTTACCATAATGNAGGTACATAGTCTATTATGTGANGTACTCTAAGATANTRACNNTATTCTTTATNAACTAAATAAT AAAAACAGACTGATCGGAGTTGGCAATAATCTTCTGCTGGTGAACAAAAATTCAGCGTGAATGAAGATNCTGGTAACTCCCAATTTATCATGCTCAT AGAACTATGGGGGTGCAAGCGGAAATACAGAAAAAGCTGGAAATGACCAAGAGATGAATACNATGAAGAAAKATACCCCTTACAAATTTGTAATGGCCACA TATTCNTTTTGGAAATATGCTGACCAGGATCTACTCAAGGTGGCTTTTAGAGAGATGCAGATGATATAAATAATAGTAGAAANTGTCTCTGCTGAAATGGCAAT CAAAACAGACTGANTTTGNCTCAACTTAATTTCTTACNCTGTAGTNAGANGTTTAAATCTCTATNANATCNCTCCG
2Fh2 1F_18 _066	NNNNNNNNAGTAAATCAGAACCAACAGATTTCTTAGGATGCTTCAATGACTACAGTCCCATGAGGTGAGTAAACCAATGTTAAACCAATTGGCATGTCAAAATTGAA GCTTCCCTGAGCTAAAGGGTGAATTTTGAATCAATTTTGAACAGAAAAAANTATTAGGTTTAAATAACACTCTGTAATCTTTAAGTCTTACAGACATTCOCAT ACAAAACATACAGATAGAGGACNTGAAAGNCAACACCTGAAATTAAGAAGTACTTTTAAAAAACTAATTAATCTGTCTTGAAGTAATGAGATTTTCAATG TGSATACCACATTGACATTAATACTCAATAATTTCCATAATTTGAAAAATAACATTGGGAGATGAGACTTAATAATGTCAACTATTGTAAATTAATTTTAAAT TAGTGAACCTGAAATTNACCTGCTCAATGTTGTTTATCTTCAATCTAAGCTTTATTTGGAACAGAGTTTGATTTTCAGTGGCAGGCTTAAACGGGTTTGGAG AGAAAAATGATTAATAACAGATGTACTTACAAAAATACATAGTAAATAATAATGCAAGATAAAATATAAACTCAATACCTCAAGTGAAGAGGCTTTTCAGGAG ACTTAAAAAGCAAAAGAGATTTATATTCGTGCTAATAGTAAATATGACAAAACAGCCCAAAATGAATCCAGTATAGTATCTTAJCTAA/ JGTCCTTTTTCAGCTTTTGAATGATCTTGGTGTAGGGGTTTCTTCGGTATGTTCTTTAGGACNTCAGATGACAGAAATACACTGAAGAAACTAGGAA TCTAGGCTTCATCAAACTGCACTTAAGACTTCAAAAGTGAGAAATGTGTGTGATCAAGCTGCAAAATGTGTGATATTAATGTATGTGTGAGTGAATGAAAGAGAAATG ATCTGTGATCAGGAGCAAAATATGACCCCAAGAAAAATAATGTCAAGCTGAATAGAACTCTACNCCATATATTCACTGAGAAATCATGGAATTAATTTATCAAT TACATTAATCATGTCTTAAATTTGTCTCAATTTGAGATGTGTACACCGTTATGATGAGAGTTTCAGTGAATGCAAGCTGACATCATCACTGAACATTTATCAAAAT TGATCAGCTTGGATATTTACTTAATGGATAACTAAATAAAATATCATTTGTTTCCCATATCTCTGCAGTGTAACTATGCTACATGCTGATCNCTAGTTTATC

[illegible]

Marke r ID	Secuencia genómica común
	ANCTACAATAAATAATTATGTTCAATCTTAATGAAACATAATGCCAAT NGNGATTATGAATTCAGAGCTTGAAACCTTCAGATTAAAGTCACAAAT CTCAGTATTATTAGAACATAAANAACCAACAATGTANATTTTATTCAC TAATAGCAATTTTGTAGCAAGTTACATTCATCTTAAGTCAATTTGGT CATCTGAAGATTTTTCNCVTATTCTCAAGANGACTGGAARGAAGAG ACAGCTGGTGGTTTAAATTTGTTTNAAGGTCAGAGTACTGCTTT AAGATTTGTTTATACATAGTCACAGTTAAACACCCCTGCTGGTACT GTAGTCTACTTAATCACTGCTGGTACANCTAATCATAGATAAGTGA GGTAATGGTGGTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTT GCCTTTACACCAATCTAGTGGCAGCANTATTTGGCAATGTTATGNA ATCTCNTTATATATGGCATATCCATAGATGACAAAGNAAGTTTACAT NANAGAAACAAGGCAGAGGAGGAGGTTTAAAGCTCTCTCGACCTGT AANCAAAATTTNGTGGCTTAAAAA TTTGGTCTTTCTTTCTGGTGATCCCGTGGGTGTAACAACATAAATATC GGGTAAGGNTATCTCATCCATGCCCTCTAAAGTCACCAAGTTCTAGTGA TGTATGAGCCCTGTAGATGGATTACNTACACTGTAGCCTNTGGGNTG GGGACAAAGCTCCCTTAGGAAGNAGTGGGCACTCGGAAGGCCCTT CCTGATTTGGGCTGTAGAGGGAGAGCCCTATTGGGGTACACAGTTA CCATNTTGGGCTGACCTGGAAGATGACAGATGACACAAACCTCTCT CGCTGCAGGATAACAGAACCTTAAGTATTTCTTCTGGGAAGACAC GGGCAATNGTGTAGGTGATGNNACAGCCTCAGGGCTGCACATGAGG AAGGATAGGGAGATCATGGAACATCTCTGCGGTCTCTGCTANGGA CATACAACTGATTTCTCAAGCTGTGGAGGCTCTGACATGACCACCA GGNTGCTCTTTGNGGATGATATTCAGCCCTCTGCTCTGCTCTCTCT GGCTCAGTTTCTCATCTCTTTGTCTCATGTTCTCTCATGGTGTGAG AAATGGCAAGGAGACCCCAAGTTGACCATCCGTATAGCTGACAGTG CTTATAGCAANTTTCTCGAGAAATATCTTAAACACTACTTGTCTAAT TTGCATGTCCTCTGNTGTGNAAGTTGTGACTTTNTCACTTTCTAAT CAAGTNTATTGACGTTCTCATATATNTGACCAACAGCTCTCATCAT GCATCNCCTCTTAAATTTCCAGCAGCCCATTTTNTGTTATTTCTAC AAAAAANCATTGTAANAAAGTAATGCGNGTAAATTTAAGTAAGTA TCAATGATGATTATCTTTCAGTTTAAATTAATACTGCTACGCAAGT GATACCTCCACCAAGACTAACCTAGNACCTCTCAGGAGTGCCTGAGC CAGCCATATGGGGCAATTTGAATAATTAGATAAGCCCAACTTGTAG GTNGTTCTTTTNTCCATAGAGAACCTGCTAACGCCACTGTCAAGTT GTAGCTGTTGTTAGGATAGGAGANGTATCGTAAGAACATGAGCAGG GGAGAAATGACTGACTCTCCAGTCCCATANGAGTATTATACCAAGT CAATACATTTTCCAGTATCTTCAANGCCCAATCTAGAGAGCAGCAC ATCAGTTTATCTNCCGATCTGTCATAAAATTTGAAGACTGTTCTCTCC GTCTGCAGTGGGTACAGAAATTANCCCAATAATAATTGCTCTGAGG GGATCTGTGATTTGGGCTACATTTGCAAGCTACCAAGAGAACAGAA TAAAAANTGCATCAACCAAAATGCAGATGATCAAGTCAAGGACAG ACCTGAACCTCTGGAGTCTGGCCATCTCTGAGGAGATCATAGATGG AAGCAAAACCTCTGAGCCTCTGAGACAGTGTGANGTCCATGGAGACT CTNTAGAACATTTGTGTAGTGGGATGATGCATACACNNNNNNNNNN ATATTAAATGAGTTACTTATTTGATTTGTTTACACTATATCTCGACC TGAGTGTGTGAGTGGCTTCTCAATAATTGAGCCTATCAATTTGATG
2FH2 1F_15 _017	

[illegible]

[illegible]

Marka r ID	Sequencia genómica común
1F_15 _038	GGGTAAGGNTATTCCTATCCATGCCCTCTAAAGTCGAGCAAGTCTTAGTGAG TGATGAGGCCCTGTAGATGGAATACNTACATGTAGGCTGNTGGGNCCTG GGGCAAAAGCTCCCCCTTAGGAAGNAGGTGGCACTGGAAGGTGAGGCTC CCTGATTTGGGCTTTAGAGGAGAGCCTCAITGGGGTCACAGGTATAANNN CCATNTTGGGCTGCACTCTGGAAGATGACAAGATGCACAACCTCCTCCTG CGCTGCAAGGATAACAGAACTTAAGTATTTCTATCTGGGAAGACACCTG GGCAATNGTGGTGGAGTATGGAAGAGCTCAGGGTGCACATGAGGAGGAG AAGGATTAGGAGAGATCATGGAACATCTTCGCGGTCTGCTANGGAGGAG TACAAATCTGATTTCTCAAGCTTGTGGAGGTCTGACATAGCCACCATTA GNTGCCCTTNGGATGATTTCCAGCCCTTNGCTCTCCCTGCTCATCTCT GTCCTCAGTTTCTGATCTCTTGTCTCATGCTCTCTGCTGCTGAGGCT AATGGCAAGGAGACCCAGGTTGACCATCCGCTATAGCTGACATGAGGAG TTTATTAGCAANTTTCTCGAATATCTTAAACTACTTGCTCATTTCTC TGATGCTCTGCTGNTGTTGNAAGTTGTGACTTTTACCTTTCTAAATTTCT AAGTNTATTGACGTTCTCATATATNTTCAGCACCAGCTTCTCATCATTT CATGCTCTTAAATTTCCAGGCCCATTTTNTGTTATTTCTACAGGTGAT AAAAACATTTGAANAAAGTAATGGTAAAGTAAATTTAAGGTAAGTAAG TCATAGTATGATTTCTTCAAGTTTAAATTAATCTGCTACGCAAGTATAG GATACCTCCAGGACCTAAGCTAGNACCTCTCAGCGAGTGCCTGAGCTG CAGCCATATGGGACAATTTGAATATTTAGATAAGCCCAACTTGTATAGT GTNGTTCTTTTTCATAGAGAACCTGCTAACGCCACTGTCCAAGTTG GTAGCTGTTGTAGGATAGGAGGATGCTGAAGACATGACAGGGATGAGG GGGAATTTGACTGCTCAGCTCCTCAGTCCCATANGAGTATTATACCATG CAATACTATTTCCAGTATCCTCAANGCCCAATCAGAGACACACATGAT ATCAGTTTATCTTNCSCATCTGTCATAAAATTTGAAGACTGTTCTCTCC GTCGCACTGGGTACAGATTTACCCATATATATATTTGTTCTCCTGAGG GGATCCTGTATTTGGGCTACATTTGCAGCTACCAAGAGAACACAGAA TAAANANTGCATCAACCAATTCAGATGATGATCAAGTATCAAGGACAC ACCTGAACCTTGAGCTCTGAGCCTCTGAGGAGATCTAGATGGTGGAG AAAGCAACCTTGAGCCTCTGAGCAGTCTGAGGAGATCTAGATGGTGGAG CTNTAGAACATTTGTGTAAGTGGGATGATGATACACACNNNNNNNNNN ATATTAAATGAGTTACTTANTTTGTGATTTGATACATATCTTGACCAAC TGAGTGTGTGAGTGGGCTCTCAATATTTGAGCCTATCAATTTGCATGAT GCTNACCGTCTACTNGTGGCTAGCTGTGACTCCAGTACATCACTGATAT TTAANTTTGAGTGAATTCCTAGAAAGCTCATATAACTATTATGAAAT CATTTCTTGGTTAGTATTACTTACTGTGTAAGACCAAGAAATGGTAAAT AATCTTGCTTACATCAATCACAGNAGGAAATGCAGCTATTATTACNG TACRGAATGCCTAATAYCAAGAAATTCATGTACAGATACCTGAACCTCA TATGGTCCGCTGCTCACCAGTGAAGATCTATCTTTGATCTTCAATCA GCTAGATAACTAAACCAAGATTGGAACACTAAAAGCTGGAGGAGGGA AGGGGAGAAATATAGAAAGATTATCATCGGATTTGGGATNCAAGRCA CCCCCTCCCCAATATTTNGACATAAAGTCTACAGAAANAGAGTCTCA TAAATTTAACAGGATACATATGAAGCAGTATCTTAAAGATGATATAT GAANACATAATTTATATACTATTCAAAACAAACAAAAANANCTTACT GTCAGGAAATATCTAGAAAGKCATATATAGAGTGGCCTAGTTTAC CTTCGTTGACCTTGCTTTAGAGATAAAATATATCTGNTTGTATAGATAG AAATTATACGATTAAATCAANATATTTCTTATATAAAGCCCAACTTAA AACTCCAAATTAATTTGTGAATTAACACTTCTCCACTATTATCTGCAAT
2F12 1F_07 _115	GCTNACCGTCTACTNGTGGCTAGCTGTGACTCCAGTACATCACTGATAT TTAANTTTGAGTGAATTCCTAGAAAGCTCATATAACTATTATGAAAT CATTTCTTGGTTAGTATTACTTACTGTGTAAGACCAAGAAATGGTAAAT AATCTTGCTTACATCAATCACAGNAGGAAATGCAGCTATTATTACNG TACRGAATGCCTAATAYCAAGAAATTCATGTACAGATACCTGAACCTCA TATGGTCCGCTGCTCACCAGTGAAGATCTATCTTTGATCTTCAATCA GCTAGATAACTAAACCAAGATTGGAACACTAAAAGCTGGAGGAGGGA AGGGGAGAAATATAGAAAGATTATCATCGGATTTGGGATNCAAGRCA CCCCCTCCCCAATATTTNGACATAAAGTCTACAGAAANAGAGTCTCA TAAATTTAACAGGATACATATGAAGCAGTATCTTAAAGATGATATAT GAANACATAATTTATATACTATTCAAAACAAACAAAAANANCTTACT GTCAGGAAATATCTAGAAAGKCATATATAGAGTGGCCTAGTTTAC CTTCGTTGACCTTGCTTTAGAGATAAAATATATCTGNTTGTATAGATAG AAATTATACGATTAAATCAANATATTTCTTATATAAAGCCCAACTTAA AACTCCAAATTAATTTGTGAATTAACACTTCTCCACTATTATCTGCAAT

246

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Marke r ID	Secuencia genómica común
2Fh2 1F_18 _567	CAGCTGCAGAACCCACCAANANGSACCYNAGTCCCATGTCTATTNGTTCAGTGGTTCCTTAARTCACTGTAAATATTTTCTACATCTCGCCCTGAGAACACGAAAGTAC CTTTTCTATTATCAATTAATTCAGTAGTTGGTAAATGGAATCAAAACMCATYTAAGATATTAGATATGCTGAGAAAGTGGGGTGNCAICGA JACCTGACCACCTTTAACTTAGAGATTCAAAATTAACCTTAACCTAGNTGAGTCAACCACTGACATTAATCAARCATCAAGTAAGAACCCAAAGTAAACAGAA AAANCTTAACCTGCTACCTAGCTTNAACACATAATATAGAGCTCTGTCNTCTGTTCTTACTGATTTATAACTCAATTAANGGTCAAGAAAAGCTANATATAT GAAAGATGAGATCTGNGTTTCAATCCAAATCTTCTTCAATTAACCCCTACTACTTGAACCCATAGAGGAGACAGGAACCTCCCTCCCTGTTCTTTCTTTCTTTCA AATCCCACTAATCTTTAATTAAGAAGTGAATGAGAGAGATGGCAAGTGAAGAGAGCTGAGGAGAGAGCTCCCTTATGNATTCCTGACCAAGCTGAATCAAN TCTTCACATCTTACAGAGAGATCTGTANTAGTTACATGGAATCTAATCTGTCTACTAAGCTGATGCTGATTAATTTAGATAATNTTATGCTAGTCTTANTCTTGTG ACACATTTTGAGAAANACNTNATCTAGAGAGAGAACTTCTAGAGAGAACTTCTAGAGAGGTTTANACTATATGATGCTAATATTTAGATAATNTTATGCTAGTCTTANTCTTGTG ATTGAAAGAACTCTGATTTCTCGGAAGTCCCTAGACAGTACATTAATTAATCTACCTGANTTCAACAAGTGGCTTTTANTTAGTCATANAATCAATCTCTGG TAATAATATAGTATATCCAGGATGTATGTCAGGAAGTTTATGTTAAGCTTAAGGAAATTAATAATGAAACATACATAGTGTCTCTGTGTA
2Fh2 1F_07 _349	TTCAGAGCAACCATTTCTATTCCTCTCCATAGTAATGTAAATAACCATAGTTCCTATTTCTACNAATTTCTGCTACATAAGAGGCTTTAAATATCTTAAAGAA TRTAACACCAATTAATAATTTGGCAAGTAGAAGTAANGATACATGATCCTGAGATTTCACATTTCAAAATGTATTAAGCTACATATTTTACAATAAATCTTTAGG AACAAAGTTGTCTCTCTCTGACACTGNTNTCAAAACCTGTCTAAAGCTTTGAGTGATGTTGATTANTCCTTTTATTTGGGGCTCTTATAGCNGTATTATAC CAGATCTGCCAGTCTTCCANGTAGTCCCTCAACTTTCAANGGATNTTCTATTACCAATGTATNATCGAANAATTTTACTAATYTGTTTCTTGAAGCTCAAT GTCCATGTCTCTCTCCCTCCAGCTATCCCTACCCTAATACTSTANTTTTCACTCTGTCAAAAGTCCATATGTTGCCNGTAACTACCAATAAGAACCTIAJTA TTCTAAAGCTTGACATTCMAATCTTTTCAACTAGCTACATCACTTTTCCACTGCTCTCCCTCAGGAGTAGGCTTTTAAAGCAAAATGACCT ATTCTGAGATACANAACACCTTTCCAGATCAGAGACATCAAAAGCCATTCAGGCTTCAYTGAGACAAAGATANGCATTCACCTCAGATAACAGTAAGNAATCAA CTTATAGGAAACAGATCTAGCATGTCTNTANATGAGATAACCCNGTGGCTCATGCCATGTCCTTAATTAACNCGCCCTAATTTGCTTCTTCTACTTCT CTGAACCTNTATCTCAATCTACNATCTTTTCAAAAACCCAAACACAGATCACCTCACCAYTACCTGCCCTTCNCCNACCCCAACCCATGCCCTGTGGCTT TCAGGTCATTTATTTTGAATAAACTGTATCTCAATTTTACTGTTCTCTTTAGANTCANACAGCTGAGATTATGATAGATTCTAGTAAGCTGAATCGGAAGR AAAGGATATTACATTCNAGGCCAATTTTCAATGCTTTTTGGAGATCTGTTAAATTC
2Fh2 1F_12 _053	TAAAGAGGGAAGATGACTTTCTNTAAGNGTGGAAATTAAGAAAAGTAAGATAGCGGATAGAAGCTTGAAGTGAAGCAGGTTCCAGGAAGTTCCTTTGGTNTTTG TTTTGTTTTAAATGAGTGAAGANTGNTATTTTGGAGAAAGATGCTTGAAGATGCAAGAGTCAAGAGTCAAGAGATGATCAAAATTCAGAAAGNAGCAGAAAGTGATA GAATAAGAGCAGCAAGTGGAGANTANTGTTAATGAAGAAAGGNTGCTCTTGTATGAAGTGAAGGAGAGAGATGAGTAAGACCAAGACTTGAAGTCCCT AGTTAATAGAGGGAGATCTCTCTTTGANTGCAACARTGGTATTTG
2Fh2 1F_07 _028	ATAAGCTTTGTGAATATATCGNTGTCTAGCAATNACTCNGTGACCTAATGGTGCCCTCAATTAGAGGGTTGACTTCCATGTGAGGCGAGAGGAAAAAGAAAAAN SGTAATMCAAGTCTCGGAAGAAATCTGCAATGTCTAAMAAAGTACACTTAAGCCCTCATGATNAGGAAGAAATGAATCATTTTTCATAAANAATTNAGAAGCAACT NANCTAGTCTCTTATTATAGATGACCTATTAAAGAAAGGTTATCTTTTAGGGTCTCATGGAATAGGAATGAAGAAAGTTCTTCTTNCATATCAAAAGGG ATTATAGACTCTTACCATAAATAATAGCAATAAGAAAGCTAAGAGATTGACNAATCAATTTAAACCTCATTTGTAAGACANANATAATAAAGCTGNCATAGGA AAGCTACTCAACAGCTGTGAWAAGCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN CAATAAACTGACAGCAAGACCGCTTTCTCTCCACTCTGAGGCGAGATAAGAAATGAGTGTTAATCANTCATGGTTTTAATTAATTTTCCAAATAAGG ATAAATACTCTGTCTGIAJTTCCCTCTCACCTGTACTACTAGGCACTCTGCAATAAGACTGAATTAAGTTTTTAACTGGACTATAAATCTAGGAGCC AATTAAGACGTTACAGAGTACATCATCAGAGGACTATAAATGGCTTCAAGTCAAGTGAACATGAACCTCAAGTGAACATGAACCTTAAAGACNTTAAATAAGTGA CATTTGGGANAAGGCATTCAATAATGATTCATTGTGAAGTATTCANATTCANATAAAGAACTCTAGAGCTAAAGCTGTATTCAAATAGTTAGTCTTTAAATTA TGTCACATNTTTTGTGAGAGGCTCTNANNCCTGATATTTAATTTAATGAAGTCTCAGTATGTTATTTAATTAACNAAAGTGTGATGATATTGAAATG TCTACCTTCAGGCACTATACCTGGTGTATGGTCTCTTTCTGGAACCACTGTCTTCCACTCCCTAGTTCATATCAGTATCAATCCCTCAGGAGC TAGATCTGATTTTCCATACCTAATGTTCTCTCTTCTGGAAGAAAGTAAATGTATACACAACTGGAACCACTTCAATATCAATCCCTACATNATNGGGA ATTAAGAGTAGGGTGTGCTGAGCCATTTTAATGTACATCCCTGTGGTAGGGAAGTATGAAGGAGATAGAGNAGCCCCAAATGGTNTAGAAATTTGTGCTG CTTAGTGCAAGTTCCTCAATGAATATAAACATAATATCAGAGAGGGGAACAGAACTCAGAGTCTCTTGAAGTCAANCCATTTGCACTTAACAAATTCACCTTGCCTTT AATTTAGTCTCAGGTCAGGCTCTAGACTAGAACTCTCTTGAGCTTCAACCCAGCTATAATTTGAATTAACCTAGTACTGAAAACCTGTRTATCCAAATGAAC TACTAATTAATAAATAACTTTCTCTTTTCCCATGTGTADCTATCATCATTAATAAAGGCATGGAAATGTAAACCTGGAAGACAGAGGCTTGAAGACCACTYAAATCAT TCTAATCTCTTCTCTCAACCAAGACTYCTCAATACTCTGAAATGCA
2Fh2 1F_02 _206	TNCAAGTTTTCATCTGTTNTATTCAGTTTGTCTCGAGGGGCAAAATCAACAGTAGTAGATCAACAACATTTATTTGATGGCTCACAGNCTNATCAGTAAANCN GAAANACAGAAATGTTACACNAGTTGCAAGAAAGDACTCTCGNGTTTCACTGACATGATAGCAANWGAAGAAATATAAATGCAACAGGTGTTAACTATTAGAA CAGTACTTGAAGTACCTGCTCATNTCTAGCAANTNGGACNCTGNCNGNACCCCTCATNTATCACTGCTGATTTCTTNGACATGAAATYAGCACTTANGAA AATCTTCTANACTNACTCTGGCTGNACNTAGTGGTGTGTTNCTGACGGCTGGCATGTGTCAGGATTTCCANTATCTTGTTCTGTTCTAGGGTNAATCG GGCTTCTTTCAGGCCAGTNTGTGCCACTNCTGATTCNCCCTTCAGCTGATGACAAANTTTCGCTNCTAGCTCCAGATCACCATGCTCAATGCAATAGGANGCATA

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

ACTCCCATTA TACTCTTCAGTAGAAAA TAACTTTGGGGTAA CAA[G/A]GAAGGNAGGATAAAATACACAAATAAACTTGGTAGAAGCAT

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

290

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Mark r ID	Secuencia genómica común
	CANC GGGGAGGAGCGCTTGANGCCCGAGATGAGCACCAGAGGAGGAGAG CAGTGGGGAGGAGCNCAGAGCCCGAGATGAGCAGTGGGNGGGCN GGAGTCAACITTCACATCGACACTGANGAGNACAGTGTGAGCGAGCGG GGCTCGSTCTGNGTGGGCTGTGGGCTGGAGAGGCGCCCTCT TGGCGCCACATCCTGAACAAAGCCCTCTGGAGCCCTGTGGGAGAG AGCGRGTCTGAGGCTGTGAGCGGACGTGACATCAGCCTTGTATG GAGCCAGGTGCGGGGCTGCCATCCCGCCCAAGCCCTCTGCCAGGAG GCTCGCAGNAGNAGMACCGTCTGCAAGCACTGGCGCCACAGCGAG TCAGGGCATCTGTCTCACCCTCAGCTGGAGCCCTGTGTCTACTGA GAGGTTTGGAGCCCGCCCTCTGAGAGGCTGCTCAAGAATGGCCCG GGCAGGTGCCCGNAGACCTTGGAAAGAACAAAGCCCTCTCTGGAGG CATGTACCCCTGGCTAGGGGTGTGGAGGCTTCTATTGGAGCTGAGGCA AGTAGGGGTCTGTCTGCCCTGTGCCCGCCACANGGTGGTCTCTGCC ACCTAGTCNCATGTCACCGCCCGCCACNACATGCGAGGACAGGC CTAGGNCAGGAGCGAGTCCACCCGCGAGCTGCGNGGCTGATAAGACC GGGCGAGGGATCTCTGTAGGAGGTGCGAGCTCTTAGCTGAGGCCAA GCGCTCATCTTGGAGCCAGGAGGCGCCNGTGGTGTGGTGGCTGCG TGTACGCTCAGCATGCTGGAGGCGCTAGNGGCCCTCAGGNCCTNACT TGCNRGAGGCTAGGGCCCTCAGGTGCTGACTGAGCCCGGATCATG GGGGCCCTCAGGGCCCTGGCTGAGGCC AAGATATTANGATGGGACATGATTTGTAAGTTCOAAGGCAARAGATT GAACCGTTTGGTCACAGATGTGACAGAGAACTTGCAGAGTGCAGC ACGGAAGGATTAATGAGCCCGAGGACATTCNGAGACTCCAAAGTCTT TATTTAGGCTGTACATCTGATGATGATTTTATAAATATTCATAC GGATCCCAATGTCTGNGTGTGAGGCGAGTTCATGTGGATAGTT CCAGTAGTATCTGAAAATNAAAWAATGAAGTATCTAGGAACAGCTG TTACATAGAACAGAAATGGAAATTTCTCAGNITAAAGCATGTGCCCT NNCTAACTAAGAGTATCAGGTATTTATATATTTGCAAGCAAGCAGAG GGCTATTAACTCAAGCCAAATTAAGGATTTCTGTATAGATTANTCATGT ANAAAAATTATAAATGATCTCTGTTTCTGTCAGAGATTTAAAAAAGT CAITAGTAAATTAATGAGGCTGATTTTAAAGGAAATATTCGACCTNTG TATATGTATTCATATANCNTATACATATTCAGTTGATTTTATAAACA AAATTAANTAAATTCCTGCATATGACATTCCTTACATAAGCGAACACTAA AGCAGCAATATTACATGAGACTGGCAGATAGCTATTATCCTCTTACAGA MTGCCNCTTAAAGGCTTCTAAGAGCTCAGTTAATGCTTTGACTTAAC GGTTTGGAAATGAATCCTAAGAGGCGAGGATCTTAAGCAAGGAAAGAA CTANWACATGTTCTCAATTCATTATATTANAGCTTCTGAGTGAATG GACAGATTATTARTAYAAATTTGGGCACTGTGGTNTAAGATATCTGAGT AGAAAGGTTTGGCCACTCTTACGGCCCTAGNGAGTGTGACAGTTCGCT TCTTGGCTTTCATATTAAATGCTTTTGGGAGACATATATAAATTTTA ACATTACTTTTAGATNCCTAGAAATTTTCTGTCATCTGATCAATTC ATTTCTCATATTTGACAGAGACAGTCTCANTACATGATCAGATGCTTTT GATTCAGAGAACTCATTTTGGCTCAATATATGTAATAATTTGTTTAT GAAAGAAATAAAATTTATKCTATTGTTTCTGTTTATTAATGAATTT TACCTTAGAAGTACAAGAAATTAAGTAAAGAAATGTTCAATTTGTTTAA AAAGTCAATATTTGTTGGCATCAGAAACAAATNAGGAGCAATTCGCT TGTNTNATTAGGAAATGTTTATGTTTCTTCTCCCTGATTTATGTTGAT
2FH2 1F_07 _437	

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Marker ID	Secuencia genómica común
AAAA	AACATCTGTAANAAAAAGTAAATGCNGTAATATTTAAGGTAAGTAAGCCATAGATGATTAATCTTCTGTAATTAATCTGCTACGAAAGTTATAGTATACCTTCCACCAGATCAACTAGACACCTCTCAGCGAGTCCCTGAGCTGACGCATATGGGACAAATTTGAATATTTAGATAAGCCCAACTGATGATGNGTTCTTTTNTCCATAGAGAACCTGCTAACGCCACTGCTCAAGTTCGTAGCTGTTGTAGGATAGAGAGTGATGTAAGAACAATGAGCAGGATGGAGAAATGACATCCGACTCCGACATGCGCATANGAGTATATACCAAGATGCAACTATTTCCAGTATCTTCAANGCCCCAAATCAGAGAGCACCACATACAGTTATCTTNCGGACTGCTCATAAAAATTTGAAGACTGTTCTCTCCGTGCGAGTGGGTACAGAAATTAACCCATAATAATATGTTCTCTGAGGTGGATCTGATATTTGGGGTACCATTTGCGAGCTACCAAGAGAAACAGAAATAAAAAANTGCATCAACCAAAATGCAGATGATGATCAAGTATCAAGGACAACCTGGAACCTTGGGACTCTGAGGAGATCTGAGGAGAACTAGATGGTGGAAAGCAACCTTGAACCTCTGAGACAGTGTGANGTCCATGGAGACTGAGACCTINAGAACATTTGTGTGAAGTGGGATGATGCATACAAACNNNNNNNNNNATATTAATAATGAGTACTTANTTTGTGATTTGATACATATATCTCGACCAACATGAGTGTGAGTGGCGTCTTCAATATTTGAGCCTATCAATTTGCATGAAATATTTANGATGGGACATGATTTTAAAGTCAAGGCAARAGATTTGAACGTTTGGTACAGAAATGTGAACAGAAAGCTTGCAGAAATGTCAGCAGGATAATGGAGCAAGCTTACGAAAGGATAATGGAGCCAGGACATTCNGAGACTCCAAAGCTCTTATTTCTAGGCTGACAGCTGATGCTGATGATTTTATATAATATTTCACTGGATCCCAATGCTCGNGTGTGAAGGCAGGTTCACTTGGGAATAGTTCCAGTAGCTATCGAAATNAAAWAAATGAAGATCTCTAGGAACAGCTCTTACATAGAACCAAGAAATGGAATTTCTCAGNTAAGCATGTGTGCTGTGTTNNCTAAATGAAGATGACAGGTATTTATATATTTGCAAGCAAGGACAGTGGCTATTAACCAAGCCAAATTTAAGGATTTCTGATAGATTAAGAACTGAGGCTATTAATAATCTGTGTTCTGTCAGAGATTTAAAAACTGTGTTNAAAAAATACCGTGTAGTCCAGTTTATGCAAGGCACTTATATGGCATAGTAATCTGCAAAATGTTTAAAGGAAATNCGACCTNTGATATGTTATTCATACATNTATACATTCAGTGATCATTTATAAACCAAATTAANTATCTGCATATAGCATCTCTACATAAGCGAACACTAAAGCACGAAATATACATGACACTGGCAGATAGCTATTAATCCTCTACAGTTMTGTCNCTTAAAGCTCTTAAGGAGCTCAGTTAATGCTTTTGACCTAACCTGGTTGGAAATGAATCCTAAGGCGCAGSKATCTTAAGCACAGGAARAACTANWACATGTTCTCAATTCATTATATTAATANAGCTCTNCTGCAGTGGGACAGATTAARTAYAAATTTGGCAGCTGGTNTAAGAAATCTCGATGAAGAAGGTTTGCACCATCTCTTAGGGCTAGNAGTGAACAAATTTAAATCTTGCATATTAATAATGCTTTTGGGAGACATATATAAAATTTTGAACATCTTTAGATNCTAGAAATGAAANTTTTTCATCTATGCAATTTATTTCTCATATTTGAACAGACACTCTCNTACATGATCAGATGCTTTGAATCAAGAACTATYTTGCCCTCAATATATATGTAATAATTTGTTGAAGAAATAAAATTAATGATCTTNTTCTGTTTATATAATGAATTTGACCTTAGAAGTACAAGAAATTAAGTAAAGAAATGTTCAATTTTGTATTAATGATCTTAAGTATATGTTGGCATGACAGAAACAAATNAGCGCAATCTTAAGTCTAAATATTTGTTGGCATGACAGAAACAAATNAGCGCAATCTATGNTNATAGGAANAANTGTAGTGTGTTTCTCCCTGATTTATGTTTGTGTTTCCATATTTGCTACTGCTTTAAGAACACNAGTGTATCCTTAATGCTTCAGATCAAGGGGTGAATAATATTGATACCTCAATATTCACATACATATTTTACTCTTTAARTAACGACAAYGCACATTAATCTGTCATAATAA

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Mark r ID	Secuencia genómica común
	TATTTTACGCASATAANATATTTGTGCATAAAAT
2FH2 1F_07 _351	TTCAAGAGCAACACATTTCTATTCCCTCTCCATAGTAATGTTAATAACATAGTTCCTTTTACNATTTCTGTCTACATAGAGGCTTTAAATATCTTTAAGAAA TRTAACACCATTTTAATAATTTGGCAAGTAGAAGTAGATACATGAATCTCTGAGATTTTCACTTTTCAAAATGTATAAGCTACATTTATTTTACAATATAACTTTTAGG AACAAAGTTGCTCTCTCTGACACTGNTTNTCAAAACCTGCTCAAAAGCTTTGAGTGATGTTGATTANTCCTTTTATTTGGGGTCTTATAGCNGTATTATAC CACATCTGCCAGTCTTTCCANGTGAATGCTCAGATTTCAANGGATNTTTCTATTACCAATGTATNATCTGAAANATTTTACTAATGTGTTTCTGAAAGCTCAAT GTCTAGTCTCTTCCCTCCCAAGTATCCCTACCATTTCAAGCTGATNTTTTCCACTGCTCAAAAGCTCATATGTTTGGCNGTAAACATACCAATTAAGAACCCNAAT CCTAAAGCTGACATTCAAATCCTTTTCAACTAGCTACATCCACTTTTCCAACTCTTTTCCACTGCTCTCCCTCAGGAGTAGGCTTTTATAGCAAAATGACTTAT TCTGAGATTAACAAACAACTTTTCCAGATCAGAGACATCAAAAGCCATTCAGGCTTCATGTAGACAAAGATATGTGCAATCACTCAGATCAACAGTAAAGNATCAA CTTATAGGGAACACAGATCTAGCCATCTCTNTAANATGAGAGATACAAACNGTGGCTCAGCTGCTCTTATTAACACNGCCCCATTTTGGCTTCTACTCTT CTGAACCTNTATCTTTCAATCTAGNATCTTTTCAAAACCCCAACACAGAGTCACTCAGTCACTCACTGCTTCCNACCCACCCCAATGCTTGGCTT TCAGGTCAATTTATTTTGAATTAAGCTGTATCTCAATTTTACTGGTCTCTTTTAGTANTCANACAGCTGAGATTATGATAGATTCATTAGTAAAGCTGAATGGGAAAGR AAAGGATATTACATTCNAGGCCAAATTTTCAATGCTTTTGGAAAGATTCTGTTAAATTC
2FH2 1F_18 _176	CAACGGCCAGGGTGACACTGTTACTGTGGGCCATGATCTTTGTGCAAGACAAGTAATAAGAAATGAGTGGTGAATAATGTGCTCCAAATCCACATTC
2FH2 1F_15 _160	TATTTGATTGACAATGAAATNGTCTNCAGTATGCAATTAAGACACATAGATTAGTTTINAGAAAGTNTTGGNTGTAATATTTAAATGTTGGACAGTGTCTTTAA CAAGTNTATTAACCCNCTCCAAACAACTTGGTAARAGAAAGNTCTCTCAGTTTCTCTGGAACCTAAGCTCATCRNGGTAGGATACCAGCAATAGANGRAAAA TTGNCACATTNTGATGCTGACTGCTCTCTACRTNTATCTGATGCGNGGCTTCAGGCGAGANAATCTCTGTGTTAGAAATTTTTCNCAAGATATTGTGAG TAATNTAGTGTGAAGTAGGNCATTTCTANAGAATANCNGTAAGGGGTTTCTCTTCTCATAGCACCCATANGACCTTCTCTGCTCCNCACATACACANAATTTTNTAC CTCAGTTTTC
2FH2 1F_13 _107	TCATAGGGCNAACNCTAGCCACNTGATGATGACTCCNACTGAATCTCTATAGAGTTCAGGACAAATTTTCAGTTTCTAATGTATNTTCCATCTTGCAATTTNA AAATTTAAANACATNTTCTCTGATTCNACTAAAAAGAAAAATTTGATCCTTTGCGAAGTCTTCTCAATTAATGTANTATATCCATTCATTNGGGTGTGA ATCTCATAGCNCCTTTAACTCTCTTATCTCTNTATCTAATCAGCCACCATCTCTCTCAGTCTNTTCCNAAAGGNTNACATTTGNTTANTTTGAGGCTGAATTA NACATGGTTGAGGCTGAGCAGTGAGNTGGACCCCTTTACCTNTCCAGCTNAGAGCATTTNTTNGCCAACTGTCAAGNGGAGCAACACNCNGANGCAGAA GAGCTGCNTTGTATGTCAGCAGNAGAGAGATCAGAACTNGTTTGGCCCTCNTTTCTCAGTCTGCTCCACCCAGTACATATNCTCCCAAGNCNTGACC CATTCGCCAAATGAATGATCAGCATCTGATCTCCATCAACAGAGAGTGTCCAGCTCTCTGTGTCGCCACCATTAGAAAATCAAAAGCTGACTNTAGNTTGTATT TAGTGNANTTAGAATTAANCTCTTNTACCTACCAATCTTCTCCAGTATGAATGAATTAATGRTAATNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNSNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN TTCTAANATACACNNTTGAATCATANTGTNTCTNCANCAAAAGCTTCAATGGTCAAGTCACTGAACTTGTCTATNTATCANTNACATTTGCTAGTATNCTGCTATAACAA GTTCTNCTANTCAGAAATNTTAAATGTAGTNCACAAACANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
2FH2 1F_03 _005	AAGAATAGATASCTTAAGGTAGGGAGGCTTTTAAATNGAAAGAGGCCACCTAGAGGCTCAAGAGCAANTAAATAAAACCCACAGNAAGTCAGTAAATATG TATATAATGTTAAACAYACATTAATCACATATGATGTAATGACATTAATAACTAGTTTGGTCATCAACATGATGGTGGCTATNTGCACTTGTGAANTTTAA GAGANAGGAAATATANAAGAGTTGAGAAATGGGATGAATTTCTACTCTGGTAGGCTGATGCTTTNAAACCAATATTTCTCTCTAAA
2FH2 1F_15 _042	TTGGTCTCTTTTCTGGTGTCCGGTGTGAACAAACATAAATATCTTTGGAGCACAGAGTATTTTAGAGGGTTTCTAGGAAATGATATTAGAGGGAAGT GGGTAAAGGNTATTCCTATCCATCCCTCAAAAGTCCAGCAAGTCTTAGTGAATCTACATGAATGTTCTTTTATNAGAANTGGAGACCTTGNCCATGAGAGATGTCA TGATAGGCCCTGTAGATGGAATACNTACTGTAGCTCTNTGGGNTGTTTANGATGAATCCCTTTTCGAGCAATTAAGCACAATGCTGNTGGGATCCAGGCA GGGACAAAAGCTCCCTCTTAGGAAGNAGTGGGACCTGGAGGCCCTCACTGAGGTGGACACTGGTCTGTGCTGGCTGCAAGTGTCAAGAGGCAATGAG CCTGATTTGGGCTGTAGAGGAGAGCCATGATGGGCTGAGAGGTATTAANATGTCTGCCATCTTCAGCTGANCAAGCCCATCTGCTGCTGCCAGTGTCAATG CATNTTTGGGTGCTACTGGAAGATGACAAAGTGCACAAACCTCTCCACTAATATCCACTACTAANCACTCAAAACNACCTGANTCCANAATGGATG CGCTGCAGGGAATAACAGAACTTAAGTATTTCTATCTGGGAAGACACTGCCAATACTACACTTTTCAAGAAAATAGTTTGAATGTTTAAANATGACTGAA GGGCAATNGTGGTAGGTGNNACAGCTCAGGGCTGCACATGAGGAGGCTCCCTCCCNATGCAGCTTTTCTCCAGGAACCTGCACCCAGGAACCTGAGG AAGGATTAGGGGAATCATGGAACATCTCTTGGCGGTGCTGTGANGGAGGAATAAATATGAGTAAANAATTCCTCNGAATAAGATGGGCATTTGTTCA TACAAATCTGATTAAGCTTTGGGAGGCTGCTGACATAGCCACCATAGCTGAGAACAAACATTTACCCNCTCCNTGCTGCGGAGGTCAAGCAGNCTGGAG GNTGCTCCTTNGGAGATATTTCCAGGCCCTTNGCTTCCCTGTGCTATCCCTGGGCTCTGTGTGAGGAGTCTGCTGAGGAGTGTAGTGTAGTGTG GTCTCAGTTTCTCATGTTCTCTCTCATGTTGCTCTCTCATGTTGAGGTTAAGAACTCATCTGCAACATAGCACATGACAGNATATCTCTCTGTGGGACAAA

[illegible]

Marker ID	Secuencia genómica común
2FH2 1F_02 156	ACCTGAACCTGGAGTCTGGCCATCTCTGAGGAGAACTAGATGGTGGGA AAAGCAACCTTGGAGCTTGGAGAGGATGTGANGTCCATGGAGACTGAGA CTNTAGAACATTGTGTGAAGTGGGATGATGCATACAAANNNNNNNNNN ATATTAAATGAGTACTTANTTTGTGATTGTACACTATATCTGACCAAGT TGAGTGTGTGAGTGGCTTCTCAATATTGAGCCTATCAATTTGCATGA CAAGTGAATCATNCCCGGTGCCAAACAGCAGAGCGGNGTTACCAGTC CAGGAGTCCGCCCCGCTTGCATCTGCCATCTGCTATTCACACACAC GGTTGGTGATAATGAGAGTTCCTCATCTGGGNGTGCCACCTCTGTGTA GGACAGCCCGAGCTGKAGGGGGTCTCAATCCAGCAGGAGGCGGCG GCCCNCGTCTTAACCTAAGGGTTGAGACNCCCNCAACATCCAGGCAC AATNGCAGTTCNAGGGCTGNCNGNRGGCTCAGCNCAGTCCCRCTGCG TGCGCCCTCTCTTGAGGGGCGAGCTGAGGGGCTGCTCGGGACNCGG ACAAGATCTGGCTTGAGAAAGCCCTTCCACCTGTCCATGTGGGGGG CTGCTGCTATGGTCTGCGATTCTCTCGGTGACCTCCAAGCTCCCACTG AGCATCTGGCANGGGGAGNRCNCTTTCTCCACACTCGCGGCTCCTCA CTGCAAGTGGGTGCTCGGGCGCGCMCTTCCCTTCTCNGCCCTCTGCG CTCGCTCTONACCACCAAGAGTGGCGGGACCTTGTTCTATCTTCCAN CNGGGCCCTCTCTCTGCTAATATGTCCACANGSTGYTGCCTGCC GGCCCTGCTCCACTGCGGAGTNGCCCTCTCAGACTCTCCCTTCCG AAGGAGGAGGATCCACCTTGGCCATTGAAGCATTCAGCAGGAATCAGCC CAGCCTCCCTGCTNAGGCCACNCTGCTCCGAAGACCGAGGATGAGCAG CAGAAACTGAGACACTGATGCTCTCTGGGAGCCCGCCCTGGGAGT GGCTCTGACCTGACCTGGGTCCGNGGCTCTCCGGCCAGGCCCTCCCG CGCTCTCAGGAATCTGGGTGCTAGGCTGAGGATAGGGGCTACCAGAGC AGCCACTGCCCTGATTCTAATCTCAG
2FH2 1F_02 156	ATAAGCTTTGTGAAATATATCGNTGTCTAGCAATNACTCNGTGAACCTAA SGTAAATMCAGTCTTGGAGAAATCTGCAATGTCTAAAAAGTACACTTA ACTNANCTTAGTCTCTTATAGATATGACTATTAAAGANAGGTTATC GGGATTATGACTCTTADCAATAAAATAAGCAATAAGAACGCTAAAGCA GGAAAGCCTACTCAACAGCTGTGAAGCGGGNNNNNNNNNNNNNNNNNN AGGAAATAAAGCTGACANGCAGCGCTTTCTCTCCACTCTGAGCGCACT GCCATAAATCTGCTGTTNCCCTCTCACACTGTACTACTCTGGCCACTC AAATTAAGCGTTACAGAGTACACATGACAGGAACATATAAATGGCC CATTTGGGANAAGGCATTCAATAATGATTCATTGGAAGTATTCANAAATC TGTGCACATNTTTGTTTACAGACTCTNAANCCTGAATTTAATTTAAT TCTACCTCAGGCATCATCGTGGTGTGTTGTTCTCTTCTCTTTGAG TAGATTCTGATTTCCATCACATCCATAAGTCTCCTCTCGAAAAGTAA ATAAAAGTAGGGTGTGTGAGCGCATTTAATTGTACATCCCTGTGTGTA CTTAGTGCAGTGTGCCATGAATAAAACATAATACAGAGAGGGGAGCTCA AATTAGTCTGCTGCGAGTCTCTAGACTAGAACTCTCTCTGAGCTCAG TACTAATTTAAATAAAGTTTCTCTTTTCCCATGTGATCTATCATCTAA TCCTAATCTCTTCTCTCACACCAAGACTCTCTCAATACCTCTGAAATGCA
2FH2 1F_02 156	TNTGTTTAAATTTGTTAATATCGCTATTATTTTAAANTGTTGGNAAATTTAAAT CTTTCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN AGTCACNAGAAATGAATANAGCNAAAATATGAACACCTCTATTATATTACAC GAAATGAACACTTACTTGAGTCTGGCAGACTTTGCACTCAGGACATCTG TGCTGACCACCAAGTAGTACAAAAGAACTGATCTAAGAGGCTCTCCYGGGCT
2FH2 1F_02 156	TNTGTTTAAATTTGTTAATATCGCTATTATTTTAAANTGTTGGNAAATTTAAAT CTTTCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN AGTCACNAGAAATGAATANAGCNAAAATATGAACACCTCTATTATATTACAC GAAATGAACACTTACTTGAGTCTGGCAGACTTTGCACTCAGGACATCTG TGCTGACCACCAAGTAGTACAAAAGAACTGATCTAAGAGGCTCTCCYGGGCT

[illegible]

[illegible]

Marka r ID	Secuencia genómica común
2FH2 1F_18 _067	NNNNNNNNAGCTAATCAGAACACAGATTCTTCTAGGATGCTTCAATGACTACAGTCCCATGAGGTACCAACATGTTAAACACACAATGGCATGTGCAAAAATTGAA GCTTCCCTCGCAGTAAGGGTGAATTTTGAATCAATTTTGAACAGAAAANANTTAGAGTTTAAATACACCTCTTGAATCTTTAAGTCATACAGACATCCCAAT ACAAAATCATCAGTATGAGGACNTGAAAGNAAACACCTGAAATTAAGCTACTTTTAAAAAAGTAATTAATTAAGTCTGTTCTGTAAGTAATCATCTTTCAAATG TGATACCACTATTGACATTTTAACCTCAAAATATTCATCAATATTAAGAAATAAACACTTTGGGAGATGAGACATTAATATGTCAATATGTAATATGTAATCTTTTAAAT TAGTTGAACCTGTAATAATNACCTGCTCAATGTTTATCTTCCATCTAAGCCTTTATTGGAACAGAGTTTGCAATTCAGTGGCAGGCTAAACCGGTTTGGG AGAAAATGATTAATACAGAAATGTACTTCAAAAATACATAGTTAATAAATATGCAAGATAAATATTAATAACCTCAATACCTCAAACTGAGAAGGCTTTTCAGGAG ACTCTAAAAGCAAAAGAGATTTATATTCRGTCATAAGTAAATATGACAAAATGACCCAAATGAATCCAGTGAAGTATTAAGNCTCTTTCTCAGCTTTTGAGAA TGATCTTTAGGTTTAGGGGTTTCTTTCGGTATGTTCTTTAGGACAMTACATGACAGAAATACATCAAGAAATAGGAATCTAGGCTTCTCAGCTTTTGACAC KTAAGACTTCAAAAGTGAGAAATGTTGTGATGCAATGTTGATTAATATGATATGCTGATGATGAAGAGAAATGATCTTTGATCAGAGGAGCAAAATTA TGCCCCGAAAAAATAATATGCAAGCTGAATGAGATCTCAGTACATGATGAGTCAAGTCAAGTCACTCACTGAACATGTTTACAAATGATCAGCTTGTGATTTAAAT TGCTCAATATGAGATGTTGACCGGTATGATGAGATCTCAGTACATGAGTCACTCACTGAACATGTTTACAAATGATCAGCTTGTGATTTAACTT AATGGATACTAATAAATAATCATGTTTCCCATATCTGCAAGTGAATCATATGCTCATCTGCTGATCTTACCTTCAGAAATTTCTTGAATCACT CATGCAAAAATACTATRAAACTCAATAAAAANATGNAATANGAGCTTCAATATGATATGTTTATTTGAAAATTTATGGAACATATGGAACATACTTATACNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN TGGTAAAGTCTAATAGATTATATAGAACAACAATTTACCAACAACAATTTGCTCTCAATAAANATAAGCYAATGCTGTAGATTCAAAATCTCTCAATTTGAATAGCTA ATATCAACAATAATAACATTTTATGCTGATAGTAAGAGAACTAATGAGTCACCATGGTTACTCCAAATCTAGTAATCTCCTCNGCTTCCGAGTAGTCTCTGGA GTACCCCAATCTAATCTCTGGAGTGCAAAATTTGTAATGCAWCTGAAGTGAATTTCACTCAAAATTTCTTTNCAGAACTCCAAAGTTGGCTGGCTATMTTCTTG TTGCTGORTTTCATGCTCACAATCCCTCTTCTAGCCAAAATAATGTGCAATCTGCTGGCTTCTGATCTTCCCATTCAYATCTTTA
2FH2 1F_05 _003	RTTCTCAGGCANAGAGAYCAATGGARACTTTGAGCAGNAGTGGCTTATCAGGTCTGCTTTTJONGGJGAAGAACACTGTAATAGAACAGTGCANGTGTCTCA CTTCTCTNTTGTAAACCCAAACCATGGTCTTNAAGTGNAGTGCAATACCTTTGGAATAACAAGGTATCAGTCATCTCAATACCACCCATAGTAG ATAAGCTTTTGTGAATATATCTGNTGTCTAGCAATNACTCNGTGACCTAATGGGTCCCTCAATAGAGGGTTGACTTCCATGTGAGGCGCAGAGGAAAAGAAAAAN SGTAATMCAAGTCTCTGGAAGAAATCTGCAATGCTTAAAGAGTACATTAAGGCTCATGATNAGAGAAATGAATCATTTCTATAAANATNAGAAAGCAACT NANCNTAGGCTTATTATAGATATGACCTATTAAAGANAGGTTATCTTTAAGGCTCATGGAATACCAATGGAATGAAGAGTGTCTCTTNCATATAAAGGG ATTAGATCACTCTTACCATAAATAATAGCAATAAGCAATAAGATGTACNAATCCAAATTAACCCCTCATTTGGTAAGAGANATTAATAAAGCTGNCATAAGGA AAGCTACTCAACAGCTGGAAGCGGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN CAATAAACTGACAGCAAGCCGCTTCTCTCCTCACTCTGAGGCGAGATAAGAAATGAGTGTTAATCANTCATGGTTTAACTGGCATATAATCTGAGGAGCC ATAATAGCTCTGCTTNTCCCTCTCACATGTACTACTCTGCTGCTGCAATCAACATGAATTAAGTTTTCAAAAAAGATATTAGAAGTGAATCACTGAAAT TAAAGCGTTACAGAGTACATCCAGAGGAATATATAATGCGCTTCAAGTCAAGTATGAACAAAAAGCCATAGTAAAGCCTTTAATAAATGTTAAGCTTAACT TGGGANAAGGCAATCAATGATTTGTAAGTATTCACANATTCAAATAAAGAACTCTAGAGCTAAAAGTGCTATCAATAGTTAGTCTTTAAATTTATGTTG CACATNTTTGTTTACAGAGTCTNAACCTGATATTTATTTTAAATTTGAGGCTTCAAGTATGTTATTTCTTAAATAACMAAGTGTGATGATTTGAAATGCTTA CCTCAGGCACTAAGCTGGTCTGTTCTCTCTTTTCTGACCATCTGCTTCCCTCCACTCCCTAGTCTTCAATCNCACAGCTTCCCGCTCAGGACTAGA TTCTGATTTTCATCAACAATCAATGTTCTCTCTGGAATAAGTAAATGTATACAAAACTGGAACAACTGAAACAACTATAATCAATATATAATCCCTACATNATGAGGAATAA AAGTAGGGTGTGCTGAGCCATTTAATTTGATACCTCTGTTGTAGGAAAGTATGAAGGAGATAGAGNAGCCCAATGGTNTAGAAATGTGCTGCTTAG TGCAAGTGTCCCATGAATATAAACATAATACAGAGAGGGGAACACAGACTCAGAGTCTGTAAAGTGCACATCTCAATTTGCACTTAAACAAATTCACCTTGTCTTAAAT TATGCTCTCAGGCTCAGCTCTAGACTAGAACTCTCTGCTGAGCTTCAACCCACAGCTATAATGAATATACCTAGTACTGAAACCTGTRTATCCAAAATGAAGCTAC TAATTTAAATAAACCTTCTCTCTTTCCCATGTACTCATATCAATTAAGAGGATGGAATATGAACCTGAGGCGCTGGAAGAGCACCCTTAAATCAATCTTC TAATCTCTCTCTCAACCAACAGCTCTCAATACGCTGGAATGCA
2FH2 1F_07 _037	GACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN ACTTTATGATTTTCTGAGAAATAACTTTTGGATTTAATTTCAATGAAACCTGATTAATTCCTCCNARCNTATCTGGAAGNATGCTCCCTCAGATTTTAAW GATTATGATTATATCTTTAATAAGAGTAGAATAACACTCAGGGAATTTACAACWTTTGTATTCTCAGTAANCAATTTGTTGAAGTTTAAAGCTATNCGTAGTA AACTACATCTTTCAGGAGCTTGGTCAATGTCTTGGAACAGCAGGAGATGTGACTGAAATCTCTGAAAGGWNCGGCTCTGCAAGCAAGATTAATGATACA TCTGGGTACATTTCTTACAGCATTTGATAGTGCCTCAAGTGCTTACAAAATGACATCTGCTGAAAGGGTAAAGGAGAGAAATCTCTTTATAAACCTTGAA AGGAATTAATAATAGCTGGGAAGGTATAAAACCTCTNGTATACAGATAAANCAATNGAACCTCGCAAAATATTAACCAAGGATTCRTTANAAATAATAAA ATCTACATTAATCAATTTWYGCCTGCTGCTACCACTCACTCTTCAATAGAAATGAAATTTCTTCTTATTTTCAAAATAATAATKTGAAGCAAT TTTAAACAAAACCTAAAGATTTTTTTTAAAGCAAAATAGTAATGTTTAAAGGGCAGGTTCTATATGAGGATTTATATAAGGTTTATAAGGTTTAAATCCCAACCAACTAG TAATAGGAACATATATTTATGAGACATATTACTATTTTTTACCTGCTCAAAAATAAATACAAAATAAATCACTCATATTAAGTTAAGGAGCAYAAATNGTTAN
2FH2 1F_07 _262	

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Marker ID	Secuencia genómica común
2FH2 1F_18 _536	GCATCAGTTTCAGAGTGGAGCCCTTTGAGTTTCCAGATCTTGTCCAGTGAA AGCACCTTAGCAGTGGGAGGTGACAGCTACAAATAGCAGGACCATTAAT TACCTCAGACITAGCTGACAGGGAGGGGATATTACAGCTAGATCGGGA TGAGTCTCCTGCTCAGGATCATATTGGAGGORTCAGCCATAGTACAC CAATGGGGTCTGCTGACTACAGGTTAAATCTGCCCCCATTTAGAGH TTGTACCCAGATGGGAGTTTCTCAGTTTCTGGTCTTTGGTAAATAT TTAGAAAAGAGATGAAGCAGTCAATTTGGTCCATCCATCAAGGARTG GAAGGTGAGGAGGACITTAAGCTTCAATTTGGGTACATCCCTGTTTGA ATTGATTTTACCTTGTAAAGATAAATATTACCTCTAATAATATGCTC AAGTGCTAAATAGTTAAATTTGACAAACTGTAATATCAGATCTCTCT CAACCTGCGCAGATCCACCTCTGCTAACTTCTCCAGGCTGATCTCT CCCCTACTGCTCTCCAGAGCTGGTGTCTACAAATTTCTGAAACCCAAAG A
2FH2 1F_15 _016	TTGGTCTCTTCTTCTGGTGATCCCGTGGTGTAAACAACATAAATTATCT GGTAAGGNTATCTCATCCATGCTCTAAAGTCCAGCAAGTCTAGTGAA TGATGAGGCCCTGTAGATGATTAACNTACACTGAGCTCTGAGGNTGT GGGACAAAGCTCCCTTTAGGAAGNAGGTGGGACCTGGAAGGCCCTC CCTGATGGCTTGTAGAGGGAGGCTCATTTGGGGTACAGGTTATAAN CCATNTGGGTGACCTCTGGAAGATGACAAGATGCACAACTCTCTCT CGCTGCAGGGATAAACAAGACTTAAGTATTTCTTATCTGGAAAGACAC GGCAATNGGTGAGGTGATGGNACAGCTCAGGCTGACATGAGGTTTGA AAGGATTAGGAGATCATGGAACATCTTCTCGGGTCTTGGTANGGAG CATACAAATCTGATTTCTCAAGCTTGTGGAGGCTGACATACCCACCA GGNTGCTCTTGGNGATGATATTTCCAGGCCCTTNGTCTCCCTGCTCA GGCTTCAGTTTCTCATCTTCTTCTCTCATGTTCTCTCATGTTGAGT AAATTGGCAAGGAGACCCCAAGTTGACCATCCCGTATAGCTGACAGTG CTTATAGCAANTTCTCGGAATTTATCTTAAACTACTGTCTCATTTCT TTGATGCTCTGCTGTTGNAAGTTTGTGACTTNTACCTTCTTAATCTT GCATCCTCTTAAATTTCCAGGCCCATTTTNGTTATTTCTACAGGTGAT AAAAANCATTTGAANAAGTAATGONGTAATTTAAGGTAAAGTAAAG TCATAGTATGATATCTCTTCTCAGTTTAAATTAATCTGCTAGCAAGTTA GATACCTCCAGCAGACTAACCTAGNACCTCTCAGGAGTGCCTGAGCTGA CAGCCATATGGGACAATTTGAATAATTAGATAAGCCCAACTTGATAG GNGTTCTTTTNNCCATAGAACCTGCTAACGCCACTGCTCAAGTTCT GTAGCTGTTTGGGATAGGAGANGTGAATGTAAGAACATGACAGGGA GGAGAAITGACTTCAGTCTCCAGTCCCATANGAGTATATACCAAGTGT CAATACTATTTCCAGTATCTTCAANGGCCCAATACAGAGAGCACACAG ATCAGTTTATCTTNGCGCATCTGTATAAAATTTTGAAGCATTTCTCC GTCGCACTGGGTACAGAAITANACCCATAATATAATTTCTCTCTGAGG GGATCTGTCATATTTGGGCTACATTTGCGAGCTACCAAGAGAACAGAA TAAAAANTGCATCAACCAAAATGCAGATGATGATCAAGTATCAAGGACA ACCTGAACCTCTGAGCTCTGAGCAGTGTGANGTCCATGGAGCTGAGAT AAAGCAACCTTTGAGTGTGAGTGGATGATGATCAACNNNNNNNNNN CTNTAGAACATTTGTGTAAGTGGGATGATGATCAACNNNNNNNNNN ATATTAAATGAGTTACTTANTTTGTGATTTGTACACTATATCTCGACCA TGAGTGTGTGAGTGGCTTCTTCAATATTTGAGGCTATCAATTTGCTGAT

Marke r ID	Secuencia genómica común
2FH2 1F_18 _412	AAGTCACTCCACCTTGATGAGACACTGACACAGCAGATAAACTCGAA GTTTGGTAGAATCGTAGCCCTGACACAGTCAGAGTTTACTGCCCATTTT KGTAGCCTGAGGACTGCTGATGACCGCGCTGAGNNNNNNNNNNNN GCAGATGACGGCCAACTTTGTGGATGAGTTTGGSTTCAATGATGAGAGT CGACTCCCTCTCGCTGCTGAAGTCCCATGGGGGAGCTCCCTTAGNC GAGNACAGGGGAGGAGCACTGAGGCTCAGATGACACAGGAGGAGAG CANCAGGAGGAGGAGGCTTGAGGCCCATGAGCAGCAGGAGGAGAG CAGTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GGAGATCAACTTCAACATGACACTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG CATGGCTCGTCTGNGTGGGCTGTGGGCTGGGAGAGGAGGAGGAG CCATGGGCGCCACATCTGAATAGCCCTCTGGGAGGAGGAGGAGGAG CCAGGCGGCTCTGAGGCTGTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG CCAGGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG CCGCTCGCAGAGNAGNAGNAGNAGNAGNAGNAGNAGNAGNAGNAG CACTCAGGGCATTTCTGTCTACCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG CCGAGGTTTGGAGCCCCCATGCTCAGARAGCTGCTCAAGATGGCC TGGGCGAGGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GGACATGGTACCTGGCTAGGCTGTGGAGGCTTCAATGGAGCTGAG CTGAGTAGGGGCTGTGCTGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT TCCACTAGTCCNATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT ATCTAGGNCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GAGGCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GGGGCTCATCTTGGGCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG CTGTAGGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG CTGCGAGGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG TGGGCGAGGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG TGGGCGGCTCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
2FH2 1F_02 _174	CAAGTGATTCATCCCGGTCGCAACAGCAGGAGGAGGAGGAGGAG CAGGATGCTGGGCGGCTCCATCTGCCATCCCATCTGCTGCTGCTG TTTGGTATAAATGAGATTCCATCGGNGTGCCACCTCTGTGTGACG GACAGCCCGAGCTGKAGGGGTCTCAATCCAGCAGGAGGAGGAGGAG CCNCGTCTTAATAGGCTTCAAGNCCCNCAACATCCAGGAGGAGGAG TGNGAGTCNAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG CGCCCTCTCTTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG AAGATCCTGGCTTTGAGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GCCTGCATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG CATCTGGCANGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG TGCAAGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT CGCTCTNAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GGGCGGCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT CCCCCTGCTCCAGCTGCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG AAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG CAGGCTCCCTTCTNAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG CAGAAAGCTGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GGTCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG CCCTCTCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG AGCCAGCTGCGCTGATTTCTAATTTCTAG
2FH2 1F_06	CCCCATTTCCCTNAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GAGATGCTCTATTTAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Mente r ID	Secuencia genómica común
2FH2 1F_02 _234	ATGGACCAAGNGAAGTAAATTTTGTGTTGNAGTACCTTTAAATCTTCTGTCATCCNAAATATTCTAACCCCNAAACCCATGCCATGAGTGGNTTTAGGGAAG AATTAGACNATGTTGTAATCTTGTAGTTCGAGTTGCAGNATAGTATTGGACCAACATCTCTCCCACTCAAGTGGCATTAACRGTAGAAACACACTGTCTTA GNTAGAAANAGAASTNAGGGGAGAACNATAGTCTAAACCTACAGAACCCAGTCTAAATAGAAATCTGACTTCTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNCTGNAATAAACAGATATTAAANTGGTATTAAACAAATAATATCTANCTACANGTAATCTTTTNNATCTAACTTTGAACCACTGGTCT GGCTCCAGTCTTANCCTTGTCTAATCTTGTGATTAATCTTGTGAGTTCACCTGCTGTTTATATATGCTCCAGGAGTCTTCTGTCAGCTGG CCNTAAGACATGATTGGCAATTTGTCAATCCATNACTGATTTGATAGTGNAAATGACACTTANGGATTTTTCANGAATCTCTTCTTATAACAGTGG GCCTTACAAATNTCTCTATNCTGAGAAATAATCTCTCAACNCAAGCACAAAGAAATNAGNTGGT
2FH2 1F_07 _271	GACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN ACTTATTTGATTTTCTGAGGAAATACTTTTGGATTAATTTCAATGAACNCTGATAACATTTCCCTCCNACNATCTCTGGCAANGATCCCTCAGATTTTAAW GATTAATGATTTATACCTTTAATACAAAGTAGAATAACCTCAGGGAATTTTACAACTTTGTTTATTCAGTAANACATTTGGTGAAGTTTAAAGTCTATNCSTAGTA AATACATCTTTTCAGGAGCTTGGTCAATGTTCTGGCAAGAGGAGGAGATGTGACTGAAATCTCTGAAAGGGWGNCGGCTCTGACGACCAAGGATAATGATACA TCTGGGTACATTTCTCTCAGCATTGTAGTGGCTCAARGTCTTACAAATGCACATCTGAAAGGGGTAAGGAGAGAAATCTCTTTATAAACCTTTGAA AGGAATATCAAAATAAGCTGGGAAGGTATAAAAACTCTNGTAYATCAAGTAANCAATNGAACCTGCAAAATATAAACAAAGGATTCRTTANAATAATAAA ATCTACATTAATCAATTTWYGCCTCGTGTGCTACCACTCTCTCCATCAAAATAGAAAGTTGAAATTTCTTATTTTCAAAAATAAATKTGAAGCAT TTTAAACAAACCTAAAGATTTTAAAGCAATAGTAATATGTTAAARGGCGAGTTCTATAATTGAGGATTTATAAGTTTAAATCCCAACAACTAG TAATAGGAACATATATTNATTTATGAGACATATTACTTTTACCTCCCTAAATAATACAAATAAATCATCAATRTTAAGTTAACAGGCACAYAAATNGTAN GACTCACANAAAAAANAACATACATCTCAATGTAGCAATCAACTTCAAAATTTTAAACAAAGATGGAATGTGGGGAANAAANNTAGTCATCTGGTATCTTCC CATTTCAACCTGCCTCATTWCTTGCAGTGGTAAAYNCACAGAAATAAGCCCAACAGAGGCGAGCTAGGGCAAGTGAACACATAAGAAGTCRGAAGAA ATTATGTAATGTTGCAATTTACTTATCAGTTTCCCTTGAATGATTCACAACTCTCTCATCTCCCAAGTCCANTTTGAGCATCATTTCTTTGAAGAGAGTNT GATGGGCTGTACTACATAGATGANATCTCTGTGGGAATAGTACTTCAACATAAATTTTGTGTTACACCTTACANTNGTACTACTTGTCTATGCCATACATG ATCAGTTTATCTTTTNCATCTANTCCAGATCTCTCAIGATTTGAGGACCATACTACTTTGTATCCAAAGCCAAATAGTCTTNAACAGGCGCTTAATAGA WANGTGTCTTATACATATACAAAGNCTTAACCTTTGGTGTCTTNTTGTGAGTGGCTCATAACAGCTTAGCTGAGATAACTGAGGCTCANGTANCANAG ACAGTTGGCCCTGCTAACATCTGTTGGATATCTTACATGTTACTACTGCTTATTTGCTCAATTAACAGGAGTACAGNAGTTAAATTTATAATTTGTTTC AATGTTTATGTAAATCTGTATNTACATATCACTATCAAACTCTTCTCTCAGTCTGCTAGTCTGCTGATGAATCAACATAACAAAGCTAANTGACTCTCTGAGGGGNG AATCAGAAAGAAAGAAAGAGAYACNAANTT
2FH2 1F_18 _441	CACCGAATCCAGCMTTTCTGCTGTAACAAATGATTTGGCAGGAGTGGGCGCTGTGAGGAGTGCCTKNCAGGTCAGGAGGTGCCGTCCNCGGAGCTG ACCTGTCTCTGCTGTGCTGTAGCTGANTAGGCGCCAGCTGAGCTCTGTGAGGACANACAGACGCCAGCTGAGCAGCCAGAGCCAGGCTCGA GAAAGCTGTGAGTACGAGCTGCAGGCGCAGCCAGCTCTGAGAGGCTAGCTGCTGAGGCTGAGGCGAGCTGGCCCTCTCTTGGGT CAGTGGGAGNAGGTGGCCAGGACCCNGCATGCTGCTAGTCTCTNGTRACATTTGNGGTTTGTATACAGCAGTGGGACTGGAGCAGCCACGTGCAGATGGGAGGC CCCCAG
2FH2 1F_01 _021	GAAAAATNANCNAATTTATAAATAAATTGAGGTGTTGGATGAAAAAATAACAGAGCTTTGCCCTCATGCTNAGATCTCTTAATATTNTGGTCTGCANCTNA GATATCAATAAAGNTANCTAGCTTGACACAAAGTTGGTAGCTGAATTTAGTGTATGATGGCCAGGAAATGATATATTTCTAAATTTNTCTCT TAAATATTGGCTGTAAACAAATGCTGATATAGCAAAANGTAAGCTTCTATTAGCAGCAAGAGGAAACTGAGTGAATGAATGCAACTTACCTCCAGTCTCTTAA GGAGGTAAANAAATAAATACTGTGTTTACAGTCTCCCNCAAGCAATTAATTAAGCATGCAGGAGGTATAGTGAGCAGCTACATAGTAGATCCAAACCCAG AGTAGGTTCAAGGCCAAGAGTAGGAGAGTGGTGGAGAAATCTCTAGGCAATCTCTAGGCGCAGTACCATTTCAAGATGCCATTTGNTGGNGATGAKTCTNGGCTAT TTCTCTGATTCAAAGNACATTCCTCAATTTCAAGCTTCTGCAAAANAGGCAATTTTGACTGCTNTTGAACACAGCTAGGATACAGGATAGGCTGGCATAAAT TATTTAGCAAGCAGCATGCTAGCTATTCAGTTTGAATCTACCAACTGTAAATYNGGAGAAATAAAGTTGAAGTNTGTTCTCAAGNTGAGGGAACAA TCTTACAAAGGNGGGATTAGGCATCTGCTNAACTTATAGGAGACATCTTCTCAAGTGGGAGATGAGGAAATATACCAAAAGCTGACCCAGGCCAT TTGGAGACCAAAAGGANAGGAAAAAGGCATTTAGGAAGCAAGCTAGTAAAGAGTCTTCTGGGCTGACTARGTAAGTAAATCTAAGGNAACCATACCAAGGAT ATGTTACCCATTAATCTCAGCATGAAGCCAGTGAAGAAATACCTCAAGACGCTATTTAAANCCAGAGAGTGTAGAAATATGATATTAACCAAGCANATTAAT CAACCACTAATGTTAAATCTCTCAGATNTGAAATCCAGATCTACTTCCATTAATCTGTGNTTANGGGGAAAGAAAGTAACAAAYGTAAAGATTTT TTTATTTCTAGTGGGAGGAGGAGGATTAATAGAACTGTTTCCAAATTTGCTCTCYACTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN AATACCCCAACMAAACAACAAACCAAGGAATCAANCCANACACCCCTCAAACT
2FH2 1F_07 _365	TCCTATGATCATGTTTATGACATGTAANTCYTTAATGGCTTTCTTCTTAAGCTTAARAAAAATAACAACATGATTCACATATGTTTTCANATATTTGTATACAT TTTCTACTTTTCTATATTTCTYACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN CCTTAAGANGTGGRGCAAAATATTTTATTTTCTGTTGATTAATTTAGCTAYATTAATTTTCTGATTTAGTAACATACATAGGCGCTATTTATAGTT GAATGCGAGCTTTACAAACCTAAGCAACCTTGAIGTTTACNTATCTGTGGGAAAGCAATTTTAGTAGAAATGCTGTCGNCATCTTCTTACATCTCTGTATCAACAC

Marker ID	Secuencia genómica común
2FH2 1F_15 _040	TATTATCATCANCTATGTTGGTGACTCTCAGCTTTCACATAGCTGAAACAGAGGAA AACCTTGGGAAAGGAGGATTATATTACACATGTTANGGGAAGTCTGTTG GGCAATAATAGAAAT TTTGGTCTTTCTTTCTGGTGATCCCGTGGTGTAAACAACATAAATTATC GGGTAAGGNTATTCCTATCCATGCCTCTAAAGTCAGCAAGTCTTAGTGAT TGATAGAGCCCTTAGATGGAATTACNTACACTAGGCTCTNTGGGNTGT GGACAAAGCTCCCTTAGGAAGNAGGTGGCACTTGGAGGCCCTCTGAT CCTGATTGGGCTTAGAGGAGAGCCCTCATTTGGGTCACAGGTTAATANN CCATNTTGGGGTGACCTTGGAGAGTGAACAGTGCACAACTCTCTCCAT CGCTGCAGGGATAACAGAACTTAAGTATTTCTTATCTCGGAAAGACAC GGCAATTNGTGGTGAGTGTGNACAGCTCAGGGCTGCACATGAGGAG AAGATTAGGGAGATCATGGAACATCTCTCGGGTCTTCTGANGGAG TACAAATCTGATTTCTCAAAGCTTGTGGAGGTCTGCACATAGCCACATT GNTGCCCTTNGGATGATATTTCCAGGCCCTTNGTCTCCCTGCTCAT GCTTCAGTTTCTCATCTTTCTTCTCATGTTCTCTCATGTTGTGAGGT AATTGGCAAGGAGACCNCAGTTGACCATCCCGTATAGCTGACAGTGA TTTATTAGCAANTTTCTCGAATATCTTAAAACTACTTGCTCATTTCT TGCAATGCTCCTGNTGTTGNAAGTTGTGACTTTCACCTTCTAATCTTA AAGTNTATTGACGTTCTCATATATNTTCAGCACCAGCTTCTCATCATTT CATCCTCTTAAATTTACCANGCCCATTTTNGTATTCTACAGTGATTA AAAAACATTTGAANAAGTAAATGONGTAAATTTAAGTAGTAAGCCGAG ATAGTATGATTCTCTTCAGTTTAAATAACTGCTACGCAAGTATAGT GATACCTTCCAGCACTAAGCTAGNACCTCTCAGCGAGTCCCTGAGCTG GNGTCTCTTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT CAGCCATATGGGACATTTGAATAATTTAGATAAAGCCCAACTGATAG GTAGCTGTTTGGGATAGGAGANGTATCGTAAGACATGAGCAGGGA GGAGAAATGACITTCAGTCTCCAGTCCCATANGAGTATTACAGCATGT CAATACTATTTCCAGTATCTTCAANGCCCCCAATCAGAGAGCACCACAT ATCAGTTTATCTTNCAGCATCTGTCATAAAATTTGAAGACTGTTTCTCT GTCGCACTGGTACAGAAATTANACCATATATTAATTTCTCTGAGGT GGATCCTGTCTATTTGGGCTACATTTGCAGCTACCAAGAGAAACAGAA TAAAAANTGCATCAACCAATGCAGATGATGATCAAGTATCAAGGACAA ACCTGAACCTCTGGAGTCTTGGCCATCTCTGAGGAGAACTAGATGGT AAAGCAACCTTGAAGCTCTGAGACAGTGTGANGTCCATGGAGACTGAG CTNTAGAACATTTGTGTAAAGTGGGATGATGCATACACNNNNNNNNNN ATATTAATGAGTACTTANTTTGTGATGTTGATACATATCTCGACCAG TGAGTGTGTGAGTGGTCTTCAATATTTGAGCCTATCAATGATGAA
2FH2 1F_18 _485	GTGTTCTAAATTTGACCTGCGGTCGTTTGGAGAATCTGAGAAGTAGC AGCGCAAGCCTCACCTATTCACCTACTGACTCAGTATCTCCTGACTAG TGCTCCTTNGGACCGGAGTGTGNTGGATGAGCATTCATCATCAGT CAGAGCCCTGAATCTGGGAAGAAGTACTTCCACATGAGCAATG GGGAGTCACAGCTTTTGAAGTGGTGGTGTGNTCTGNGTGAACCAAG CATCAGTGGTCTTCTTAATTTGCTACTGTGTCATCTCAGAGTCTTGT CGTGAGTTAAGATTACACAAATAGTTCACACAGAACTTATCCAGAAC TCAGCCTGCCTAATAAGTGAGATTGAGTTCGCTCTCGGGTCCCANATG CCCAAGCCTTGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT CTCATCTGAGCTGGACTGATCTGTTGATGAATAAATGNGTGTGTTGAG GGTTTCCACAAAACCTCAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT

[illegible]

[illegible]

Mark r ID	Secuencia genómica común
2FH2 1F_02 _043	TCTAGGNCAGGAGCCAGTCCACCCNGCAGGCTCGCGNGGCTGATGAACCCCTCTCCTTACCCCTGCNCTGGGGCAGCACTGACCCCACTCAGGAYTTTGGGGAG GGGCGAGGAGCTCTGTAGGAGGTGCGAGCTTGTAGGCGCAAGAGAGAGCAAGGCAACCCCTGGGGAAGCAGGAACTGCCAGTCCCAAGTAGGAGGAAG CGGCTCATCTTTGAGGCCAGGAGCGGCGNGGTGGTCTGTGGTGGCTGCCNTCTCTGTGGATCGGCTGATGAGGAGCGGAGTGGCATCACCCTCCACAC TGTCAGCGTCAAGCATCTGAGAGGCTAGNGGCCCTCAGGCGCCTNACTGAGCCNAGGTTCATGGAGGCGATGGCATTCGCTCCACATCTACAGGCTCAGCC TGCNRGAGCCCTAGGGCCCTCAGGTGCCTGACTGAGCCGCGGATCATGGAGGGTAGTGGCATCNKNACCCTCCACACTGTCACTGTGTCAGCCCTGCTGGAGGCCCT GGGGCCCTCAGCGCCCTGGCTGAGCC
2FH2 1F_02 _043	GTAAAAATTGCNCTGGNAGANTGTTTATAGAACTCTAGAAAAACCCAGNGNAAATATGCCTACTCCACAAATGCTGATNTGCTGTCTAATGACCAGATAATGGAAT CCCCAAATACAGTAGCCNCTTACCATTAAAGNATNAGNTGTTTGGAAAGAGAGAGTAGGAGAGAG
2FH2 1F_03 _021	CATAACTTAAAGTNGATTTATTTTCAGTGCCTTTTNAAGGTTANCAAYNATCTTTGGATACNTAGTTGCCCTGAGTTCAACTNCATGTTTTATAAANAGGCAC(A/G) TCTCTCTTATGGGAGGAGGAGTCTTCTGTATGCTCTTGTGTTATNAGAAATAGAAAAAAGCTGCTGATCAGCATANATTAATTTTNAAGGTTAAATTTTTCAYCNC TGTGAGCACTAATNTATNTATCTTCANTGNATGATTATGATGCTTACCTTCTTAATGTGATGTAAMTTTTTTCATGTAATGAAGAGGAGGCAACAC CAAGATNACTGCACGATTTGTAACANGTAGAAAAATATTTTCANATNTGAGANGAGANAACCTCTAGCTCTCAAGGTCACAGATGCTGACAGATTAATTTGNC TTTGAGAAATNCTTGANAGAAAGACTNAAATTCGATTCAGATATTANTCAAGATTNTGATATAGCAATANAANAACAATGTGNNNNNNNNNNNNNNNN NGTTTNCACAAATONTTGTACATACAAGAAAGTGTGATGAGACTAATTAATGCTTGAATGCTNYTTTNTAACTACTGTCNATAAAGGT
2FH2 1F_18 _486	TTTAACTGATTATCTTTTGAAGCCACTGNTAAGAGATTTCTGTGCTCTTCACTAGTAGGACTTTATTTTAACTTTAANTTCAGAGCTCTTGTATGGTGTCTTCT AAATGATTATTTAGCACTGACTGTCATAGAGATTTGTCJCAAAATACATAAATCTACASAAAAATRTAAATATGNAGTAATCTTAGCCCTCAAGGAAACCCAG ATTTCCAAATCTGAGTATATTTCAAGTTTCTTTTNCAGGACGACGNCAGGTTCTGTCA
2FH2 1F_14 _028	NCAGARTGTGNCCTGATCTGACTCCAACTGATCTAGAAATGAAGGCTGTAGGAAGACTRTTCTCACACATANTTTGACTTTGAAAGGTGNCNTNAAATTTGCTCG AGGCCATGGCCAAATCAACAGNGNTTTGTAGGAAGAGATCCCNATGANCAGTGAGCATTTGTCATGCACGATGAATGCTCAATAAATGACNAAATTTGAA CTAAATTTTACAAATATGAGGATANACTAACATNAAATCAAAACAAAAAAGTAAATGATGNTCGAGCTTNTCAGGCGCATAAATTAATAGAAGNTATTTCT MTATCTTCTNNAAGGCTAAAGAGCACTTTTGGGAGTTAACTACNAGGATAGTGTAGGAAATGNGATACAGAAAGGGTGTGTTCTGCTGAGACTTCT CCTGTCTGGGAGNCCRTTCTTCTGTTGATATCTCTCACCASAAAGTGAGACAAAGTTGCTNTAGTCAGCAATAGACAGGATGACCAAGTCTGAC AAATATTTTATAGCAATAGNAAGAAATTTCTGCAATAANACTTAAATAATCAATTAACAAAGACAAATATACANGATGAACANAAACAGCATCCAAATCAATGGGA TAGGAGATTAAANTCAT
2FH2 1F_05 _058	CCCTCAGCATGNCCTTGAACCCAGCTGACCTGNCCTGCAAGGCTCCAAACACACAGCNGGCCCTGCCAGAACCTTGGCAAGGNCRRGGATCATGAAATCCAG AGCCANGACGCGCTCAANAGGCTTNTATTTCCCTTCCAGGGCCCACTGACAGCAAGTAATGATTTTGACAGNGAAGCAAAATGAAATCATANGGANG TGACCACTNGACTCAGGAGTCTATGAGAAAGAAATAGAACAAANNTGTTAAGNTACTCTCTATTGTATAATATACTNACAAATATAAACAATNTTGT NAACTTAGAAATTTACATTTTAAACAAAGATGCTONTTAAACACACACAAACACACACAAATGACAAANATAAACAATGANGAATCTGCAGGAAGG GTTCCAGGTAATCCACATCAACCCNGGTACAGGTTCTTGAGNCCAGNCCATGGCTAAGCTTGGCAACACTCTGTATTAGTGTCTCAAGNCAGGGGGCCCTGAC NCCAGCACTTGGAGTTAACTGTTATACATTATATCTACATGNGAATACAGTATTTTAAATTAGGAGGCAAGCACACNTATAAAGGTGTACTCTACCAATATC AGGAGATGGTTGNGNCAGAGAAACAGT
2FH2 1F_07 _072	TAGTGTCCNGTGAACCATCATCTCTTACCACACCATTAGTGCCCTCTCATGTGATCACCCTAGGACGTTTTATTGTTTGTAAATTTTATTAGTGGTAGGACAGTG GGGNCANAGATCTAAATTAATCTCTCAATATTTCCATGTTTCTCTGAGATTTGGCTAAGCATACATCTTAAATCTNTTTAGTCNATAGTTAATATATGTTG GCAGTAGACAGTCTNMAAAATATGAGACAGAAAGTONTACTTAAATAAATAAGTTGAATATTTTTCAGAAATAGAAATTTCTGGTAAATATGTTATTT CATCATATTAAGTTAGCTTTGATGCCAAAAATTTATCTCAGCTTAAAGAACGANGCACTTGTGTAATTTATGTTCTGAAGAAAAATTTATCATATACATAGATAT TCTGACAAATATCTAGTATTTCTTAGACCTTAAACTAAATATAGCTATAATAYCAAGTTTAAATATCTTCAGATCTAGCTTTGATCAAGAAATTTACACAAA CCATTCAGAAAAGGTTASCTGCGCTGTAATGTATGGCTCTCTCCCTTCAATCCAGTTTGCAGCACTTTTACACTGTAATTAAGATNATGCCCTTCTGTCTYCACT GCTANGTTAAGCCCTGTTGAGCACTANTGAACCTTTTCTGCTGAGCATCTATTTCTTTTGCATNTGTGATGAATTCATCAATAAACAATGANCATGATGTA TGAACACACTAATGCCCTCCACAGTAATACCTAGAACTTGAATTTCTTCACTTAAAAAANGTACTAAAAATCTAAAAATCTATATAATGCTCCTTAACTA CAACTGAATTAAGGCAAAATAGTCTCTAATGATTAAGTTGTAATAGAACTGCTATCAAACTACAGAAATTAAGAAAAAATCACTACCTGGCAGG GACTGAATTTGAACCNWAGAAAAATTAATTAACCCAAAAAYAGTTAATAYGCAATTAAGTTTCTTCTGNTTGGGCCAATTTCTCAGGTAACCTGTCGAAGCTAG TAANTTATCAAGGACGTGGGAAATGAGAACTAATGACANGTGGAGGATAGGCTTTTAGAAGCACTTTCTATTAAGAACTTCTATTAAGAACTTCTATGCTGNTT GTTAAATANGATCAAGCTONTTACAGCCCAAGAGTACTATCAGTTTAAAGAGCCGACNAGAAAGTTTGGTGTCTCANGGCCAACTTTACNCTCTCCAACTG ATCAACCCNGCCCACTCTTCCACATCTATGTAAACGCAAGGTTGCTTATAACAGTAGTCTAATTTNGAAAAAGTGAAGCAATGAAGCAICGAGAGNGCNR AAAGGAAGATAACTGGTAAAAAGAAACAAAGATTACAGTTGTCTTTTGGTAAATANAATCACTGTATACANTGGAGNTACAGCAAGCAACACTTCACTMTTTA

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

*Los caracteres genómicos siguen el convenio estándar de la IUPAC

Ejemplo 3: Detectar aneuploidias – Sistemas de modelo y muestras de plasma

Los ensayos multiplexados diseñados de acuerdo con los procedimientos del ejemplo 3 y proporcionados en la tabla 4 se sometieron a prueba en una serie de sistemas de modelo para identificar los ensayos con mejor realización. Los ensayos se analizaron en base a las siguientes características:

- 5 1. Variabilidad de procedimiento global baja.
2. Diferencias bajas entre grupos étnicos.
3. Diferencias grandes entre muestras normales y de T21.
4. Relación fuerte entre la frecuencia de alelos y la fracción de ADN T21 en la muestra.
5. 'Discernibilidad' alta entre muestras normales y muestras que contienen ADN T21.
- 10 Después de que se cribaron los ensayos a través de los diferentes sistemas de modelo, se validaron adicionalmente los ensayos con mejor realización de los sistemas de modelo en muestras de plasma.

Selección del sistema de modelo

- Los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento son útiles para someter a prueba ADN libre de células circulante a partir del plasma materno para determinar la presencia o ausencia de aneuploidias fetales.
- 15 Las muestras de plasma de mujeres embarazadas, sin embargo, son de naturaleza limitada y variable. Por tanto, no son la muestra ideal para realizar estudios controlados diseñados para poner a prueba específicamente los aspectos del rendimiento del rendimiento de los marcadores. Por lo tanto, se crearon sistemas de modelo sintéticos que cumplen los siguientes criterios:

- 1) Proviene de un recurso renovable para permitir el seguimiento y estudios longitudinales posteriores
- 20 2) Proporcionan una indicación de cómo funcionará el marcador cuando se someta a ensayo frente a muestras de plasma
- 3) Pueden evaluar la funcionalidad básica de cada marcador con métricas tales como la tasa de extensión y el sesgo de alelo
- 25 4) Proporcionan un conjunto de muestras genéticamente y étnicamente diversas para indicar la cobertura de población de cada marcador
- 5) Permiten una medida repetida de la misma muestra biológica para evaluar la estabilidad de marcador
- 6) Son dinámicos y adaptables para permitir el análisis a intervalos definidos, tales como contribución fetal, para desarrollar una caracterización más robusta de las capacidades y limitaciones de cada marcador

Diseño del sistema de modelo

- 30 A partir de la lista de criterios de rendimiento del sistema de modelo proporcionados anteriormente, se derivaron una serie de conjuntos de sistemas de modelo. El sistema de modelo se puede dividir en tres componentes principales: funcionalidad básica, varianza replicada técnica y varianza replicada biológica. Estos conjuntos de sistemas de modelo permitieron los análisis en extremos de conjuntos fetal y proporcionaron un muestreo étnicamente y genéticamente diverso.

35 Conjunto de ADN 1: Funcionalidad de marcador básica

Este conjunto estaba compuesta de 121 muestras euploides normales (líneas celulares normales de cariotipo) que representan los grupos étnicos africano, sureste asiático, caucásico y mejicano, así como 55 muestras aneuploides T21 (líneas celulares T21). Estas muestras se distribuyeron sobre dos placas de 96 pocillos. Estas muestras se usaron para evaluar lo siguiente:

- 40 1) Si el marcador es funcional en un nivel básico, incluyendo la tasa de extensión y sesgo de alelo de un 50 % del teórico;
- 2) Si el marcador puede distinguir muestras euploides normales al 100 % de muestras aneuploides de T21 al 100 %; y
- 3) Si el marcador tiene un fuerte sesgo étnico en comparación con otras poblaciones étnicas.
- 45 Los ensayos que obtuvieron buenos resultados en este conjunto de modelo mostraron un sesgo étnico mínimo, tienen una diferencia significativa entre N y T21, y bajo CV. Véase la figura 5. Los ensayos que obtuvieron malos resultados mostraron un sesgo étnico, no tienen una diferencia significativa entre N y T21, y alto CV. Véase la figura

6.

Conjunto de ADN 2: Varianzas en replicados

Este conjunto estaba compuesto de una única muestra de ADN euploide (de una única línea celular diploide) para simular el historial materno, y una única muestra de ADN aneuploide enriquecida de T21 (de una única línea celular T21) para simular ADN fetal circulante. El ADN enriquecido en T21 fetal simulado se replicó 22 veces a un 0, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20 y 30 % del historial materno simulado para un total de 176 muestras. Estas muestras se distribuyeron sobre dos placas de 96 pocillos. Estas muestras se usaron para evaluar lo siguiente:

- 1) ¿Cuál es el CV (varianza técnica) de cada marcador en los 22 replicados técnicos de PCR?; y
- 2) ¿Qué efecto tiene incrementar el enriquecimiento de T21 del ADN fetal simulado, de un 0 a un 30,0 %, sobre la frecuencia de los alelos T21 de cada marcador en las muestras replicadas técnicas?

Los ensayos que obtuvieron buenos resultados en este conjunto de modelo mostraron una respuesta lineal, una buena coincidencia de la frecuencia de "alelo" esperada frente a la frecuencia de "alelo" observada (donde "alelo" se refiere al emparejamiento erróneo de secuencia detectable), y una gran diferencia entre N00 y N30. Véase la figura 7 – buen ensayo. Los ensayos que obtuvieron malos resultados no mostraron respuesta lineal, no mostraron diferencias entre N00 y N30, y mostraron una gran varianza técnica. Véase la figura 7 – mal ensayo.

Conjunto de ADN 3: Varianzas en replicados biológicos

Este conjunto estaba compuesta de 44 muestras de ADN euploides diferentes (de líneas celulares diploides) para simular el historial materno circulante emparejadas con 44 muestras de ADN T21 aneuploides diferentes (de líneas celulares T21) para simular ADN fetal circulante. El ADN enriquecido de T21 fetal simulado se replicó 44 veces a un 0, 5, 10 y 20 % del historial materno simulado para un total de 176 muestras. Estas muestras se distribuyeron sobre dos placas de 96 pocillos. Estas muestras se usaron para evaluar la 'discernibilidad' entre muestras normales y ADN T21, o más específicamente:

- 1) ¿Cuál es el CV de cada marcador en los 44 replicados biológicos?; y
- 2) ¿Qué efecto tiene incrementar el enriquecimiento de T21 del ADN fetal simulado, de un 0 a un 20,0%, sobre la frecuencia de los alelos T21 de cada marcador en las muestras replicadas biológicas?

Los ensayos que obtuvieron buenos resultados en el conjunto de ADN 3 mostraron una diferencia significativa entre las muestras N00 y N20, pequeñas varianzas en cada grupo, y la capacidad de un algoritmo para distinguir entre N00 y N20.

Muestras de ADN de modelo

Concentraciones

Las concentraciones en el sistema de modelo se ajustaron para simular, de manera simplificada, muestras derivadas de plasma. Para una prueba clínica, se podrían obtener probablemente 10 ml de sangre completa de la madre, lo que proporciona ~4 ml de plasma. En condiciones optimizadas, la extracción de ADN del plasma obtiene ~25 ng de ADN en 100 µl. Dada esta limitación clínica para las pruebas que someten a ensayo el ácido nucleico a partir de muestras de plasma, las concentraciones de ADN de modelo se normalizaron a ~0,25 ng/µl. Las concentraciones de ADN del ADN enriquecido usado para simular las contribuciones fetales se seleccionaron para variar de un 0 % - 30 % con un valor medio de un 15 %. Estos valores se seleccionaron en base a los intervalos estimados y los valores medios para contribución de ADN fetal en el plasma materno.

Fuente de muestra

El ADN de modelo se proporcionó por el depósito de ADN Coriell a partir de una extracción de ADN total de líneas celulares cultivadas con etnia conocida y estado de aneuploidia T21. Se escogió Coriell como fuente de ADN para el sistema de modelo debido a sus extensos antecedentes para proporcionar reactivos para investigación esenciales a la comunidad científica. Estas colecciones, apoyadas por fondos de los National Institutes of Health (NIH) y varias fundaciones, se utilizan por los científicos en todo el mundo y son extensas, bien caracterizadas y se pueden reponer en cualquier momento.

ADN de modelo euploide

Se escogieron las muestras euploides a partir de paneles de ADN bien caracterizados en el depósito Coriell que representan cuatro (4) grupos étnicos:

- Africano (AF) – PROYECTO HAPMAP INTERNACIONAL - YORUBA EN IBADAN, NIGERIA. La placa HAPMAPPT04, del Yoruba en Ibadan, Nigeria incluye un conjunto de 28 tríos, 2 dúos y 2 singulones con 90 muestras. La concentración de cada muestra de ADN se normaliza y a continuación esta concentración se

verifica.

- Asiático (AS) – PROYECTO HAPMAP INTERNACIONAL - JAPONESA EN TOKIO, JAPÓN Y CHINA HAN EN BEIJING, CHINA. La placa HAPMAPPT02 de 90 muestras individuales incluye 45 de etnia japonesa de Tokio y 45 de etnia china Han de Beijing. La concentración de cada muestra de ADN se normaliza y a continuación esta concentración se verifica.

- Caucásica (CA) – PROYECTO HAPMAP INTERNACIONAL - CEPH (DESCENDIENTES DE UTAH CON ASCENDENCIA DEL NORTE Y ESTE DE EUROPA). La placa HAPMAPPT01, de la colección CEPH, incluye un conjunto de 30 tríos (90 muestras). La concentración de cada muestra de ADN se normaliza y a continuación esta concentración se verifica.

- Mexicana (MX) – PROYECTO HAPMAP INTERNACIONAL - ASCENDENCIA MEXICANA EN LA, EE. UU. Estas líneas celulares y muestras de ADN se prepararon a partir de muestras de sangre extraídas de tríos (madre, padre y niño) a partir de poblaciones de origen mexicano en los Ángeles; CA. Las muestras de ADN de treinta tríos se han incluido en el panel designadas como HAPMAPV13. La concentración de cada muestra de ADN se normaliza y a continuación esta concentración se verifica.

ADN de modelo aneuploide T21

Se usaron cincuenta y cinco muestras de ADN T21 en el depósito Coriell para generar un muestreo biológicamente diverso de T21 para ayudar a incrementar la solidez genética del cribado de marcador. Se seleccionaron las muestras T21 identificando las muestras Coriell con "trisomía 21" como una descripción. La concentración de cada muestra de ADN se normalizó y se verificó.

Muestras derivadas de plasma

Para extraer ADN a partir de muestras de plasma materno, se usó el kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (procedimiento 4 ml). Un resumen del procedimiento de extracción se proporciona a continuación.

Recogida y preparación de muestra

El procedimiento se realiza preferentemente *ex vivo* en una muestra de sangre que se obtiene a partir de una mujer embarazada. Se puede usar plasma sanguíneo o suero "recién extraído", o plasma o suero congelado (almacenado) y posteriormente descongelado.

El plasma o suero congelado (almacenado) de forma óptima se congela poco después de que se extrae (por ejemplo, menos de 6-12 horas después de la extracción) y se mantiene en condiciones de almacenamiento de -20 a -70 grados centígrados hasta que se descongela y se usa. El plasma o suero "recién extraído" se debe refrigerar o mantener en hielo hasta su uso. La sangre se puede extraer por procedimientos estándar en un tubo de extracción, preferentemente de vidrio siliconado, sin anticoagulante para la preparación de suero, o bien con EDTA, citrato de sodio, heparina, o anticoagulantes similares para la preparación de plasma. El procedimiento de preparación preferente de plasma o suero para su almacenamiento, aunque no es un requisito absoluto, es que el plasma o suero en primer lugar se separa de la sangre completa antes de congelarse. El plasma o suero "recién extraído" se puede separar de la sangre completa por centrifugación, usando centrifugación suave a 300-800 x g durante de cinco a diez minutos, o separarse por otros procedimientos estándar. A menudo se emplea una segunda etapa de centrifugación para la separación de plasma o suero de la sangre completa durante de cinco a diez minutos a aproximadamente 20.000 a 3.000 x g, y a veces a aproximadamente 25.000 x g, para mejorar la proporción señal-ruído en posteriores procedimientos de detección de ADN.

El ADN fetal normalmente se detecta en igual a o menor de 10 ml de sangre, plasma o suero materno, más preferentemente en igual o menor de 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, 3,0, 2,5, 2,0, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2 o 0,1 ml, y cualquier valor intermedio, de sangre, plasma o suero materno. Dicho ADN fetal es preferentemente detectable en una muestra de sangre materna durante los primeros meses del embarazo, más preferentemente en el primer trimestre del embarazo y lo más preferentemente antes de la semana 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9 o 8 de gestación.

Sugerencias de preparación de la extracción de ADN

- Equilibrar las muestras a temperatura ambiente
- Si muestras son menores de 4 ml, llevar hasta el volumen con PBS
- Configurar QIAvac 24 Plus
- Calentar baño de agua a 60 °C
- Calentar bloque de calentamiento a 56 °C

- Equilibrar tampón AVE a TA
- Asegurar que el tampón ACB, ACW1, ACW2 se ha preparado de forma apropiada
- Añadir ARN de vehículo reconstituido al tampón ACL de acuerdo con gráfico

Nota: Una vez descongeladas, rotar las muestras de plasma a 1600 rpm durante 10 minutos. Esto ayuda a retirar los precipitados que se pueden producir debido a ciclos de congelación/descongelación.

Procedimiento

1. Pipetear 400 µl de Qiagen Proteinase K en un tubo de centrifuga de 50 ml
2. Añadir 4 ml de plasma al tubo
3. Añadir 3,2 ml de ACL con vehículo. Cerrar la tapa, y mezclar por pulso-vórtex durante 30 segundos
4. Incubar a 60 °C durante 30 minutos
5. Centrifugar brevemente el tubo para retirar gotas a partir del interior de la tapa
6. Añadir 7,2 ml de ACB al lisado en el tubo. Cerrar la tapa y usar pulso-vórtex durante 15-30 segundos.
7. Incubar la mezcla lisado/tampón ACB en el tubo en hielo durante 5 minutos
8. Añadir lisado/tampón ACB a expansores de tubo en columnas. Encender la bomba y se hayan extraído los lisados a través de la columna, apagar cada uno con sus válvulas individuales
9. Después de que hayan pasado todos los lisados, controlar el vacío usando válvula para colector
10. Usando un Eppendorf Repeater y 5 ml de Combitip, añadir 600 µl de ACW1 a cada columna
11. Añadir 750 µl de ACW2 a cada columna
12. Añadir 750 µl de etanol absoluto (prueba 200) a cada columna
13. Retirar expansores de tubo, cerrar las tapas en las columnas, disponer las columnas en tubos de recogida de 2 ml limpios y centrifugar a 20.000 rcf durante 3 minutos
14. Disponer las columnas en tubos de recogida nuevos de 2 ml. Abrir las tapas e incubar en bloque de calor a 56 °C durante 10 minutos para secar la membrana completamente
15. Disponer las columnas en tubos de recogida limpios y añadir 110 µl de tampón AVE al centro de columna
16. Cerrar las tapas e incubar a TA durante 3 minutos
17. Centrifugar las columnas en tubos de recogida a 20.000 rcf durante 1 minuto para eluir ADN

Bioquímica y protocolo de ensayo

Las especies de secuencias de nucleótidos de un conjunto comparten secuencias de hibridación de cebadores que, en un modo de realización, son sustancialmente idénticas, por tanto se amplificarán de manera reproducible con una eficacia sustancialmente igual usando un único par de cebadores para todos los miembros del conjunto. Se identifican diferencias de secuencias o emparejamientos erróneos entre dos o más secuencias de especies, y se cuantifican las cantidades relativas de cada emparejamiento erróneo, de las que cada una representa un cromosoma. Los procedimientos de detección que son altamente cuantitativos pueden someter a ensayo con exactitud la proporción entre los cromosomas. Por ejemplo, a continuación se proporcionan procedimientos ejemplares y composiciones para la detección y cuantificación de especies de secuencias de nucleótidos usando el sistema MassARRAY® de Sequenom.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Configuración de PCR

Las muestras que se van a analizar, ya sean del sistema de modelo o de plasma, se sometieron a amplificación por PCR. Dada la naturaleza diluida del ADNccf, la PCR se realizará en formato de placa de 96 pocillos con un volumen de reacción total de 50 µL compuesta de reactivos y muestras como se indica a continuación en la tabla 5. En general, se usaron condiciones de PCR estándar como se indica por el fabricante para los diversos experimentos.

Tabla 5: Reacción PCR PDA de ejemplo

Reactivo	Proveedor	Concentración final	Volumen (µl)
Agua	ND	ND	8,625
10x tampón de PCR (contiene MgCl ₂ 20 mM)	*02100 / Sequenom	1,0x	5,000
Mezcla nucleotídica de PCR (10mM) ea	Roche	200 µM	1,000
Mezcla de cebadores (0,5 µM) ea	IDT	0,1 µM	10,000
10 U/µL UNG	Roche	6,25 U/rxn	0,625
5 U/µl Fast Start	01462 / Sequenom	5 U/rxn	1,000
MgCl ₂ -tinte (20 mM)	*02100 / Sequenom	**3,5 mM	3,75
Total =	30,000		

*El número de artículo 02100 es un kit e incluye 10x tampón de PCR y MgCl₂ 25 mM.

** La concentración final de MgCl₂ es de 3,5 mM en cada 50 µl de reacción (2,0 mM de 10x tampón de PCR y 1,5 mM de la solución de 20 mM MgCl₂-tinte).

- 5 Se eligió un volumen de reacción de 50 µl por dos motivos. El primero es que la concentración baja de ADN libre de células circulante en plasma está entre 1000 y 2000 copias genómicas por µl, o 0,15 – 30 ng/µl requiere más volumen de muestra para cumplir con un valor diana práctico mínimo objetivo indicado por el fabricante del reactivo de ~5 ng por reacción. En segundo lugar, debido a que el procedimiento PDA se basa en pequeñas diferencias en el número de copias entre dos regiones de ADN paralogas en diferentes locus cromosómicos, una PCR de volumen mayor reduce el efecto de pequeños cambios de volumen y concentración que se pueden producir en la evolución normal de la preparación de la PCR y pueden incrementar la variabilidad en la amplificación por PCR.

Post-PCR

Distribución a una placa de 384 pocillos y desfosforilación

- 10 Después de transferir alícuotas de los amplicones de PCR a un formato de 384 pocillos, los cebadores de PCR restantes y dNTP se desfosforilaron usando fosfatasa alcalina de gamba (SAP). La reacción de desfosforilación se realiza a 37 °C y la enzima se inactiva por calor a 85 °C.

Tabla 6: Mezcla SAP

Reactivo de mezcla SAP	Número de artículo/Proveedor	Volumen para N=1 (µl)	Concentración final
Agua Nanopure	ND	1,536	ND
Tampón SAP (10X)	10055 / Sequenom	0,17	0,85x
Fosfatasa alcalina de gamba (SAP) (1,7 U/µl)	10002,1* / Sequenom	0,294	0,5 U/rxn
Volumen total		2	

*equivalente al producto SQNM #10144

- 15 Las placas de PCR de 96 pocillos se centrifugan en una centrífuga de mesa para consolidar el producto de PCR. Usando un manipulador de líquido Hamilton™, se distribuyen alícuotas de 4 x 5 µl en cuadrantes en una placa de 384 pocillos. Se almacena el producto de PCR restante (~30 µl) a -20 °C para un futuro uso.

1. Usando el Beckman Multimek de 96 cabezas, se distribuyeron 2 µl de mezcla SAP en cada alícuota de 5 µl.
2. Las placas se cerraron con película de cierre adhesiva y se centrifugó.
3. Se realizó la desfosforilación SAP en cicladores térmicos ABI 9700 con el siguiente programa:

Tabla 7: Perfil térmico de reacción de SAP

Temperatura	Tiempo	Ciclos	Comentarios
37 °C	40 minutos	1	Etapas de desfosforilación
85 °C	5 minutos	1	Inactivar SAP
4 °C	siempre	1	Almacenar reacción

- 20 Reacción de extensión de cebadores

- 5 Se usó la extensión de cebador de base individual para detectar el genotipo de alelo en una ubicación SNP, o en este caso, en la ubicación de emparejamiento erróneo de nucleótidos de interés. Se diseña un cebador de extensión con una secuencia específica de modo que el extremo 3' del cebador esté ubicado una base en dirección 5' de la ubicación heterocigótica fijada. Durante la parte de extensión del ciclo, se incorporó una base individual en la secuencia de cebador (extensión de base individual), que se determinó por la secuencia del alelo diana. La masa del producto de cebadores extendido variará dependiendo del nucleótido añadido. La identidad y cantidad de cada alelo se determinó por espectrometría de masas de los productos extendidos usando la plataforma MassARRAY de Sequenom.

Los componentes de la mezcla de extensión son como se describen en la siguiente tabla:

Tabla 8: Formulación de reactivo de mezcla de extensión

Reactivo de extensión	Número de artículo/Proveedor	Volumen para N=1 (µl)
Agua (calidad de HPLC)	VWR_JT4218-2	0,4
Tampón sin detergente TypePLEX (10x)	01431* / Sequenom	0,2
Mezcla de terminación TypePLEX	01533** / Sequenom	0,2
Mezcla de cebador de extensión	IDT	1
Thermosequenase (32 U/µl)	10052*** / Sequenom	0,2
Volumen total		2

*equivalente al producto SQNM #01449

**equivalente a productos SQNM #01430 o #01450

***equivalente a productos SQNM #10138 o # 10140

- 10
1. Se añadieron 2 µl de mezcla de reacción de extensión usando el Beckman Coulter Multimek de 96 cabezas, llevando el volumen de reacción total a 9 µl.
 2. La placa se cerró con película de cierre adhesiva y se centrifugó con una centrifuga de mesa.
 3. Se realizó la reacción de extensión de base en un ciclador térmico ABI 9700 con el siguiente perfil de ciclación:

Tabla 9: Perfil de ciclación térmica de extensión de base individual

Propósito	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización inicial	94	30 segundos	1
Desnaturalización de molde ciclado	94	5 segundos	} 5 } 40
Hibridación de cebador ciclado	52	5 segundos	
Extensión de cebador ciclado	80	5 segundos	
Extensión final	72	3 minutos	1
Control	4	durante la noche	1

- 15
4. Después de que se completa la reacción de extensión, almacenar la placa a 4 °C o continuar la etapa de desalación.

Reacción de desalación con resina CLEAN

- 20 Se desalaron los productos de extensión de cationes divalentes (en especial cationes de sodio) incubando las muestras con una resina de intercambio catiónico antes del análisis por MALDI-TOF.

Procedimiento

1. Se centrifugaron las placas en una centrifuga de mesa.
2. Se usó Beckman Multimek de 96 cabezas para añadir 20 µl de agua de autoclave a cada pocillo de la

placa de muestra.

3. Se usó Resin Dispenser de Sequenom (Modelo n.º XXX) para añadir suspensión de resina a cada pocillo de muestra.
4. Se cubrió la placa con un cierre adhesivo de lámina de aluminio y se giró durante al menos diez minutos a temperatura ambiente.
5. Se centrifugó la placa a 4000 rpm durante cinco minutos antes de distribuir la muestra en un SpectroCHIP.

Distribuir la muestra sobre un SpectroCHIP y analizar en el sistema MassARRAY

Se distribuyeron aproximadamente 15-20 nl de cada muestra sobre una almohadilla de un SpectroCHIP usando un Nanodispenser MassARRAY. Después de una rápida cristalización de la muestra, los analitos estaban listos para un barrido por MALDI-TOF.

Procedimiento

1. Se distribuyeron las muestras y el calibrante de 3 puntos en un SpectroCHIP 384-spot usando el Nanodispenser RS-1000. Se hace referencia a la guía de usuario de RS-1000 para instrucciones más detalladas.
2. Nota: Pueden ser necesarias diferentes velocidades de distribución dependiendo de la temperatura ambiente y humedad en la cámara de distribución. Las velocidades de distribución típicas son de 80 mm/s para analitos y 100 mm/s para la solución calibrante.
3. Después de la distribución, la placa se liberó y se almacenó a 4 °C o -20 °C durante un almacenamiento más prolongado. La placa se puede volver a centrifugar y volver a detectar en caso necesario.
4. Se dispuso el SpectroCHIP en su caja de almacenamiento y se almacenó en una cámara de desecado, si no se analizó inmediatamente después de la detección.
5. Se cargó el SpectroCHIP en el analizador MassARRAY PHOENIX se siguió la guía de usuario para analizar el chip y adquirir/almacenar los datos del espectro de masas.

Tres los experimentos a lo largo de cuatro niveles (y 3 conjuntos de modelo + un conjunto de plasma)

Los ensayos proporcionados en la tabla 4 se sometieron a prueba durante tres experimentos diferentes:

Experimento 1 – Marcadores seleccionados con Mix 1 Biochemistry (2 acyclo + 2 ddNTP)

Experimento 2 – Marcadores seleccionados con TypePLEX Biochemistry (todos de acylco)

Experimento 3 – Ensayos restantes no incluidos en el experimento 1 o 2

Durante cada experimento, se sometieron a prueba las muestras a través de cuatro niveles diferentes (o una combinación de los mismos). Dentro de cada nivel, se usaron los diferentes conjuntos de ADN (1, 2 o 3, o combinaciones de los mismos) para someter a prueba el rendimiento del ensayo.

Nivel I. Realizar el conjunto múltiple (MP) en el sistema de modelo y eliminar por filtración los ensayos que con mal rendimiento

Nivel II. Replexar los ensayos seleccionados en un nuevo múltiple y realizar en un sistema de modelo

Nivel III. Realizar el cribado genómico y seleccionar los 3 múltiples con mejor rendimiento

Nivel IV. Realizar los mejores ensayos en muestras de plasma para la evaluación del rendimiento verdadero. (Los procedimientos de extracción de muestras de plasma se describen con más detalle a continuación en la sección "Muestras derivadas de plasma")

Experimento 1

Los resultados de los diferentes niveles para el experimento 1 se describen a continuación, y el rendimiento binario de cada ensayo se resume en la tabla 13, en la que "sí" indica que el ensayo pasó el nivel, y "-" indica que el ensayo no se sometió a prueba o no se probó.

Resultados del nivel I

- Se sometieron a prueba 250 ensayos en 10 multiplexos en 6 placas de ADN diferentes
- Un 50 % de los ensayos no cumplieron los criterios de calidad

- Los ensayos de buena calidad muestran alguna señal biológica para la discriminación de muestras euploides y mezcladas normal/T21
- Más ADN T21 permite una mejor discriminación

Conclusión: El sistema de modelo de ADN es conciso y se puede usar para la identificación de marcadores.

5 Resultados del nivel II

- Desde el NIVEL UNO se transfieren 5 multiplexos.
- Se someten a prueba un total de 4 multiplexos replexados (que comprenden los 40 mejores ensayos).

Conclusiones: Los ensayos replexados muestran un buen rendimiento y una baja tasa de abandono. El rediseño de cebadores de extensión es mejor que un 'simple' replexado.

10 Resultados del nivel III

- Se sometieron a prueba más de 400 ADN genómicos de 4 grupos étnicos en multiplexos del NIVEL II
- Menos de un 10 % de los ensayos muestran variabilidad genómica
- Para los ensayos restantes, se observa variabilidad en menos de un 1 % de las muestras (es necesario excluir la variabilidad del procesamiento)

15 Conclusión: Los criterios de filtro usados durante el diseño de los ensayos son suficientes para identificar regiones genómicas altamente estables.

Resultados del nivel IV

- Se midieron 57 ensayos
- 75 muestras normales

20 • 23 muestras de T21

Los resultados del experimento I, nivel IV se proporcionan en la tabla 10 y se muestran en la figura 9. Los resultados de la figura 9 resultados se basan en un análisis de componentes de principio simple, y muestran que los dos componentes principales pueden separar muestras euploides de muestras aneuploides.

TABLA 10: Experimento I, Nivel IV Resultados de plasma

Procedimiento	Sensibilidad	Especificidad	ABC
Árbol de decisión	55%	85%	0,73
SVM – grano lineal	77%	91%	0,84
Regresión logística	77%	84%	0,89
Naïve Bayes	86%	91%	0,95
Perceptrón multicapa	91%	93%	0,97

25 Experimento 2 – Bioquímica de extensión TypePLEX

El experimento 2 se realizó usando bioquímica de extensión TypePLEX y un nuevo conjunto de ensayos (véase la tabla 4).

- Se repitió toda la viabilidad usando la bioquímica TypePLEX.
- La selección de regiones diana genómicas no se tuvo que repetir.

30 • Los ensayos se replexaron después del NIVEL 1.

• El nivel cuatro incluyó 150 muestras euploides y 25 muestras de T21.

Resultados del experimento 2: Estudio TypePLEX

- Se sometieron a prueba 250 marcadores.
- 120 pasaron los criterios QC para replexarse en 9 multiplexos.

- Se sometieron a prueba 3 multiplexos que comprenden 54 marcadores en muestras de plasma.
- > 90 % de exactitud de clasificación en el sistema de modelo de ADN.
- Se sometieron a prueba 150 muestras euploides
- Se sometieron a prueba 24 muestras de T21

- 5 • Se usó el ensayo cuantificador fetal (FQA) para determinar la cantidad de ADN fetal presente en las muestras después de la extracción de ADN.

TABLA 11: Experimento 2, nivel IV, resultados (de todas las muestras)

Procedimiento	Sensibilidad	Especificidad
Naïve Bayes	34%	97%
AdaBoost	48%	98%
Regresión logística	50%	87%
Perceptrón multicapa	61%	94%

TABLA 12: Experimento 2, nivel IV, resultados (de todas las muestras con >12,5 % o >15 % de ADN fetal)

Procedimiento	Sensibilidad	Especificidad
Naïve Bayes	43% (52%)*	97% (96%)
AdaBoost	55% (72%)	100% (100%)
Regresión logística	93% (99%)	98% (99%)
Perceptrón multicapa	75% (81%)	97% (99%)

* los valores en paréntesis representan las muestras con >15 % de ADN fetal

- 10 De todas las muestras sometidas a prueba en el experimento 2, 111 muestras tenían más de un 12,5 % de ADN fetal y 84 muestras tenían más de un 15 % de ADN fetal. El ensayo FQA se refiere al ensayo cuantificador fetal descrito en la solicitud de patente de los EE. UU. número 12/561.241 presentada el 16 de septiembre de 2009. El ensayo puede determinar la cantidad (o concentración) de ADN fetal presente en una muestra.

Experimento 3 – Ensayos restantes

- 15 Los ensayos restantes se analizaron a través de los conjuntos de ADN 1, 2 y 3 usando la bioquímica TypePLEX, y los resultados se proporcionan en la tabla 13 a continuación.

- En un modo de realización, un ensayo multiplexado se selecciona del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 o más de los siguientes conjuntos de secuencias de nucleótidos,
- 20 2FH21F_01_030, 2FH21F_01_041, 2FH21F_02_075, 2FH21F_02_076, 2FH21F_02_089, 2FH21F_02_091, 2FH21F_02_107, 2FH21F_02_111, 2FH21F_02_116, 2FH21F_02_148, 2FH21F_02_254, 2FH21F_03_005, 2FH21F_03_022, 2FH21F_05_003, 2FH21F_05_006, 2FH21F_05_027, 2FH21F_05_033, 2FH21F_05_061, 2FH21F_06_114, 2FH21F_06_165, 2FH21F_06_218, 2FH21F_06_219, 2FH21F_06_224, 2FH21F_06_238, 2FH21F_07_071, 2FH21F_07_166, 2FH21F_07_202, 2FH21F_07_464, 2FH21F_07_465, 2FH21F_09_007,
- 25 2FH21F_09_010, 2FH21F_10_005, 2FH21F_11_022, 2FH21F_11_028, 2FH21F_12_049, 2FH21F_12_052, 2FH21F_12_074, 2FH21F_12_075, 2FH21F_13_036, 2FH21F_13_041, 2FH21F_15_044, 2FH21F_18_020, 2FH21F_18_059, 2FH21F_18_076, 2FH21F_18_094, 2FH21F_18_154, 2FH21F_18_171, 2FH21F_18_176, 2FH21F_18_178, 2FH21F_18_188, 2FH21F_18_190, 2FH21F_18_191, 2FH21F_18_262, 2FH21F_18_270, 2FH21F_18_332 y 2FH21F_18_346, que corresponden a los conjuntos de secuencias realizados para el nivel IV del
- 30 experimento 3 (aunque no se realizan en muestras de plasma). Véase la tabla 13 a continuación.

Basándose en el análisis de los diseños y los resultados (ambos de los modelos y las muestras de plasma de los tres experimentos), se puede concluir que la investigación de varias regiones en paralelo, reduce la varianza de medida y permitió una cuantificación exacta del ccffADN. Además, debido a los bajos números de copias que se han de detectar es deseable tener medidas redundantes, lo que incrementará la confianza en los resultados.

TABLA 13

Marker_ID	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3			
	M1_All_211 nivel 1 Conjunto de ADN 1,2,3	M1_Replex_90 nivel 2 Conjunto de ADN 1,2,3	M1_Plasma_47 nivel 4 plasma	TypePLEX_All_246 nivel 1 Conjunto de ADN 1,2,3	TypePLEX_R_eplex_117 nivel 2 Conjunto de ADN 1,2,3	TypePLEX_Plasma_50 nivel 4 plasma	Full_Screen_All_1004 nivel 1 DNA set 1	Full_Screen_R_eplex1_236 nivel 2 Conjunto de ADN 1,3	Full_Screen_R_eplex2_92 nivel 3	Full_Screen_Plasma_56 nivel 4*
2FH21F_01_003	-	-	-	-	-	-	Si	-	-	-
2FH21F_01_006	-	-	-	-	-	-	Si	-	-	-
2FH21F_01_007	-	-	-	Si	-	-	-	-	-	-
2FH21F_01_009	-	-	-	-	-	-	Si	-	-	-
2FH21F_01_010	-	-	-	-	-	-	Si	-	-	-
2FH21F_01_011	-	-	-	-	-	-	Si	-	-	-
2FH21F_01_012	-	-	-	-	-	-	Si	-	-	-
2FH21F_01_013	-	-	-	Si	-	-	-	-	-	-
2FH21F_01_014	-	-	-	-	-	-	Si	-	-	-
2FH21F_01_015	-	-	-	Si	Si	Si	-	-	-	-
2FH21F_01_017	-	-	-	-	-	-	Si	-	-	-
2FH21F_01_018	-	-	-	-	-	-	Si	-	-	-
2FH21F_01_020	-	-	-	-	-	-	Si	-	-	-
2FH21F_01_021	Si	Si	Si	-	-	-	Si	-	-	-
2FH21F_01_022	-	-	-	-	-	-	Si	-	-	-
2FH21F_01_023	-	-	-	-	-	-	Si	-	-	-
2FH21F_01_025	-	-	-	-	-	-	Si	-	-	-
2FH21F_01_026	-	-	-	Si	-	-	-	-	-	-
2FH21F_01_027	Si	-	-	-	-	-	Si	-	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
2FH21F_01_029	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_030	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_01_031	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_01_033	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_01_034	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_036	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-
2FH21F_01_037	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-
2FH21F_01_038	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_039	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_040	Sí	Sí	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_01_041	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_01_043	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_044	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_045	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_046	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_01_049	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_01_050	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_057	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_01_058	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_059	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_060	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_062	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_063	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_064	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_065	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_067	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_068	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_071	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Experimento 1		Experimento 2			Experimento 3		
	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_072	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_073	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_077	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_078	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_080	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_081	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_082	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_083	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-
2FH21F_01_084	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_086	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_088	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_090	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_01_093	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_094	Sí	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_01_099	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_101	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_102	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_01_104	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_003	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_02_007	-	-	Sí	Sí	-	-	Sí	-
2FH21F_02_015	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_02_017	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_02_018	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_019	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_020	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_021	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_022	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_02_023	-	-	-	-	-	Sí	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_027	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_034	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_035	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-
2FH21F_02_036	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_037	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_02_038	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_040	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_041	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_043	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_045	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_050	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_02_055	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	Sí	-
2FH21F_02_057	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_058	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_061	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_02_062	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_063	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_02_065	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FK21F_02_066	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_067	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_072	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_073	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_074	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_02_075	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_02_076	-	-	-	-	-	-	Sí	-	Sí
2FH21F_02_077	Sí	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-
2FH21F_02_088	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_02_089	-	-	-	Sí	Sí	-	-	Sí	Sí

	Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3			
2FH21F_02_090	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_091	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	Sí
2FH21F_02_103	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_107	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	Sí	-	Sí
2FH21F_02_108	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_111	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	Sí	-	Sí
2FH21F_02_113	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_02_116	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	Sí
2FH21F_02_127	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_129	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_132	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_134	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_139	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_143	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_144	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_145	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_146	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_148	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	Sí
2FH21F_02_150	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_02_151	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_155	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_156	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_157	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_158	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_159	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_163	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_168	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_02_170	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
2FH21F_02_172	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_173	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_174	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_175	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_177	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_178	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_181	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_182	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_184	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_185	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_189	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_190	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_191	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_193	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_194	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-
2FH21F_02_195	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_200	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_204	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_206	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_207	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_208	Sí	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-
2FH21F_02_211	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_212	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_213	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_214	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_215	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_216	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_217	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
2FH21F_02_218	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_219	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_220	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_02_223	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_226	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_227	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_228	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_02_230	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_232	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_234	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_235	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_236	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_239	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_241	Sí	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_02_243	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_248	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_249	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_250	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_02_254	-	-	-	-	Sí	-	-	Sí	Sí
2FH21F_03_005	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_03_007	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_03_008	-	-	-	-	Sí	-	-	Sí	-
2FH21F_03_011	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21FJ)3_012	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_03J)13	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_03_014	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_03_015	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_03_017	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3			
	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_021	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_03_022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_026	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_03_027	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_030	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_031	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_039	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_040	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_043	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_053	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_058	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_061	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_062	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_063	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_064	Sí	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_065	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_071	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_073	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_079	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_080	Sí	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_081	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_083	Sí	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_084	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_085	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_03_087	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3			
2FH21F_03_088	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_03_089	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_03_091	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_03_093	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_03_094	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_03_095	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_03_097	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_03_098	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_03_100	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_03_101	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	Sí	-	-
2FH21F_04_006	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_04_008	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_04_010	Sí	Sí	Sí	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_04_011	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_04_014	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_04_015	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_04_017	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_04_018	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_04_019	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_04_021	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	Sí	-	-
2FH21F_04_022	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_04_023	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_04_024	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_003	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	Sí
2FH21F_05_005	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_05_006	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	Sí	Sí
2FH21F_05_007	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_008	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-

	Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3			
2FH21F_05_013	--	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	Sí	-
2FH21F_05_015	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_016	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_05_018	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_05_019	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_05_025	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_05_026	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_027	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	Sí	Sí
2FH21F_05_028	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-
2FH21F_05_032	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_05_033	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_05_034	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_035	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_05_040	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_041	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	Sí	-	-
2FH21F_05_044	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_045	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_05_047	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_05_051	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_054	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_058	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_05_061	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	Sí
2FH21F_05_064	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_05_066	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_067	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_069	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_072	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_05_073	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-

	Experimento 1				Experimento 2			Experimento 3			
2FH21F_05_074	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_076	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_080	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_083	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_05_088	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_091	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	Sí	Sí	-
2FH21F_05_092	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_094	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_05_096	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_05_097	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_05_098	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_099	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_101	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_102	Sí	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_109	Sí	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_05_110	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_001	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_004	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_005	Sí	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_006	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_007	Sí	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_06_011	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_012	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_06_013	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_015	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_018	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_023	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_025	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
2FH21F_06_026	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_06_028	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_029	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_06_031	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_034	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_035	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_037	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_038	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_045	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_046	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_047	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	Sí	-
2FH21F_06_051	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_06_052	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_053	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_06_060	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_061	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_062	-	-	-	-	Sí	-	-	Sí	-
2FH21F_06_064	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_06_065	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_068	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_073	-	-	-	-	Sí	-	-	Sí	-
2FH21F_06_075	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_076	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_077	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_079	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_06J)82	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_083	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_084	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3			
2FH21F_06_088	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_092	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-
2FH21F_06_093	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_095	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_099	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_102	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_107	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_110	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_111	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_112	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_113	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_114	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	Sí
2FH21F_06_117	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_118	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	Sí	-	-
2FH21F_06_119	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_127	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_128	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_129	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_130	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_132	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_133	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_134	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_135	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_137	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_138	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_140	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_141	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-
2FH21F_06_142	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-

	Experimento 1				Experimento 2			Experimento 3			
	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_144	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_147	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_148	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	Sí	-	-
2FH21F_06_149	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_150	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_153	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_155	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_156	-	-	-	-	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_06_159	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_163	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_165	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_06_166	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_168	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_172	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_176	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_179	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_182	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_183	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_194	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_196	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_198	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_06_204	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_218	-	-	-	-	Sí	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_06_219	Sí	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_06_224	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	Sí
2FH21F_06_228	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_229	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_233	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3			
							Sí	-	Sí	Sí
2FH21F_06_238	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	Sí
2FH21F_06_239	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_241	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_242	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_243	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_250	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_06_251	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_252	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_253	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_254	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_258	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_259	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_06_263	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_06_264	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_268	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_275	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_277	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_278	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-	Sí	-
2FH21F_06_279	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	" "	-
2FH21F_06_284	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_06_288	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_002	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_003	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_004	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_009	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_016	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_017	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_018	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-	-

	Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3			
2FH21F_07_021	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_022	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_025	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_07_026	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_027	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_028	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_029	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_030	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_033	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_035	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_036	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_037	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_042	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_050	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_052	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_053	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_057	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_058	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_059	Sí	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_07_061	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_063	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_064	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_07_067	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_071	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	Sí
2FH21F_07_072	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_074	Sí	Sí	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_081	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_07_082	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3		
2FH21F_07_084	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_088	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_090	Sí	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_094	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_095	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_07_105	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_106	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_109	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07J12	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_115	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_116	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_117	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_119	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_122	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_128	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_130	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_131	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_07_135	Sí	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_136	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_138	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_142	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_143	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_147	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_150	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_07_151	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_152	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_153	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_07_156	-	-	Sí	-	-	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
2FH21F_07_157	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_160	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_07_161	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_164	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_166-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	Sí	Sí
2FH21F_07_168	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_176	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_178	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_179	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_180	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21FJ7_181	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_07_183	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_07_186	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_07_187	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_188	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_194	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_195	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_198	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_200	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_202	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_07_203	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_207	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_210	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_211	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_212	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_214	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_215	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07J216	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
2FH21F_07_219	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_220	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_223	.	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_226	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_228	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_07_229	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_07_230	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_233	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_234	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_235	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_238	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_07_239	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_240	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_07_241	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_242	-	-	-	-	Sí	-	-	Sí	Sí
2FH21F_07_243	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_245	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_247	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_07_253	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_254	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_07_256	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_262	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_264	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_268	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_07_269	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_271i	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_271	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_277	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
	-	-	-	-	Sí	-	Sí	-	-
2FH21F_07_279	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_07_282	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_07_283	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_289	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_293	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_298	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_302	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_303	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_304	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_305	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_306	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_307	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_308	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_309	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_07_312	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_321	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_323	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_325	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_329	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_331	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_332	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_333	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_334	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_335	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_337	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_340	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_343	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_347	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
2FH21F_07_349	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_351	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_352	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_354	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_355	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_356	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_357	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_358	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_359	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_360	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_365	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_366	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_367	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_07_368	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_07_369	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_370	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_371	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_373	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_374	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_07_375	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_376	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_377	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_380	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_381	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_385	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_391	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_393	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_394	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
2FH21F_07_395	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_07_397	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_07_398	Sí	Sí	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_07_399	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_07_402	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_07_403	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_405	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_406	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_07_407	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_07_416	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_419	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_420	Sí	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_07_421	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_07_422	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_423	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_426	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_07_427	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_429	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_07_430	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_07_431	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_434	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_437	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_438	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_439	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_443	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_444	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_445	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_447	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
		-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_452	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_454	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_457	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_459	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_460	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_462	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_463	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_07_464	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_07_465	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_07_466	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21FJ7_474	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_475	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_476	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_479	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_480	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_07_482	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_07_483	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_08_001	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_08_003	Sí	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_08_004	Sí	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_08_008	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-
2FH21F_08_009	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_08_010	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	Sí	-
2FH21F_08_013	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_08_014	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_08_016	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_08_017	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_09_004	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	Sí

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3			
2FH21F_09_005	-	-	-	-	Sí	Sí	-	Sí	-	-
2FH21F_09_007	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	Sí
2FH21F_09_010	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_09_013	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_09_016	Sí	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_09_018	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_10_003	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_10_005	Sí	-	-	-	Sí	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_10_006	Sí	Sí	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_10_007	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_10_011	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_10_016	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_10_018	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_10_019	-	-	-	-	Sí	-	-	Sí	-	-
2FH21F_10_020	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_11_001	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_11_002	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_11_003	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_11_005	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_11_006	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_11_007	Sí	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_11_008	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_11_010	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_11_012	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_11_013	Sí	Sí	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_11_014	Sí	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_11_015	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_11_019	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-

	Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3			
	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_11_020	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-
2FH21F_11_022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_11_023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_11_024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_11_026	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_11_027	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_11_028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_11_029	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_11_030	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_11_033	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_011	Sí	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_012	Sí	Sí	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_032	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_036	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_039	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_049	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_050	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_051	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_052	Sí	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_053	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_054	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_057	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_058	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
2FH21F_12_060	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_064	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_066	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_068	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_071	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_072	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_073	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_074	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_075	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_076	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_077	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_078	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_079	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_080	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_081	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_082	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_083	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_084	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_086	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_088	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_094	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_095	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_098	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_103	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_104	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_105	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_106	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_12_107	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
		-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_12_112	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_12_113	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_12_114	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_005	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_13_019	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_020	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_022	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_023	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_026	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_13_028	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_031	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_032	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_033	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_035	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_036	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_13_039	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_040	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_041	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_13_042	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_043	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_046	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_047	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_048	Sí	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_13_049	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_051	Sí	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_13_052	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_13_054	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_13_057	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-

	Experimento 1		Experimento 2			Experimento 3			
2FH21F_13_059	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_060	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_062	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_065	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_066	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_068	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_13_071	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_13_077	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_079	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_082	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_083	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_084	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_088	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_099	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_101	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_13_105	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_107	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_108	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_110	Sí	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_13_111	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_13_112	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_14_006	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_14_008	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_14_010	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_14_011	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_14_012	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_14_013	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_14_015	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_14_016	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_14_017	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_14_018	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_14_026	Sí	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-
2FH21F_14_027	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_14_028	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_14_033	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_14_035	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_14_037	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_14_039	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_14_040	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_002	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_004	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_005	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_009	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_010	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_011	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_015	Sí	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_15_016	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_017	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_15_018	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_019	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_021	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_024	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_025	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_026	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_027	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_030	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-

	Experimento 1		Experimento 2			Experimento 3			
	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_031	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_032	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_033	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_034	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_038	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_040	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_041	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_042	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_043	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_044	Sí	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	Sí
2FH21F_15_045	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_15_046	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_047	Sí	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_15_048	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_050	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_054	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_057	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_061	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_15_068	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_15_069	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_070	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_074	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_075	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_076	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_077	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_079	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_15_082	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_083	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-	-	-

	Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3			
2FH21F_15_084	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_085	Sí	Sí	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_086	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_091	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_092	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_093	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_097	Sí	Sí	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_15_101	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_103	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_15_106	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_107	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_119	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_126	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_128	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_130	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_134	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_135	Sí	Sí	-	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_137	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_139	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_142	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_144	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_146	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_15_147	-	-	-	-	-	Sí	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_15_148	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_149	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_150	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_151	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_15_152	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
2FH21F_15_153	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_156	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_157	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_160	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_165	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_15_170	-	-	-	Sí	Sí	-	-	Sí	-
2FH21F_15_175	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_178	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_180	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_182	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_191	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_193	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_195	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_196	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_198	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_200	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_109	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_210	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_15_211	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_15_212	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_15_214	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_217	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_218	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_15_219	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-
2FH21F_15_220	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_15_221	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_15_222	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_223	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
2FH21F_15_228	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_231	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_234	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	Sí	-
2FH21F_15_236	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_237	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_238	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_239	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_241	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_15_242	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_243	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_15_244	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_15_247	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_15_248	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_16_004	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_16_005	Sí	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_16_006	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_16_110	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_16_011	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_16_012	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_16_014	Sí	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_16_015	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-
2FH21F_16_016	Sí	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_16_018	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_16_019	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_16_021	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_16_022	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_16_023	Sí	-	-	Sí	Sí	Sí	-	Sí	-
2FH21F_16_024	Sí	Sí	-	Sí	-	-	-	-	-

	Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3			
2FH21F_16_025	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_17_004	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_17_006	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_17_008	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_17_009	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_17_010	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_17_011	Sí	Sí	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_17_012	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_17_014	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_17_015	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_17_020	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_17_021	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_17_022	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_17_023	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_18_002	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_18_005	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_18_006	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_007	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_019	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_020	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	Sí
2FH21F_18_021	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_023	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_18_031	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_035	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_042	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_18_044	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_045	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_18_046	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-

	Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3			
2FH21F_18_047	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_048	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_050	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_051	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_054	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_18_055	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_059	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	Sí
2FH21F_18_060	Sí	Sí	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-
2FH21F_18_061	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-
2FH21F_18_063	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_065	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_066	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_067	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_068	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_070	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_071	Sí	Sí	-	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_072	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_074	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_076	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	Sí
2FH21F_18_078	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_083	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-
2FH21F_18_086	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_090	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_094	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	Sí
2FH21F_18_101	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_103	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_117	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_120	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-

	Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3			
2FH21F_18_122	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_123	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_126	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_127	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_132	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_133	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_136	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_18_137	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_138	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_139	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_18_141	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_18_142	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_143	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_144	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_145	Sí	Sí	-	Sí	Sí	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_18_149	Sí	Sí	-	Sí	Sí	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_18_151	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_18_153	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_154	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	Sí
2FH21F_18_156	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_158	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_159	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_160	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_161	Sí	Sí	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_162	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_171	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	Sí
2FH21F_18_172	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_173	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3		
2FH21F_18_174	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_175	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_176	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_18_178	Sí	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_18_186	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_188	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_18_190	-	-	Sí	-	-	Sí	Sí
2FH21F_18_191	Sí	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_18_194	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_195	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_18_197	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_198	Sí	-	Sí	Sí	-	Sí	-
2FH21F_18_199	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_200	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_201	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_202	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_203	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_18_204	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_212	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_213	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_216	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_217	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_219	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_223	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_224	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_226	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_233	Sí	Sí	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_234	-	-	-	-	Sí	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_241	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-
2FH21F_18_243	-	-	-	Sí	-	-	-	Sí	-
2FH21F_18_244	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_245	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_252	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_18_254	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_255	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_260	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_261	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_262	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_18_268	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_269	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_18_270	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_18_271	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_272	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_273	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_274	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_275	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_276	-	-	-	Sí	-	-	-	Sí	-
2FH21F_18_277	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_284	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_292	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_293	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_296	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-
2FH21F_18_300	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_301	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_303	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_18_304	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
2FH21F_18_305	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_307	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_18_314	Sí	Sí	-	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_18_319	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_326	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_327	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_328	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_329	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_330	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_332	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	Sí	Sí
2FH21F_18_333	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_340	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_344	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_346	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_18_349	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_350	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_351	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_18_352	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_354	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_355	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_357	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_364	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_365	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_369	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_18_370	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_375	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_380	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-
2FH21F_18_386	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
2FH21F_18_388	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_398	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_399	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_402	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_403	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_405	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_408	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_409	-	--	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_412	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_414	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_415	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_417	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_18_419	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_427	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_428	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_429	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_430	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_432	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_434	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_435	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_441	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_446	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_457	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_459	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_460	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_461	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_462	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-
2FH21F_18_463	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3			
2FH21F_18_466	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_467	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_18_468	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_18_469	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_470	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_472	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_18_474	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_475	-	-	-	Sí	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_18_476	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_480	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_18_481	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_482	-	-	-	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_483	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_485	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_490	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_491	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_18_494	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_497	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_501	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_502	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_503	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_504	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_18_505	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_506	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_508	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_509	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_18_510	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_18_511	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	Sí	-	-

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3		
2FH21F_18_512	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_513	Sí	Sí	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_515	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_516	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_517	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_518	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_519	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_520	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_521	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_522	-	-	Sí	Sí	-	Sí	-
2FH21F_18_523	Sí	-	Sí	Sí	-	Sí	-
2FH21F_18_524	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_525	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_526	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_527	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_529	Sí	-	Sí	Sí	-	Sí	-
2FH21F_18_530	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_534	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_535	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_536	Sí	-	-	-	Sí	-	Sí
2FH21F_18_537	-	-	Sí	Sí	-	-	-
2FH21F_18_538	-	-	Sí	-	-	Sí	-
2FH21F_18_539	Sí	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_543	-	-	Sí	-	-	-	-
2FH21F_18_545	-	-	-	-	Sí	-	-
2FH21F_18_548	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí
2FH21F_18_549	-	-	-	-	Sí	Sí	-
2FH21F_18_555	-	-	-	-	Sí	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3			
							Sí	Sí	Sí	-
2FH21F_18_565	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_18_566	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-
2FH21F_18_567	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_18_570	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_571	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_574	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_576	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_577	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-
2FH21F_18_579	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_583	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_585	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_590	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_18_594	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-
2FH21F_19_004	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_19_005	Sí	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_19_006	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_19_007	Sí	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_19_010	Sí	Sí	-	Sí	Sí	-	-	-	-	-
2FH21F_19_012	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-
2FH21F_19_014	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-
2FH21F_19_015	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_19_016	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_19_018	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_19_022	Sí	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_19_026	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_19_027	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-
2FH21F_19_028	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_19_030	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-

	Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3			
	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	Sí	-	-
2FH21F_19_031												
2FH21F_20_003	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_20_004	Sí	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_20_006	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_20_007	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_20_008	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_20_009	Sí	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_20_010	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_20_011	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_20_012	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_20_013	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_20_014	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_20_015	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_20_016	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_20_017	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-	-
2FH21F_20_018	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_20_020	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_22_012	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_22_016	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_22_017	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_22_018	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_22_019	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_22_021	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_22_025	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_22_026	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_22_028	Sí	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_22_029	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-
2FH21F_22_030	-	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
2FH21F_22_035	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_036	-	-	-	Si	-	-	-	-	-
2FH21F_22_037	-	-	-	Si	-	-	-	-	-
2FH21F_22_040	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_042	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_043	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_044	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_047	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_048	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_051	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_055	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_056	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_057	-	-	-	Si	-	-	-	-	-
2FH21F_22_059	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_061	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_062	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_067	-	-	-	-	-	-	Si	Si	-
2FH21F_22_068	Si	-	-	Si	-	-	-	-	-
2FH21F_22_073	Si	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_074	Si	-	-	Si	-	-	-	Si	-
2FH21F_22_075	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_076	Si	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_077	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_078	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_079	-	-	-	Si	Si	-	-	-	-
2FH21F_22_080	Si	-	-	Si	-	-	-	-	-
2FH21F_22_081	-	-	-	Si	-	-	-	-	-
2FH21F_22_082	-	-	-	-	-	-	Si	-	-
2FH21F_22_085				Si					

*Experimento 3, nivel IV, los conjuntos de secuencias no se han sometido a prueba en muestras de plasma.

Esquema múltiple

En la tabla 14 a continuación se proporciona un esquema múltiple con un subconjunto de conjuntos de secuencias de nucleótidos con buen rendimiento. El esquema múltiple se diseñó en primer lugar incluyendo los conjuntos de secuencias con mejor rendimiento a partir de los conjuntos de ADN 1 y 3 del experimento 3 y replejando estos conjuntos. Este enfoque garantiza que estos conjuntos con mejor rendimiento se incluyan en un diseño y están más altamente representados en un esquema múltiple individual. A continuación, se realizó un "superplejo". La superplexación toma un ensayo existente (en este caso, el replejo con mejor rendimiento a partir de los conjuntos de ADN 1 y 3) y añade conjuntos de secuencias con mejor rendimiento para llenarlo hasta un nivel de plexos deseado (en este caso 56 conjuntos de secuencias). Este enfoque optimiza los marcadores en un esquema múltiple consolidado. Cuando se diseñan los esquemas múltiples, los marcadores que están muy próximos (<1000 bases) y puede coamplificar no están incluidos en la misma reacción múltiple individual. En la tabla 14, POCILLO corresponde a los conjuntos de secuencias incluidos en la misma reacción individual, es decir, la totalidad de los conjuntos de secuencias del pocillo W1 se someten a ensayo en la misma reacción individual

TABLA 14: Esquema múltiple

Pocillo	MARKER_ID	Cebador de PCR 1	Cebador de PCR 2	Cebador de extensión
W1	2FH21F_01_030	GTACTCAAATCAAATTGGC	GAGGCAACTAGGACTTAAGG	TCAAATTGGCTTACTTGC
W1	2FH21F_02_075	GAAAAAGTGCATGCTTTG	AGATTATGATGCACCTGGCCT	TGATGAATGCAGTGAAGTC
W1	2FH21F_02_107	CCCAGATGAAGGGGTTTATG	GGAAAGTTAGAGGCCACAC	GTTTAGTATTGAATTTAGTGCTTAG
W1	2FH21F_02_148	AAGACCAAGATTCAGAAGC	TTGTTGCTCCAAGTTTAAG	GCAGGGCTATGCGGGAG
W1	2FH21F_05_006	GTGAATTCTTCCCACCTTCTC	GTTTCCCATATCTAGATGTC	CACCTTCTCACTTATCATCTG
W1	2FH21F_06_114	GAGAATTAAATGAACCTGAG	TACTTAATCCTTTTGCCCTC	GAATTAAATGAACCTGAGGATTTTC

Pocillo	MARKER_ID	Cebador de PCR 1	Cebador de PCR 2	Cebador de extensión
W1	2FH21F_06_165	GGTACCACCTCATCCATAAAC	GGGCTGTTTCAATGAGGGAC	TCCATAAACACCAACACT
W1	2FH21F_06_219	ACCCCTCAGTACCACATCTCTC	CTTGATTAATAAAGAGTGG	CCTCAGTACCACATCTCAATCTT
W1	2FH21F_06_224	CAAGGATTCCAGTACTGGAG	GGAGTCAAGGGAGCATTTTA	CCAGTACTGGAGAAATGCT
W1	2FH21F_09_007	CATATTGCTGTGTACTTG	GAGGCAACATTATACACAC	TTGCTGTGTACTTGIGCTCT
W1	2FH21F_11_022	GGAATGTTCCACCTTTCTAC	ACTGAAGTCATTCTTAGG	AATGTTCCACCTTTCTACCTTTTTT
W1	2FH21F_12_052	CTTCAAGGCAATCTTTCTCC	GCAGGTTACAGGAAGTTTC	GCAATCTTTCTCCATAAACATA
W1	2FH21F_12_074	ACCAGCTACATCTAGATTAC	CTGTGAGGCCAATGCAAAATG	GCTACATCTAGATTACAAGCCTTAT
W1	2FH21F_18_094	AGCTCCGCTTTGATTTTCAGG	GTGGCTATGAAGACAGCCT	TTGATTTGAGGCTTCATAGTTTG
W1	2FH21F_18_171	TTCCTGATGATAATCTTCCC	GGGAAGATCTTAAGGGAGC	TATAGCCAATAAATTACTCTTATTTTA
W1	2FH21F_18_176	AACGGCCAGGGTGGACACT	ACACCACATTTCTACCACTG	GCCAGGGTGGACACTGTTACT
W1	2FH21F_18_191	GATGCTTCTAAGGACCATGT	TGATACAGAAATGCAACCC	GGACCATGTAATTTCTTTAATTC
W1	2FH21F_18_262	CCATAGCAAGATGAATTCAC	CTCCCCAAAGTCTCAGATAG	CAAGATGAATTCACTTAACGAAGTT
W2	2FH21F_01_041	CACCAGTATCAGCAATAGCIT	GGAACAGTGTGATAAAGACT	TCAGCAATAGCTTTTGACTT
W2	2FH21F_02_091	GTGCCTAAGGACAACTTTTTC	CCAAATTTTCAAGCAAAAGC	GGACAACCTTTTCTTTTCTCTCT
W2	2FH21F_05_003	GAACCAIGGTTTGGGTTTAC	GAAGTGGCCTATCAGGTCT	CTGTTCTATTACAGTGTCTTC
W2	2FH21F_05_033	AATAAGTCCAGAGTATGGC	GGACTTTGGCACCCCAAGGA	AGAGTATGGCTGGGAATT
W2	2FH21F_07_166	ATCCAAAGGGCTATCICCCAC	TTCTACCTCCTCCTTGGCTTC	CCGGCTCTGAACGCCCTC
W2	2FH21F_07_202	GCTGGATACCTAATTAATGC	GTTACACTGCAAGCAATTTTC	GAACCAAAACAAGGAAAAATAC
W2	2FH21F_07_464	AGGTAGTCTCTAAGTTAC	GGCAACATAATTTGGATGGG	AGGTAGTCTCTAAGTTACCAAAATC
W2	2FH21F_09_010	ACAAATATTGACAGGCAGCA	CTGTGTCAATATGTGACTG	GACAGGCAGCAGATTAT
W2	2FH21F_10_005	GAACAGCTATATTTCAAAACC	TTTCAGACCAATTTTGAAC	AACAGCTATATTTCAAAACCCTTTTTA
W2	2FH21F_12_049	CTTCCTGTGAACCTGCTTTC	AAGAGGGAAGATGACTTTTC	GCTATCTTACTTTTCTTTTATCCAC
W2	2FH21F_12_075	GAGGCCAATGCAAAATGTAGG	CAGAGGGTAGAAGGGAGGC	GTAATCTAGATGTAGCTGGTATCA
W2	2FH21F_13_036	CTTATCCTTTGGGCTCTCTC	GAGTCTAGTTTGGCAAACTT	TTAACCTCTGTTTCAAAATACTGG
W2	2FH21F_13_041	TTGTGTGTAGGATTATGAGC	ATGCTGATGAACCCGACCTTC	TGTGTGTAGGATTATGAGCATCCATT
W2	2FH21F_15_044	GAATGTAGCTGTGTTAGGG	CTGGGCAACTGTGAAAAGAC	TGTAGCTGTGTTAGGGATAGGAGA
W2	2FH21F_18_020	TCCCTCTCTCCCTGAAAAAG	GACCAAGTGATACATAG	AAAAGAGACACATTTGGCCTTTG
W2	2FH21F_18_076	GACTAGGTTACTGAGCAAGG	CCTTTTAAATATGCAAGG	GTTACTGAGCAAGGAAAAATAA
W2	2FH21F_18_154	TTAGATTGTTATCCCCACT	TAAATGAGCAGAGACTCAAG	TGTTATCCCCACTTCTTTAA

Pocillo	MARKER_ID	Cebador de PCR 1	Cebador de PCR 2	Cebador de extensión
W2	2FH21F_18_190	AAGAACCTCCAGGGCTACTTG	AAAGCTTTAAACAAGTTGGCG	AGGGCTACTTGAACAAAT
W2	2FH21F_18_270	TGGTCTCAACACTGACCAC	GTTGTGACTATTGTTATAG	CCACTAGTATTAAACATACAGTTTA
W2	2FH21F_18_332	ATGTAGGCATTGTAATGAGG	GACTTGAATTTAACTGCTCC	AATGAGGTTTTTGGTCTTTG
W2	2FH21F_18_346	GATAACATAAGATTAGGAAC	AACCTGCTTCAAGATCTG	ACATAAGATTAGGAACAAGAATA
W3	2FH21F_02_076	GATTATGATGCACCTGGCTG	GAAAAAGTGCATGCTTTG	GACTTCACTGCATTCATCAGC
W3	2FH21F_02_089	CTGAAGAAGTGTAATAATGGC	GTCACCAAACTACAATTAG	GGCAACATGCATATAGAG
W3	2FH21F_02_111	CTGCTAACTCAGATACCTGC	CTTCCAAAAACCCACAATC	CAGATACTGCATGTCA
W3	2FH21F_02_116	GTCTCACATCCCATTTACAG	AGGGCTGCAGGGACAGTAG	CCCATTTACAGTTTATGTGCTAGCTAC
W3	2FH21F_02_254	TCAATTAGAAATCTAGTGC	TATTTTATTTCCCAATGTAG	CAATTAGAAATCTAGTGCAAAAGAAT
W3	2FH21F_03_005	TATATAATACTTAGTTTGG	TCATCCCAATTTCTCAACTC	ATACTAGTTTTTGGTCATCAA
W3	2FH21F_03_022	TCCCTTATGGGAGGAGGAG	GCTGATCAAGGCAGTTTTTC	TTTCTTTCTATGTCTTTGGTTAT
W3	2FH21F_05_027	ATTGGCCAACATCTCAACAG	TTTAGCATTCGACAGACTCAG	ACATCTCAACAGAGTTACA
W3	2FH21F_05_061	GTGTGCTTGGCTCCTAAATT	ACTGTTAIGTACATTATATC	CCTCCTAATTTAAAATACTGTATTCT
W3	2FH21F_06_218	GAAAGTCTTGTATTAAAG	ACCTCAGTACCAGTATCTC	AAGTTCTTGTATTAAAAGAAGTGG
W3	2FH21F_06_238	IGTTCTTGGTTGACTTTAC	TGTGTGCAAGGCTCTAGAAG	AACAGAGAAAAATTAAAATCAACA
W3	2FH21F_07_071	CTTTACCAGTTATCTTCC	CCAAGGTTGCTTATAAACAG	CTTCATTGCTTTTCACTTTTC
W3	2FH21F_07_465	CATGGGCAACATAATTTGG	GTCTCTAAGTTACCACAAATC	CAACATAATTTGGATGGGTCT
W3	2FH21F_11_028	CTGTGTCAATGGCACATCTG	GTATATATAACTCCIGATC	TGTGTCAATGGCACATCTGAATTACT
W3	2FH21F_18_059	ATATTTCAAGTATCACTATG	CAGCATAGCTTTTAATGGTCC	ATTTCAAGTATCACTATGTACAATC
W3	2FH21F_18_178	GCATCAGGACAAACTGATGG	TCTGTGACACAGAGCATGAG	CAGCCTAGGTTTTTCTC
W3	2FH21F_18_188	GTGCTATAAAGCTTTAACAAG	AATCCAGGGCTACTTTGAAG	ATANAAGCTTTAACAAGTTGGCGA

Ejemplo 4: Detección de anomalías cromosómicas fetales en plasma materno

Los modos de realización de un procedimiento para detectar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica fetal en una muestra de sangre materna se describen a continuación en el presente documento. El procedimiento comprende a) preparar un conjunto de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando secuencias de nucleótidos de un molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en el conjunto está presente en cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en el conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; (iv) cada secuencia de nucleótidos en el conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en el conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y b) determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en el conjunto; de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados. La etapa (a) del procedimiento a menudo implica (1) extracción de ácido nucleico a partir de sangre materna, preferentemente de plasma o suero sanguíneo; (2) aplicación de un procedimiento de amplificación de ácido nucleico a los ácidos nucleicos extraídos, donde las secuencias de nucleótidos de un conjunto se amplifican con un único conjunto de cebadores; y (3) cuantificación de los productos de amplificación de secuencia de nucleótidos basada en la proporción de los productos específicos. Un ensayo individual ha duplicado la confirmación de que utiliza controles internos para identificar la presencia de trisomía. (véase la figura 1).

Las etapas de amplificación y detección (2) y (3) se pueden realizar para permitir la detección cuantitativa del ADN derivado del feto en un historial de ácido nucleico materno. Los ensayos descritos en el presente documento se pueden optimizar para determinar la variabilidad biológica y experimental realizando los ensayos a través de un número de muestras en condiciones idénticas. Asimismo, la proporción de especies de secuencias de nucleótidos se puede comparar con un control estándar que representa una proporción de secuencias de nucleótidos de muestras biológicas comparables obtenidas a partir de mujeres embarazadas llevando cada una un feto cromosómicamente normal (euploide). Además, la proporción de especies de secuencias de nucleótidos se puede determinar sin amplificación, en la que la cantidad de cada especie se determina, por ejemplo, por una reacción de secuenciación y/o hibridación.

Ejemplo 5: Modelos analíticos

Dado el muy alto coste y la escasez de muestras de plasma, no se puede someter a prueba cada conjunto de marcadores en estas muestras. Por lo tanto, se puede hacer la suposición de que los ensayos que muestran una mejor precisión de clasificación en los sistemas modelo también funcionarán mejor en el plasma, o intentar inferir una distribución condicional de probabilidad de la precisión de clasificación en plasma en base al poder de discriminación observado en los sistemas modelo.

Una de las variables que afectan al rendimiento de cada región paráloga es el diseño de ensayo real. Puesto que todos los marcadores se evalúan en el contexto de un entorno múltiple, se necesita investigar el efecto de varios escenarios de multiplexación sobre el rendimiento de los ensayos sometiendo a cribado. Una manera en la que se puede lograr este análisis es la de comparar los cambios a continuación (o combinaciones de los mismos):

- 1) el rendimiento de reacción (como se caracteriza, por ejemplo, por el promedio de tasa de extensión y tasa de aviso);
- 2) significación de diferencias entre población de frecuencias de alelos correspondientes a las muestras normal y T21;
- 3) significación de diferencias entre sesgos étnicos evidentes para las muestras tanto normal como T21;
- 4) cambios en la dependencia del promedio de separación entre frecuencias de alelos normal y T21 en función de la fracción de contribución de T21; y
- 5) cambios en el contenido de la información para cada ensayo individual. Este contenido se puede representar por una pluralidad de métricas, tales como ganancia de información, proporción de ganancia, índice Gini, índice ReliefF. Los procedimientos gráficos tales como mapas térmicos pueden ser muy útiles en el procedimiento de comparación de múltiples métricas.

Finalmente, para la selección de grupos de marcadores que se evaluarán en muestras de plasma, se pueden considerar métricas estándar de la teoría de inferencia estadística (por ejemplo, tasa de positivos verdaderos, tasa de positivos falsos, tasa de negativos verdaderos, tasa de negativos falsos, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo. Estas métricas se pueden obtener aplicando una pluralidad de clasificadores (por ejemplo, análisis de discriminación lineal/cuadrático/mixto, NaiveBayes, redes neuronales "Neural Networks", máquinas de soporte vectorial, refuerzo con árboles de decisión, que se describen adicionalmente a continuación. La exactitud de la clasificación de multiplexos individuales o grupos de multiplexos se puede calcular, junto con diversos

procedimientos para evitar un exceso de ajuste (por ejemplo, validación cruzada repetida de 10 veces o validación cruzada dejando uno fuera "leave-one-out"). Para estimaciones robustas de dicha exactitud, se puede aplicar una prueba de la t para datos emparejados para validar la significación de cualquiera de las diferencias observadas. También se pueden realizar comparaciones con selección aleatoria de ensayos múltiples (como se obtienen de diferentes multiplexos), así como con "todos los grupos estrella" de ensayos (ensayos que, aunque se obtienen de diferentes multiplexos, muestran el mayor contenido de información).

Algunos de los diferentes modelos y procedimientos que se pueden emplear para analizar los datos que resultan de los procedimientos y composiciones se proporcionan en el presente documento. Los modelos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, árbol de decisión, máquina de soporte vectorial (SVM) - núcleo lineal, regresión logística, refuerzo adaptativo (AdaBoost), Naïve Bayes, perceptrón multicapa, y modelo de Markov oculto (HMM).

La *Máquina de soporte vectorial (SVM) - Núcleo lineal* – SVM (núcleo lineal) analiza los datos mediante el mapeo de los datos en un espacio de característica dimensional alta, donde cada coordenada corresponde a una característica de los elementos de datos, transformando los datos en un conjunto de puntos en un espacio euclidiano.

La *Regresión logística* se usa para la predicción de la probabilidad de aparición de un acontecimiento ajustando los datos a una curva logística. Es un modelo lineal generalizado usado para regresión binomial.

AdaBoost es un metaalgoritmo, y se puede usar junto con muchos otros algoritmos de aprendizaje para mejorar su rendimiento. AdaBoost es adaptivo en el sentido de que las construcciones de clasificadores subsiguientes se ajustan a favor de los casos clasificados erróneamente por clasificadores previos.

Naïve Bayes es un clasificador probabilístico sencillo basado en la aplicación del teorema de Bayes (a partir de estadística bayesiana) con hipótesis de independencia fuertes (simples "naïve"). Un término más descriptivo para el modelo de probabilidad subyacente sería el "modelo de característica independiente".

El *modelo de Markov oculto (HMM)* se define por una colección de estados y transiciones de cada estado a uno o más de otros estados, junto con una probabilidad para cada transición. Específicamente, el HMM es un procedimiento doble estocástico con un procedimiento subyacente (es decir, la secuencia de estados) que no es observable pero se puede estimar a través de un conjunto de datos que producen una secuencia de observaciones. Los HMM son útiles en el tratamiento de problemas en los que la información es incierta y/o incompleta. Los HMM, en general, se establecen en dos fases: (1) una fase de entrenamiento, en la que el procedimiento estocástico se estima a través de observación extensa, y (2) una fase de aplicación en la que se puede usar el modelo en tiempo real para obtener clasificaciones de probabilidad máxima.

Ejemplo 6: Ejemplos de modos de realización

A continuación en el presente documento se proporcionan determinados ejemplos no limitantes de algunos modos de realización de la tecnología.

A1. Un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprende:

a. preparar una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y

b. determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto; de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos.

A2. El procedimiento del modo de realización A1, en el que la anomalía cromosómica es aneuploidia de un cromosoma diana.

A3. El procedimiento del modo de realización A2, en el que el cromosoma diana es el cromosoma 21.

A4. El procedimiento del modo de realización A2, en el que el cromosoma diana es el cromosoma 18.

A4. El procedimiento del modo de realización A2, en el que el cromosoma diana es el cromosoma 13.

A6. El procedimiento del modo de realización A2, en el que el cromosoma diana es el cromosoma X.

- A7. El procedimiento del modo de realización A2, en el que el cromosoma diana es el cromosoma Y.
- A8. El procedimiento del modo de realización A2, en el que cada secuencia de nucleótidos en un conjunto no está presente en un cromosoma distinto de cada cromosoma diana.
- 5 A9. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A8, en el que el ácido nucleico extracelular es de la sangre.
- A10. El procedimiento del modo de realización A9, en el que el ácido nucleico extracelular es de plasma sanguíneo.
- A11. El procedimiento del modo de realización A9, en el que el ácido nucleico extracelular es de suero sanguíneo.
- A12. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A9-A11, en el que la sangre es de una paciente embarazada.
- 10 A13. El procedimiento del modo de realización A12, en el que el molde de ácido nucleico extracelular es de una paciente en el primer trimestre de embarazo.
- A14. El procedimiento del modo de realización A12, en el que el molde de ácido nucleico extracelular es de una paciente en el segundo trimestre de embarazo.
- 15 A15. El procedimiento del modo de realización A12, en el que el molde de ácido nucleico extracelular es de una paciente en el tercer trimestre de embarazo.
- A16. El procedimiento del modo de realización A12, en el que el molde de ácido nucleico extracelular comprende una mezcla de ácido nucleico materno y ácido nucleico fetal.
- 20 A17(a). El procedimiento del modo de realización A16, en el que el ácido nucleico fetal es de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 40 % del ácido nucleico extracelular; o el número de copias de ácido nucleico fetal es de aproximadamente 10 copias a aproximadamente 2000 copias del ácido nucleico extracelular total.
- A17(b). El procedimiento del modo de realización A16, en el que el ácido nucleico fetal es mayor de aproximadamente un 15 % del ácido nucleico extracelular.
- A18. El procedimiento del modo de realización A16 o A17, que comprende determinar la concentración de ácido nucleico fetal en el ácido nucleico extracelular.
- 25 A19. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A16-A18, que comprende enriquecer el ácido nucleico extracelular para ácido nucleico fetal.
- A20. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A11, en el que el ácido nucleico extracelular comprende una mezcla de ácido nucleico de células cancerosas y ácido nucleico de células no cancerosas.
- 30 A21. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A20, en el que cada secuencia de nucleótidos en un conjunto es sustancialmente idéntica a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto.
- A22. El procedimiento del modo de realización A21, en el que cada secuencia de nucleótidos en un conjunto es una secuencia paróloga.
- 35 A22. El procedimiento del modo de realización A20 o A21, en el que cada secuencia de nucleótidos completa de cada conjunto comparte una identidad de aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % con otra secuencia de nucleótidos en el conjunto.
- A23. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A22, en el que una o más de las secuencias de nucleótidos son no exónicas.
- 40 A24. El procedimiento del modo de realización A23, en el que una o más de las secuencias de nucleótidos son intrónicas.
- A25. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-24, en el que la una o más especies de secuencias de nucleótidos están seleccionadas del grupo de especies de nucleótidos mostrado en la tabla 4B.
- 45 A26. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A25, en el que uno o más de los conjuntos comprenden dos secuencias de nucleótidos.
- A27. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A26, en el que uno o más de los conjuntos comprenden tres secuencias de nucleótidos.

- A28. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A27, en el que en un conjunto, las especies de secuencias de nucleótidos están en el cromosoma 21 y cromosoma 18.
- A29. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A27, en el que en un conjunto, las especies de secuencias de nucleótidos están en el cromosoma 21 y cromosoma 13.
- 5 A30. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A27, en el que en un conjunto, las especies de secuencias de nucleótidos están en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13.
- A31. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A27, en el que cada secuencia de nucleótidos en todos los conjuntos está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13.
- 10 A32. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A32, en el que las especies de amplificación de los conjuntos se generan en un recipiente de reacción.
- A33. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A33, en el que las especies de ácidos nucleicos amplificados en un conjunto se preparan por un procedimiento que comprende poner en contacto el ácido nucleico extracelular con un cebador inverso y un cebador directo.
- 15 A34. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A34, en el que las cantidades de las especies de ácidos nucleicos amplificados en cada conjunto varían aproximadamente en un 50 % o menos.
- A35. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A35, en el que las cantidades de las especies de ácidos nucleicos amplificados en cada conjunto varían hasta un valor que permite la detección de la anomalía cromosómica con un nivel de confianza de aproximadamente un 95 % o más.
- 20 A36. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A35, en el que las cantidades de las especies de ácidos nucleicos amplificados en cada conjunto varían hasta un valor que permite la detección de la anomalía cromosómica con una sensibilidad de aproximadamente un 90 % o más, y una especificidad de aproximadamente un 95 % o más.
- A37. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A36, en el que la longitud de cada una de las especies de ácidos nucleicos amplificados independientemente es de aproximadamente 30 a aproximadamente 25 500 pares de bases.
- A38. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A37, en el que la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado se determina por extensión de cebadores, secuenciación, PCR digital, QPCR, espectrometría de masas.
- 30 A39. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A38, en el que las especies de ácidos nucleicos amplificados se detectan:
- poniendo en contacto las especies de ácidos nucleicos amplificados con cebadores de extensión,
- preparando los cebadores de extensión extendidos, y
- determinando la cantidad relativa del uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo analizando los cebadores de extensión extendidos.
- 35 A40. El procedimiento del modo de realización A39, en el que el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo se analizan por espectrometría de masas.
- A41. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A40, en el que hay de aproximadamente 4 a aproximadamente 100 conjuntos.
- 40 A42. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A41, en el que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se basa en las cantidades de las especies de ácidos nucleicos amplificados en un 80 % o más de los conjuntos.
- A43. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A42, en el que las cantidades de una o más especies de ácidos nucleicos amplificados se ponderan de forma diferente que otras especies de ácidos nucleicos amplificados para identificar la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica.
- 45 A44. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A43, en el que el número de conjuntos proporciona una sensibilidad de un 85 % o más para determinar la ausencia de la anomalía cromosómica.
- A45. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A43, en el que el número de conjuntos proporciona una especificidad de un 85 % o más para determinar la presencia de la anomalía cromosómica.
- A46. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A43, en el que el número de conjuntos se

determina en base a (i) una sensibilidad de un 85 % o mayor para determinar la ausencia de la anomalía cromosómica, y (ii) una especificidad de un 85 % o mayor para determinar la presencia de la anomalía cromosómica.

A47. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A46, que comprende además determinar una proporción entre la cantidad relativa de (i) una especie de ácido nucleico amplificado y (ii) otra especie de ácido nucleico amplificado, en cada conjunto; y la determinación de la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se identifica por la proporción.

A48. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A47, en el que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se basa en nueve o menos replicados.

A49. El procedimiento del modo de realización A48, en el que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se basa en cuatro replicados.

A50. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A47, en el que las especies de secuencias de nucleótidos en los conjuntos no se encuentran en el cromosoma 18 o cromosoma 13.

A51. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A47, en el que las especies de secuencias de nucleótidos en los conjuntos son cualquiera de las descritas en el presente documento, con la condición de que no se seleccionen de cualquiera designada por un asterisco en la tabla 4A.

A52. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización A1-A47, en el que hay de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 conjuntos, y aproximadamente 10 o más de los conjuntos se seleccionan de la tabla 14.

A53. El procedimiento del modo de realización A52, en el que hay aproximadamente 56 conjuntos, en el que los conjuntos se exponen en la tabla 14.

B1. Un procedimiento múltiple para identificar la presencia o ausencia de una anomalía de un cromosoma diana en un sujeto, que comprende:

a. preparar tres o más conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando tres o más conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir de un molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) una secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en un cromosoma diana y al menos una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto está presente en uno o más cromosomas de referencia, (iii) el cromosoma diana es común para todos los conjuntos; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (v) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (vi) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vii) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y

b. determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto;

c. detectar la presencia o ausencia de una disminución o incremento del cromosoma diana a partir de la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en los conjuntos;

de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a una disminución o incremento del cromosoma diana con relación al uno o más cromosomas de referencia.

C1. Un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprende:

a. preparar un conjunto de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando secuencias de nucleótidos de un molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en el conjunto está presente en tres o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en el conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en el conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en el conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y

b. determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en el conjunto;

de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados.

D1. Un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica asociada con cáncer

en un sujeto, que comprende:

- a. preparar un conjunto de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando secuencias de nucleótidos de un molde de ácido nucleico, en el que: (i) el molde de ácido nucleico es de una muestra libre de células de un sujeto y es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en el conjunto está presente en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13, (iii) cada secuencia de nucleótidos en el conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en el conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en el conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y
 - b. determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en el conjunto; de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica asociada con cáncer en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados en el conjunto.
- E1. Un producto de programas de ordenador que comprenden un medio utilizable por ordenador que tiene un código de programa legible por ordenador incorporado en el mismo, dicho código de programa legible por ordenador adaptado para ejecutarse para implementar un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento:
- proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos;
- detectar la información de señal derivada de determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo;
- recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal;
- avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico;
- organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.
- E2. Un producto de programas de ordenador que comprenden un medio utilizable por ordenador que tiene un código de programa legible por ordenador incorporado en el mismo, dicho código de programa legible por ordenador adaptado para ejecutarse para implementar un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento:
- proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos;
- analizar un archivo de configuración en datos de definición que especifica: la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto de la reivindicación A1;
- recibir, por el módulo de procesamiento lógico, los datos de definición;
- avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico;
- organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.
- E3. Un producto de programas de ordenador que comprenden un medio utilizable por ordenador que tiene un código de programa legible por ordenador incorporado en el mismo, dicho código de programa legible por ordenador

adaptado para ejecutarse para implementar un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento:

- 5 proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos;

- 10 recibir la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo;

avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico;

- 20 organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

F1. Un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprende:

- 25 a. proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos;
- 30 b. detectar la información de señal derivada de determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo;
- 35 c. recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal;
- 40 d. avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y
- e. organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

45 F2. Un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprende:

- 50 a. obtener una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados preparados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo;
- 55

- b. proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos;
- 5 c. analizar un archivo de configuración en datos de definición que especifica: la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado;
- d. recibir, por el módulo de procesamiento lógico, los datos de definición;
- e. avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y
- 10 f. organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

F3. Un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprende:

- 15 a. preparar una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de
- 20 las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo;
- 25 b. proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos; (por favor, revíse que módulos se necesitan, o si se necesitan más etapas/descripción)
- 30 c. analizar un archivo de configuración en datos de definición que especifica: la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado;
- d. recibir, por el módulo de procesamiento lógico, los datos de definición;
- e. avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y
- 35 f. organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

F4. Un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprende:

- 40 a. proporcionar la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de
- 45 nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo;
- 50 b. proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos;

- c. recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal;
- d. avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y
- 5 e. organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.

F5. Un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprende:

- 10 a. proporcionar un sistema, en el que el sistema comprende distintos módulos informáticos, y en el que los distintos módulos informáticos comprenden un módulo de detección de señal, un módulo de procesamiento lógico, y un módulo de organización de presentación de datos;
- b. recibir, por el módulo de procesamiento lógico, la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo;
- 15
- 20
- 25 c. avisar de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica por el módulo de procesamiento lógico, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y
- d. organizar, por el modelo de organización de presentación de datos en respuesta al haber sido avisado por el módulo de procesamiento lógico, una presentación de datos que indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el sujeto.
- 30

G1. Un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprende:

- 35 a. detectar la información de señal, en el que la información de señal representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo;
- 40
- 45 b. transformar la información de señal que representa la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y
- 50 c. presentar los datos de identificación.

G2. Un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprende:

- 55 a. preparar una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una

pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y

b. un conjunto de datos de valores que representan la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto;

c. transformar el conjunto de datos de valores que representan la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y

d. presentar los datos identificados.

G3. Un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprende:

a. proporcionar la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo;

b. transformar la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y

c. presentar los datos de identificación.

G4. Un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en un sujeto, que comprende:

a. recibir la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada una de una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados, en los que la pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados se preparan amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en los que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo;

b. transformar la información de señal que indica la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto en datos de identificación, en los que los datos de identificación representan la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica, de este modo se identifica la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y

c. presentar los datos de identificación.

H1. Un procedimiento para transmitir información genética prenatal a una paciente humana embarazada, que comprende:

a. identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en el que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto;

en el que se determina la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y

b. transmitir la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada.

H2. Un procedimiento para transmitir información genética prenatal a una paciente humana embarazada, que comprende:

a. identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en el que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto;

en el que se determina la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y

b. transmitir la información genética prenatal que representa el número de cromosomas en las células en el feto a la paciente embarazada.

I1. Un procedimiento para proporcionar a una paciente humana embarazada una receta médica en base a la información genética prenatal, que comprende:

a. identificar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en el que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto;

en el que se determina la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y

b. proporcionar una receta médica en base a la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada.

I2. Un procedimiento para proporcionar a una paciente humana embarazada una receta médica en base a la información genética prenatal, que comprende:

a. informar a una paciente embarazada de la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de la paciente embarazada, en el que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto; de este modo se determina la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos; y

b. proporcionar una receta médica en base a la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica a la paciente embarazada.

I3. El procedimiento del modo de realización I1 o I2, en el que la receta médica es para la paciente embarazada que va a someterse a un procedimiento de amniocentesis.

I4. El procedimiento del modo de realización I1 o I2, en el que la receta médica es para la paciente embarazada que va a someterse a otra prueba genética.

I5. El procedimiento del modo de realización I1 o I2, en el que la receta médica es un dictamen médico para no someterse a pruebas genéticas adicionales.

J1. Un archivo que comprende la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica en el feto de una paciente embarazada, en el que la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica se ha determinado preparando una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular del ácido nucleico expresado en placenta en la sangre de la paciente embarazada, de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular es heterogéneo, (ii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto está presente en dos o más cromosomas diferentes, (iii) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto difiere en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo de cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto; (iv) cada secuencia de nucleótidos en un conjunto se amplifica a un nivel sustancialmente reproducible con relación a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto, (v) las secuencias de hibridación de cebador en el molde de ácido nucleico extracelular son sustancialmente idénticas; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; y determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto; de este modo se determina la presencia o ausencia de la anomalía cromosómica en base a la cantidad de las especies de ácidos nucleicos amplificados de dos o más conjuntos.

J2. El archivo del modo de realización J1, que es un archivo legible por ordenador.

J3. El archivo del modo de realización J1, que es un archivo de papel.

J4. El archivo del modo de realización J1, que es un archivo de historia clínica.

* * *

Por ejemplo, en cada caso en el presente documento cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" se pueden reemplazar con cualquiera de los otros dos términos. El término "un" o "uno" se puede referir a uno de o una pluralidad de los elementos que modifica (por ejemplo, "un reactivo" puede querer decir uno o más reactivos) a menos que quede contextualmente claro que se describe uno de los elementos o más de uno de los elementos. El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento se refiere a un valor dentro de un 10 % del parámetro subyacente (es decir, más o menos un 10 %), y el uso del término "aproximadamente" al principio de una serie de valores modifica cada uno de los valores (es decir, "aproximadamente 1, 2 y 3" es aproximadamente 1, aproximadamente 2 y aproximadamente 3). Por ejemplo, un peso de "aproximadamente 100 gramos" puede incluir pesos de entre 90 gramos y 110 gramos. Además, cuando se describe un listado de valores en el presente documento (por ejemplo, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 % o 94 %), el listado incluye todos los valores intermedios de los mismos (por ejemplo, 62 %, 77 %).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para identificar la presencia o ausencia de una aneuploidia de un cromosoma diana en un sujeto, que comprende:
 - a. preparar una pluralidad de conjuntos de especies de ácidos nucleicos amplificados amplificando una pluralidad de conjuntos de especies de secuencias de nucleótidos a partir del molde de ácido nucleico extracelular de un sujeto, en el que: (i) el molde de ácido nucleico extracelular comprende ácido nucleico derivado del feto y derivado de la madre, (ii) las especies de secuencias de nucleótidos de un conjunto se sitúan en un cromosoma diana y uno o más cromosomas de referencia, en el que un cromosoma de referencia es un cromosoma que no está asociado con la aneuploidia que se va a identificar, (iii) las especies de secuencias de nucleótidos en un conjunto difieren en uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo; (iv) las especies de secuencias de nucleótidos de un conjunto se amplifican de forma reproducible relativamente entre sí, (v) las secuencias de hibridación de cebadores situadas en las especies de secuencias de nucleótidos diana y en las una o más especies de secuencias de nucleótidos de referencia de un conjunto comparten un grado de similitud de secuencia que permite que un único par de cebadores de amplificación se hibride a las secuencias de hibridación de cebadores de modo que las especies de un conjunto se coamplifiquen; y (vi) cada especie de ácido nucleico amplificado en un conjunto comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo;
 - b. determinar la cantidad de cada especie de ácido nucleico amplificado en cada conjunto detectando el uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo en cada especie de ácido nucleico amplificado;
 - c. determinar una proporción entre la cantidad relativa de (i) una especie de ácido nucleico diana amplificado y (ii) una especie de ácido nucleico de referencia amplificado, en cada conjunto; y
 - d. identificar la presencia o ausencia de una aneuploidia de un cromosoma diana en base a las proporciones de dos o más conjuntos.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico extracelular es de sangre, plasma sanguíneo o suero sanguíneo de una paciente embarazada.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el molde de ácido nucleico extracelular es de una paciente en el primer trimestre de embarazo, segundo trimestre de embarazo o tercer trimestre de embarazo.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ácido nucleico fetal es de un 5 % a un 40 % del ácido nucleico extracelular; o el número de copias de ácido nucleico fetal es de 10 copias a 2000 copias del ácido nucleico extracelular total.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende enriquecer el ácido nucleico extracelular para ácido nucleico fetal.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende determinar la concentración de ácido nucleico fetal en el ácido nucleico extracelular.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que cada secuencia de nucleótidos en un conjunto es sustancialmente idéntica a cada una de las demás secuencias de nucleótidos en el conjunto.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la una o más especies de secuencias de nucleótidos están seleccionadas del grupo de especies de secuencias de nucleótidos mostrado en la tabla 4B.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que en un conjunto, las especies de secuencias de nucleótidos están en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que en todos los conjuntos, las especies de secuencias de nucleótidos están presentes en el cromosoma 21, cromosoma 18 y cromosoma 13.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las cantidades de las especies de ácidos nucleicos amplificados en cada conjunto varían hasta un valor que permite la detección de la aneuploidia del cromosoma diana con una sensibilidad de un 90 % o más, y una especificidad de un 95 % o más.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que las especies de ácidos nucleicos amplificados se detectan:

poniendo en contacto las especies de ácidos nucleicos amplificados con cebadores de extensión,

preparando los cebadores de extensión extendidos, y

determinando la cantidad relativa del uno o más nucleótidos con emparejamiento erróneo analizando los cebadores de extensión extendidos.

- 5 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que las cantidades de una o más especies de ácidos nucleicos amplificados se ponderan de forma diferente que otras especies de ácidos nucleicos amplificados para identificar la presencia o ausencia de la aneuploidia del cromosoma diana.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que existen de 10 a 70 conjuntos y 10 o más de los conjuntos se seleccionan de la tabla 14.
- 10 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que existen 56 conjuntos y en el que los conjuntos se exponen en la tabla 14.

FIGURA 1

Identificar secuencias que son casi idénticas entre dos cromosomas (parálogos)

Emparejamiento erróneo 1 / chr 21	ACCCACACAGTGGGCTTGGTGACATCCTAGGATTGATTTAT TC CACCC CTAGAATCCAACCT TT CCT
Emparejamiento erróneo 2 / chr 14	TGGGTGTGTCAACCCGAACCACTGTAGGATCCTAAACTA[G]ATAAGGTGGGGATCTTAGGTTGGAAAGGA

Normal:	T21:
1000 copias A1 materna	1000 copias A1 materna
1000 copias A2 materna	1000 copias A2 materna
100 copias A1 fetal	150 copias A1 fetal
100 copias A2 fetal	100 copias A2 fetal
Total copias A1: 1100	Total copias A1: 1150
Total copias A2: 1100	Total copias A2: 1100
Proporción: 1:1 / 50 %	Proporción: 1.045:1 / 51 %

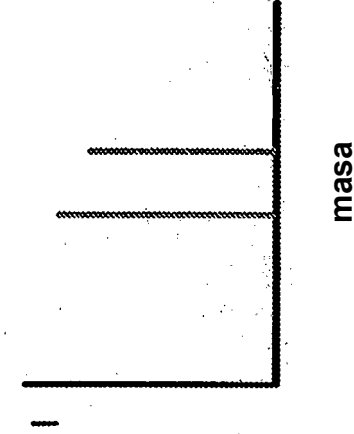
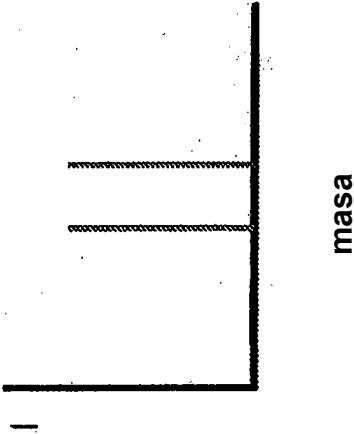


FIGURA 2

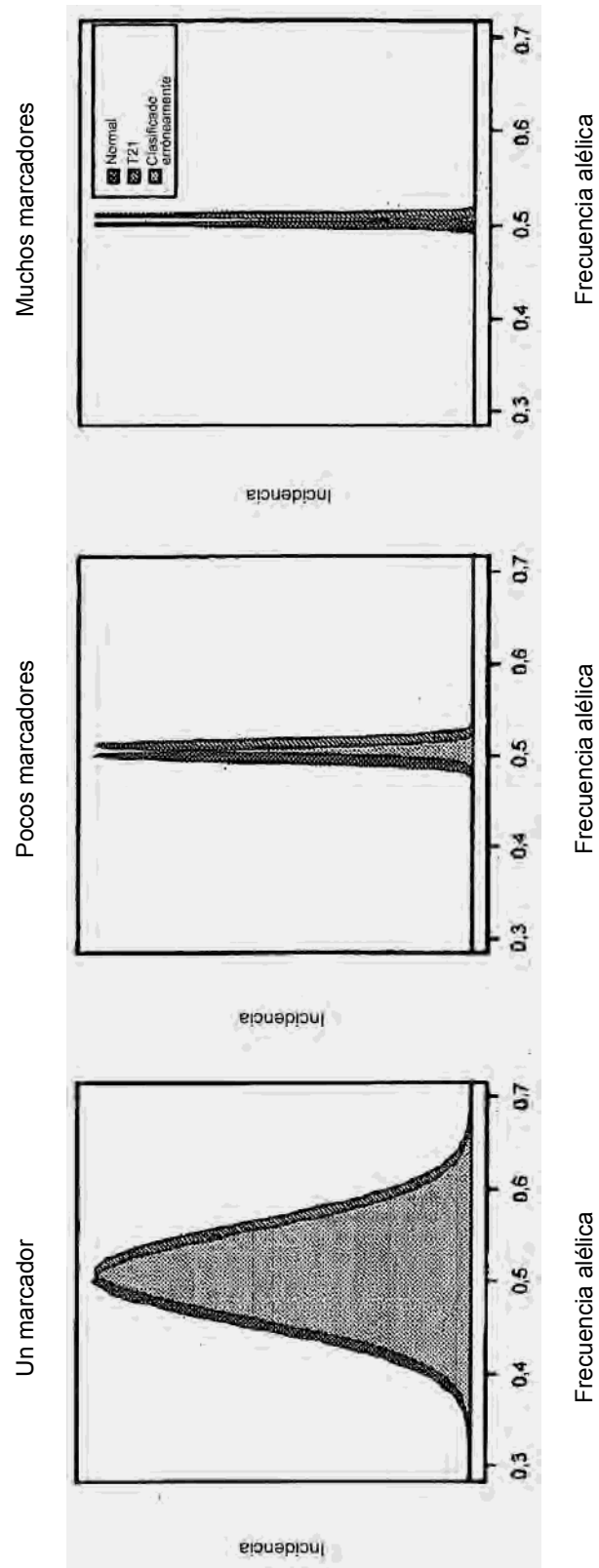


FIGURA 3

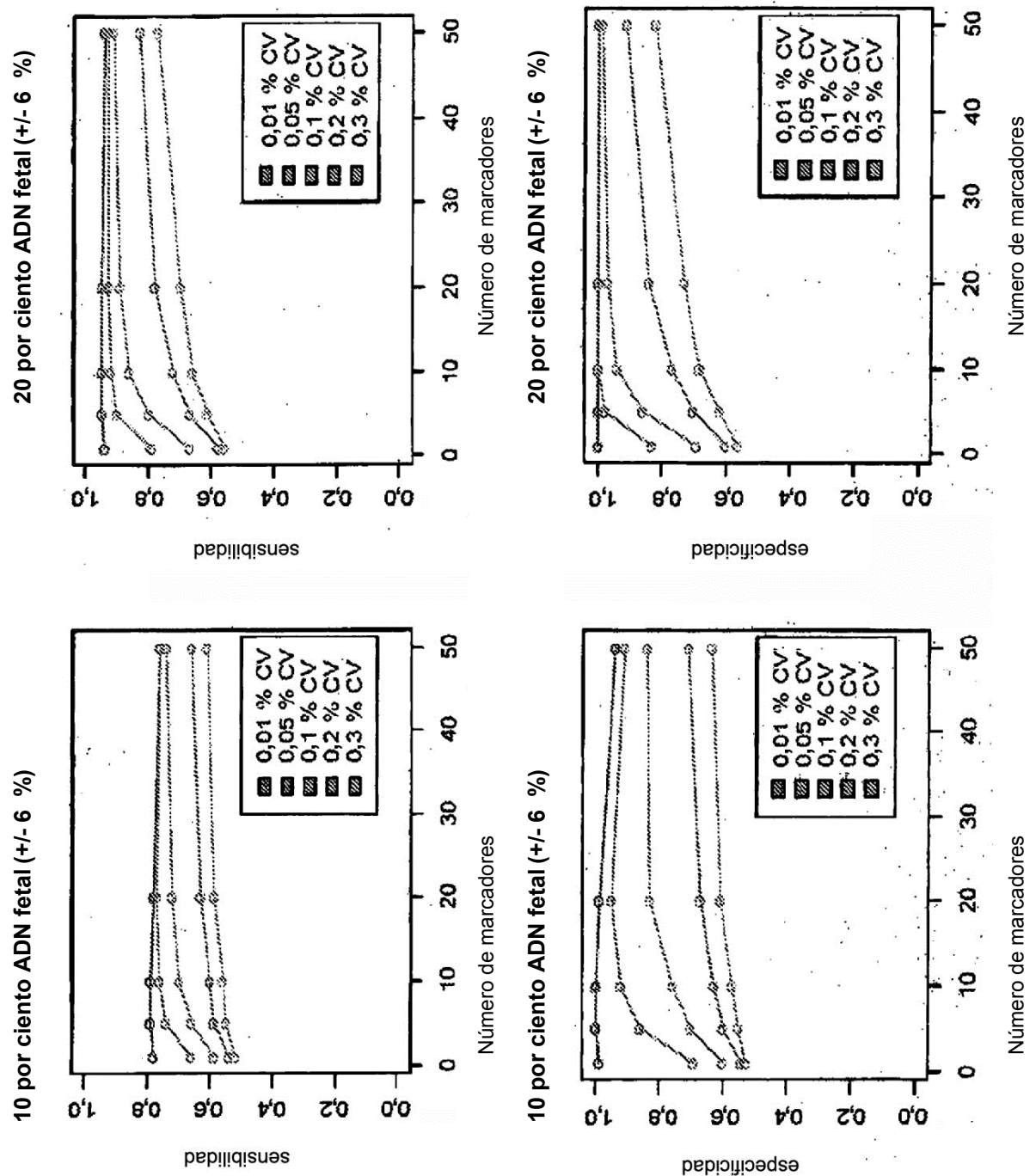


FIGURA 4

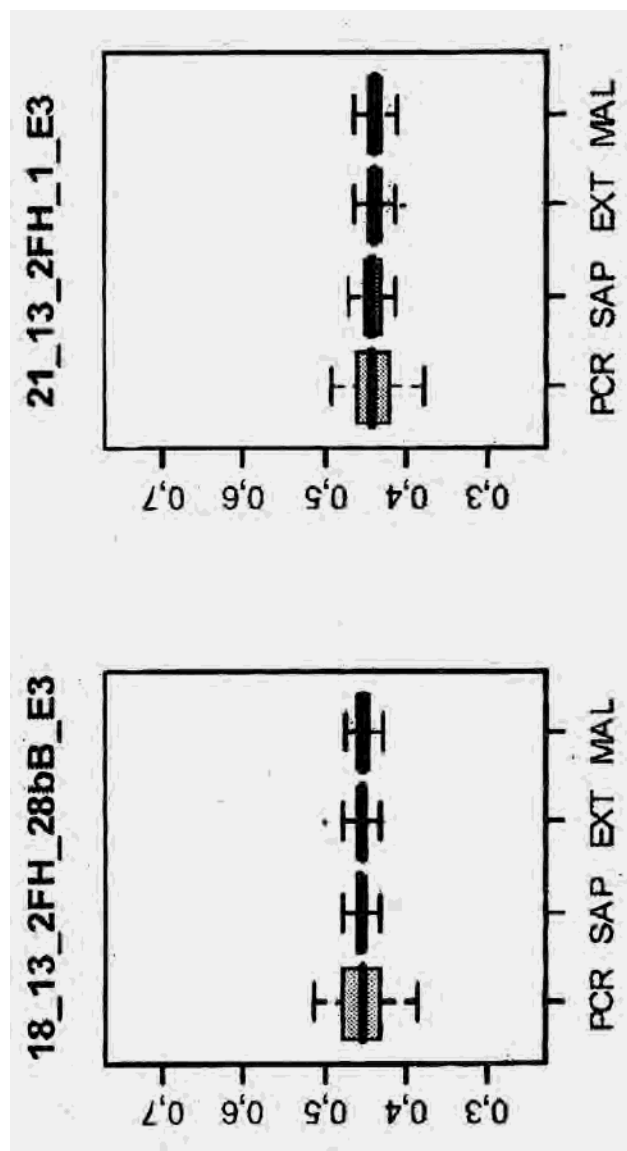


FIGURA 5

ENSAYO BUENO

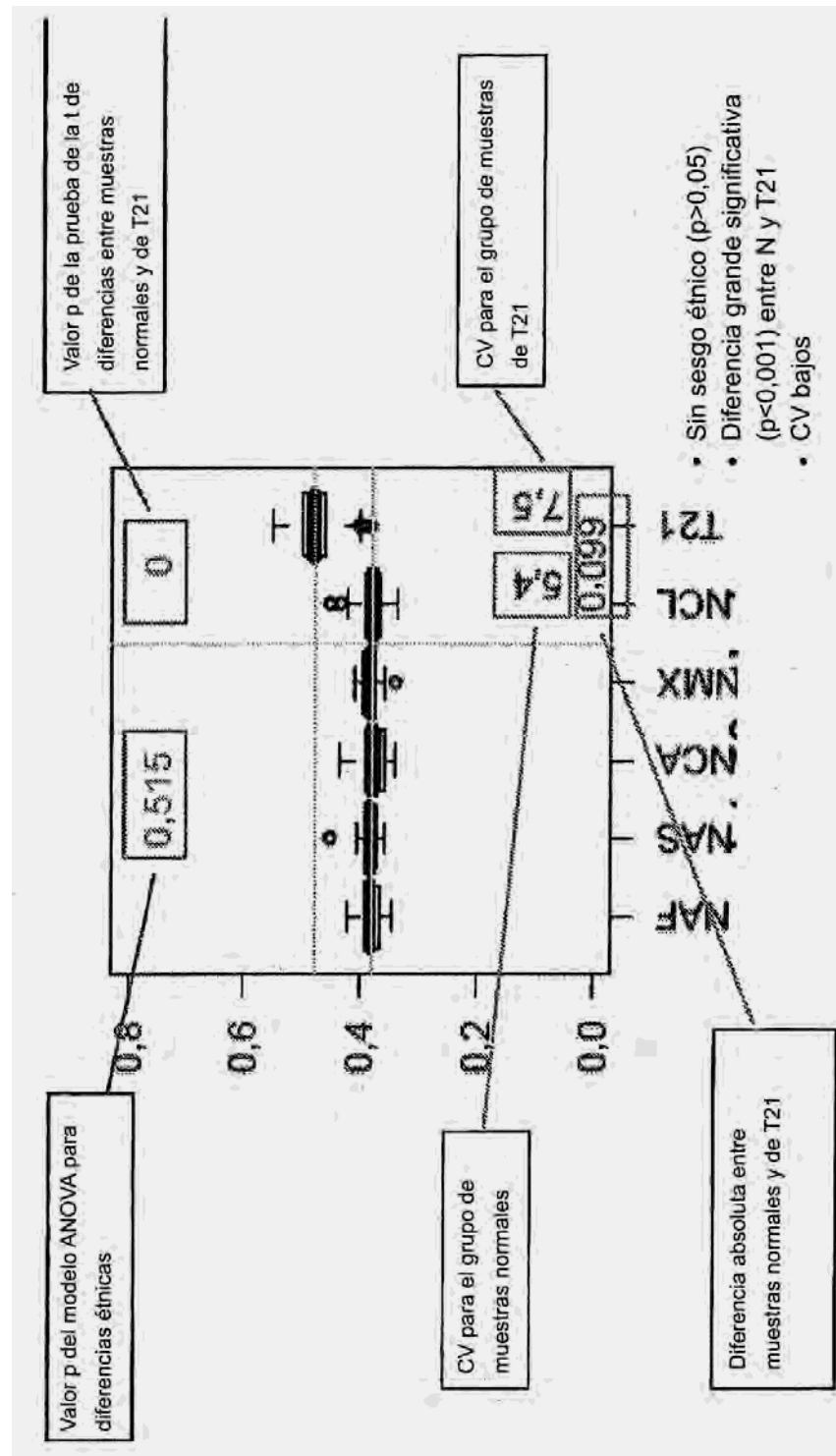


FIGURA 6

ENSAYOS MALOS

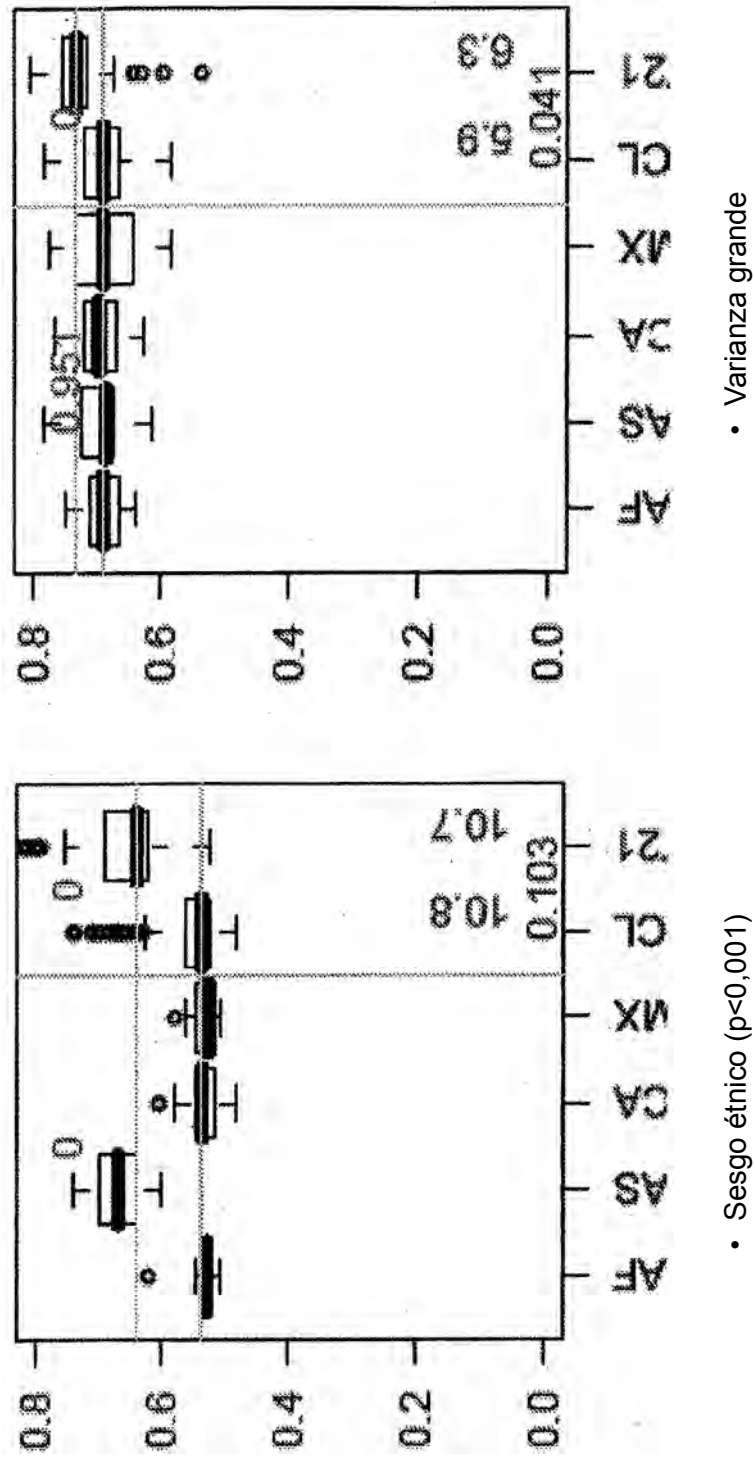


FIGURA 7

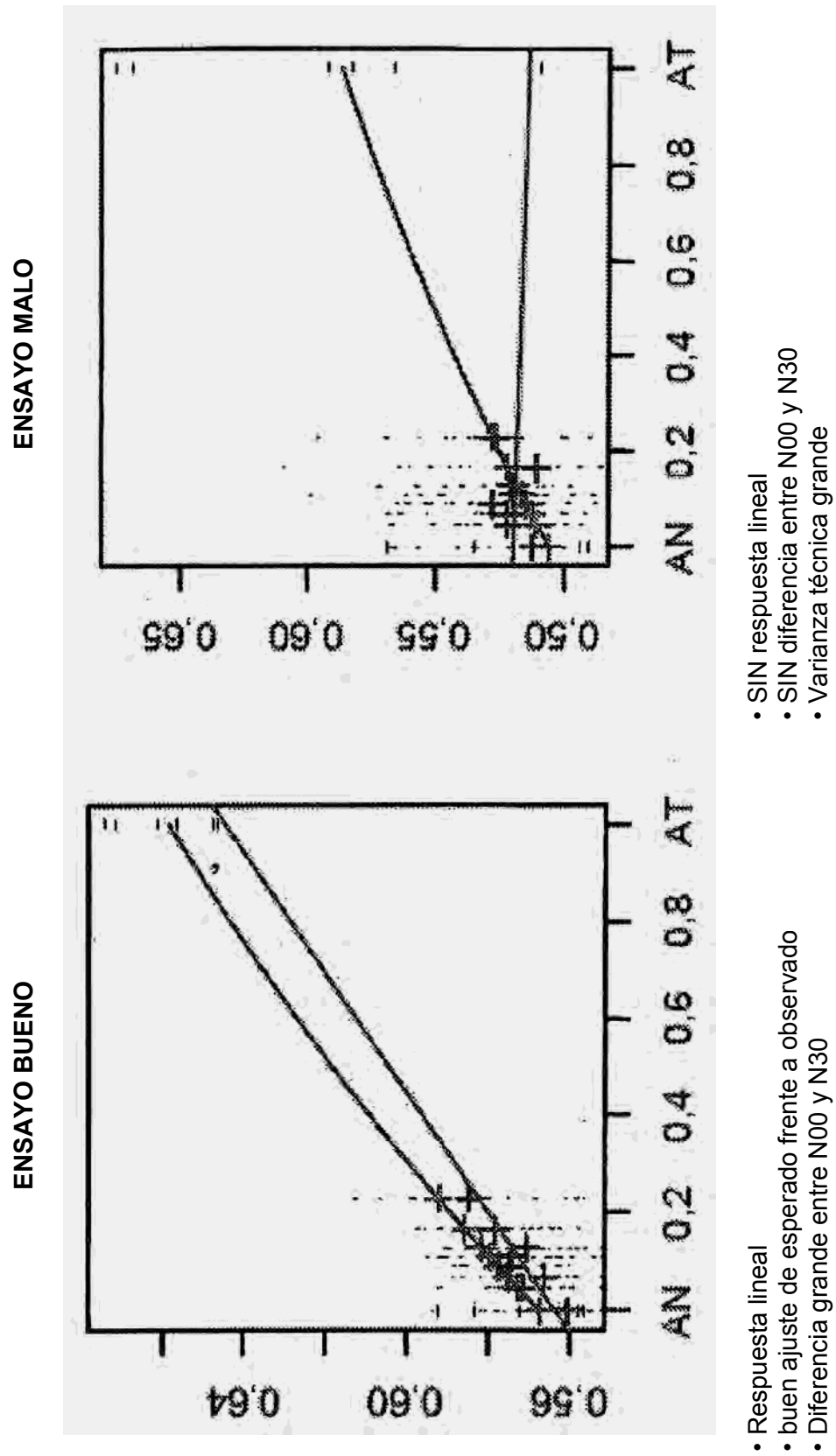
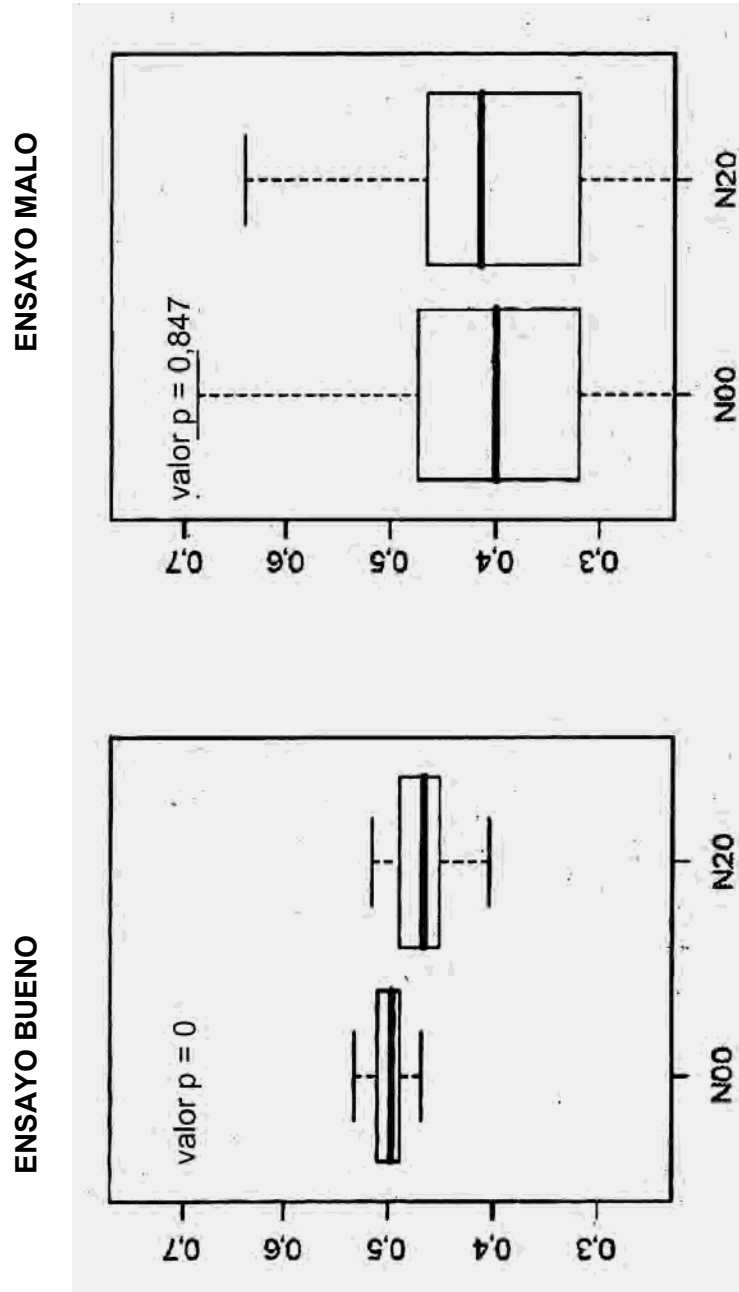


FIGURA 8



Los ensayos buenos se caracterizan por:

- Diferencia significativa entre las muestras N00 y N20
- Varianzas pequeñas en cada grupo
- La capacidad de un algoritmo para discernir entre N00 y N20

FIGURA 9

Separación de normales y T21

