

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 372**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G06F 19/20** (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2011 PCT/CN2011/075037**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12162884**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2011 E 11866914 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2716766**

54 Título: **Un dispositivo para detectar el número de copias de cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.03.2017**

73 Titular/es:  
**BERRY GENOMICS CO., LTD. (100.0%)  
Room B-246, No. 29, Shengmingyuan Road,  
Changping District  
Beijing, CN**

72 Inventor/es:  
**GAO, YANG;  
ZHOU, DAIXING;  
ZHANG, JIANGUANG y  
TIAN, FENG**

74 Agente/Representante:  
**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 605 372 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

Un dispositivo para detectar el número de copias de cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales

### 5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un dispositivo para detectar el número de copias de cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales.

### 10 **Antecedentes de la invención**

La anomalía del número de copias de cromosomas está estrechamente relacionada con enfermedades humanas. La anomalía cromosómica aparece en células fetales que portan enfermedad genética y células tumorales. En promedio, 9 de cada 1000 neonatos pueden portar enfermedades provocadas por anomalía del número de copias de cromosomas (1). Por lo tanto, es importante detectar el número de copias de cromosomas antes de que los niños hayan nacido. Sin embargo, los métodos de diagnóstico usados en la actualidad incluyendo amniocentesis y coriónica ovina pertenecen a métodos invasivos, que suponen ciertos riesgos para mujeres embarazadas y fetos. Se usan marcadores proteicos séricos y ondas ultrasónicas para detectar si los fetos padecen enfermedades debido a anomalía del número de copias de cromosomas, aunque no es invasivo, no se detectan directamente factores patógenos, por lo que la precisión y sensibilidad no son buenas (2). También existe el problema de que las enfermedades debido a la anomalía de número de copias de cromosomas no pueden encontrarse tan pronto como es posible. Esta situación impulsa a los investigadores a desarrollar un método de detección y diagnóstico no invasivo preciso y altamente sensible.

Desde que se ha encontrado ADN fetal en sangre materna (3), el diagnóstico y detección de la anomalía de cromosomas fetales de forma no invasiva y directa se ha convertido en un asunto de estudio importante. En el 2007, el Profesor LO Yuk Ming Dennis y sus colaboradores demostraron que el porcentaje de sitios de mutación del gen específico de la placenta 4 en ARNm de plasma materno podría usarse para valorar si el feto tiene cromosoma 21 triploide (4). El porcentaje de sitio de mutación se usa al mismo tiempo para valorar si el cromosoma 18 es un triploide (5). Su limitación es que el sitio de mutación no es común en la población, por lo que estos métodos son solamente adecuados para una parte de la población. Durante el mismo periodo, se usa PCR digital (dPCR) para detectar la triploidia de cromosomas fetales (6), (7). La PCR digital tiene la ventaja de la independencia de cualquier sitio de mutación, pero su precisión es insuficiente, y requiere muchas muestras de sangre, lo que aumenta la dificultad de la toma de muestras.

En años recientes, los problemas anteriores se han resuelto mediante técnicas de secuenciación de ADN de alto rendimiento rápidamente desarrolladas. Estas técnicas incluyen Analizador Genómico de Illumina (8), SOLiD de Life Technologies (9) y Heliscope de Helicos (10), por lo que puede detectarse a la vez cientos de millones o incluso miles de millones de secuencias. Cuando se usan estas técnicas para detectar DAN en plasma materno, el cambio de número de cromosomas de cantidades traza de ADN fetal en plasma puede detectarse (11), (12), (13). No obstante debido al alto coste de secuenciación, esas técnicas no se han usado habitualmente. Al mismo tiempo, existe un problema no resuelto de detección del cambio del número de copias parcial de cromosomas fetales del plasma materno. Es ventajoso detectar el cambio del número de copias de cromosomas fetales de plasma materno mediante secuenciación de alto rendimiento, pero esa técnica es cara y no puede popularizarse. Además, el Coeficiente de Variación (CV) de secuenciación es alto, y también es necesario mejorar la precisión y estabilidad de detección. El CV de secuenciación también determina que este método solamente es adecuado para algunos cromosomas, tales como el cromosoma 21, el cromosoma 18 y es inadecuado para detectar el cambio de número de copias parcial de cromosomas.

Es muy caro y difícil de detectar el cambio del número de cromosomas mediante secuenciación de alto rendimiento, siendo la principal razón que el contenido de ADN fetal en plasma materno es bajo, solamente 5 % cuando es bajo, en particular durante el desarrollo fetal temprano. La mayor parte del ADN en plasma materno es ADN materno. El fondo de ADN materno abarca fácilmente el cambio del número de cromosomas fetales o número de copias parciales. Por lo tanto, el método para separar el ADN de mujeres embarazadas y ADN fetal se ha convertido en un objeto estudiado durante años con poco progreso. Un método exitoso debe pertenecer al método de separación de histonas inventado por el Colegio Médico de Baylor (14). La cantidad de ADN separada es muy pequeña, de modo que el método solamente es adecuado para detectar el sitio de mutación, y es inadecuado para detectar el cambio del número de copias de cromosomas.

El documento US 2010/216153 A1 (Lapidus Stanley *et al*) desvela un método para detectar ácidos nucleicos fetales y métodos para diagnosticar anomalías fetales.

### **Sumario de la invención**

65 A la vista de los problemas anteriores en el método para detectar el número de copias de cromosomas fetales, el inventor ha diseñado un kit, un dispositivo y un método para detectar el número de copias de cromosomas fetales

parcial o completo eficazmente a bajo coste.

Los dispositivos de la presente invención se definen en las reivindicaciones adjuntas 1-5.

5 La invención se basa en los siguientes hechos: el inventor ha descubierto que los contenidos de GC de los segmentos de ADN de cada cromosoma respectivamente tienen relaciones lineales con las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN totales, el fenómeno anterior puede estar relacionado con el método de detección, la relación lineal puede representarse por  $y = ax+b$ , en la que y representa el contenido de GC del segmento de ADN del cromosoma para detectar, x representa la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma para detectar con respecto al ADN total, a y b son constantes, a y b pueden ser valores diferentes para diferentes cromosomas, la proporción puede corregirse según el contenido de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar, y se calcula la variación de la proporción corregida de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en la muestra para detectar, y se determina el número de copias de los cromosomas para detectar según el grado de variación. Corrigiendo el contenido de GC, pueden detectarse eficazmente muchos resultados falsos negativos que no pueden detectarse solamente por método de valoración de la proporción de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a segmentos de ADN total. Los experimentos específicos se toman como pruebas en la descripción detallada de las realizaciones.

20 Adicionalmente, como se indica en el documento (15), la mayoría del ADN fetal en plasma materno son segmentos de 100 pb a 250 pb, particularmente en la gran mayoría de 150 pb a 170 pb. Aunque solamente una parte mínima del ADN materno se distribuye en el intervalo del segmento, los segmentos de ADN de más de 250 pb básicamente pertenecen al ADN materno. El inventor ha descubierto que, aunque la razón es desconocida, la proporción de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total se distribuye de forma uniforme con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb, es decir, cada cromosoma tiene longitud en cualquier punto dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb, tal como 110 pb o 167 pb (la cantidad de ADN en el sitio es máxima), la proporción con el ADN total representa la proporción de otros puntos, representando por lo tanto la proporción de cada cromosoma con todo el ADN dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb. Mediante secuenciación del ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb en el ADN, los resultados de secuenciación de todo el ADN con cualquier longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb en el ADN se comparan con el mapa de secuencias genómicas para determinar de qué cromosoma viene cada segmento de ADN de la secuencia de ADN dentro de todo el ADN o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb en el ADN y la longitud de cada segmento de ADN; se calcula la proporción del número de segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en todo el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb en la misma muestra con respecto a todos los segmentos de ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb para obtener la proporción de cada cromosoma fetal con respecto al ADN total. Esto reduce en gran medida los resultados de detección. La proporción se corrige según el contenido de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar junto con el método de corrección basado en GC anterior, y se calcula la variación de la proporción corregida de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en la muestra para detectar para determinar el número de copias de los cromosomas para detectar según el grado de variación.

45 Al mismo tiempo, el inventor ha descubierto que, de forma similar durante el desarrollo de tumores, sucede lo mismo en la sangre del paciente que en la sangre materna durante el desarrollo de tumores, es decir, en la sangre del paciente con tumor, puede detectarse ADN de células tumorales libres. La relación lineal entre el contenido de GC de los segmentos de ADN de cada cromosoma medido con el método de la invención con las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total es de forma similar adecuada para detectar aneuploidía de células tumorales. Además, está presente ADN de células tumorales libres en plasma en forma de nucleosomas, de modo que son principalmente segmentos de 100 pb a 250 pb, la proporción de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total se distribuye uniformemente con la longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb, es decir, cada cromosoma tiene longitud en cualquier punto dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb, representando de este modo la proporción de cada cromosoma con respecto a todo el ADN dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb. Por lo tanto, el dispositivo de la invención también es adecuado para detectar el número de copias de cromosomas de células tumorales o cromosomas parciales.

55 Basándose en los hallazgos anteriores, el inventor proporciona un kit, un dispositivo y un método para detectar el número de copias de cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales o cromosomas parciales de forma no invasiva y económica.

60 Un kit para detectar el número de copias de cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales proporcionado por la divulgación incluye: un instrumento para recoger sangre de una mujer embarazada o un paciente con tumor; un instrumento para separar células sanguíneas de plasma en sangre; un reactivo y un instrumento para extraer ácidos desoxirribonucleicos (ADN) en plasma; un reactivo y un instrumento para separar el ADN con un método físico según el tamaño de los segmentos de ADN; y un reactivo y un instrumento para secuenciar ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb.

Preferentemente, los cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales son los cromosomas completos o cromosomas parciales.

5 Preferentemente, el kit incluye además: un reactivo y un instrumento para preparar todo el ADN en una biblioteca de secuenciación.

Preferentemente, el kit incluye además: un reactivo y un instrumento para realizar amplificación por PCR del ADN extraído de plasma o la biblioteca de secuenciación.

10 Preferentemente, el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb es el ADN de 150 pb-170 pb, más preferentemente, es el ADN de 167 pb.

15 Otro kit para detectar el número de copias de cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales proporcionado por la divulgación incluye: un instrumento para recoger sangre de una mujer embarazada o un paciente con tumor; un instrumento para separar células sanguíneas de plasma en sangre; un reactivo y un instrumento para extraer ADN del plasma; un reactivo y un instrumento para preparar el ADN en una biblioteca de secuenciación; y un reactivo y un instrumento para secuenciar el ADN, en el que los cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales son los cromosomas completos o cromosomas parciales.

20 Preferentemente, el kit incluye además: un reactivo y un instrumento para realizar amplificación por PCR en el ADN extraído del plasma.

25 Un dispositivo para detectar el número de copias de cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales proporcionado por la invención incluye: un módulo de detección, que se adapta para secuenciar ADN en una muestra de plasma materno o plasma de paciente con tumor, en el que la secuenciación incluye preparar todo el ADN en la muestra de plasma materno o plasma de paciente con tumor en una biblioteca de secuenciación; un módulo de comparación, que se adapta para comparar un resultado de secuenciación del ADN con un mapa de secuencia genómica para determinar de qué cromosoma viene cada secuencia de ADN y la longitud de cada secuencia de ADN; un módulo de cálculo, que se adapta para calcular la proporción del número de segmentos de ADN de los cromosomas para detectar con respecto al número total de segmentos de ADN en la misma muestra, corregir la proporción según el contenido de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar y calcular la variación de la proporción corregida de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en una muestra para detectar, y determinar el número de copias de los cromosomas para detectar según el grado de variación; y un módulo de salida, que se adapta para producir el número de copias de los cromosomas para detectar.

40 Preferentemente, el módulo de cálculo en el dispositivo de la invención corrige las proporciones de los cromosomas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 18 y X según la siguiente función: los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 18 y X tienen respectivamente relaciones lineales con las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total, la relación lineal puede representarse por  $y = ax + b$ , en la que  $y$  representa el contenido de GC del segmento de ADN del cromosoma para detectar,  $x$  representa la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma para detectar con respecto al ADN total,  $a$  y  $b$  son constantes y  $a$  es negativo.

45 Preferentemente, la relación lineal entre los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 18 y X y las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN totales es como se muestra en la Tabla 1.

50 Preferentemente, el módulo de cálculo en el dispositivo de la invención corrige las proporciones de los cromosomas 1, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 19, 20, 21 y 22 según la siguiente función: los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas 1, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 19, 20, 21 y 22 respectivamente tienen relaciones lineales con las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN totales, la relación lineal puede representarse por  $y = ax + b$ , en la que  $y$  representa el contenido de GC del segmento de ADN del cromosoma para detectar,  $x$  representa la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma para detectar con respecto al ADN total,  $a$  y  $b$  son constantes, y  $a$  es positivo.

60 Preferentemente, la relación lineal entre los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas 1, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 19, 20, 21 y 22 y las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total es como se muestra en la Tabla 2.

Preferentemente, la secuenciación incluye el proceso de preparar todo el ADN en la muestra de plasma materno o plasma de paciente con tumor en una biblioteca de secuenciación.

65 Preferentemente, la secuenciación del ADN en la muestra de plasma materno o plasma de paciente con tumor se realiza mediante secuenciación de secuencias cortas de extremos emparejados, secuenciación de secuencias largas de extremos individuales o secuenciación de secuencias cortas de extremos individuales.

Preferentemente, los cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales son los cromosomas completos o cromosomas parciales.

5 Preferentemente, la amplificación por PCR del ADN en la muestra de plasma materno o plasma de paciente con tumor se realiza antes de secuenciar el ADN.

10 Preferentemente, en el dispositivo de la invención, el módulo de cálculo se adapta para calcular la proporción del número de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en todo el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb en la misma muestra con respecto al número total de todos los segmentos de ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb, corrigiendo la proporción según el contenido de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en todo el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb, y calculando la variación de la proporción corregida de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en la muestra para detectar, y determinando el número de copias de los cromosomas para detectar según el grado de variación.

20 Preferentemente, todo el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb en la muestra de plasma materno o plasma de paciente con tumor se prepara en la biblioteca de secuenciación.

Preferentemente, la amplificación por PCR del ADN en la muestra de plasma materno o plasma de paciente con tumor se realiza antes o después de preparar el ADN en la biblioteca de secuenciación.

25 Preferentemente, el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb es el ADN de 150 pb-170 pb, más preferentemente el ADN de 167 pb.

30 Un método para detectar el número de copias de cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales proporcionadas por la divulgación incluye las siguientes etapas: recoger plasma materno o plasma de paciente con tumor; separar el plasma de células sanguíneas en sangre; preparar ADN en el plasma en una biblioteca de secuenciación; secuenciar la biblioteca de secuenciación de ADN; comparar un resultado de secuenciación con un mapa de secuencia genómica para determinar de qué cromosoma viene cada secuencia de ADN y la longitud de cada segmento de ADN; y calcular la proporción de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar con respecto al número total de los segmentos de ADN por secuenciación y resultados de comparación de ADN, corregir la proporción según el contenido de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar, y calcular la variación de la proporción corregida de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en una muestra para detectar, y determinar el número de copias de los cromosomas para detectar según el grado de variación.

40 Preferentemente, el método de la divulgación incluye además corregir las proporciones de los cromosomas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 18 y X según la siguiente función: los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 18 y X respectivamente tienen relaciones lineales con las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total, la relación lineal puede representarse por  $y = ax + b$ , en la que  $y$  representa el contenido de GC del segmento de ADN del cromosoma para detectar,  $x$  representa la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma para detectar con respecto al ADN total,  $a$  y  $b$  son constantes, y  $a$  es negativo.

45 Preferentemente, la relación lineal entre los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 18 y X y las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total es como se muestra en la Tabla 1.

50 Preferentemente, el método de divulgación incluye además corregir las proporciones de los cromosomas 1, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 19, 20, 21 y 22 según la siguiente función: los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas 1, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 19, 20, 21 y 22 tienen respectivamente relaciones lineales con las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total, la relación lineal puede representarse por  $y = ax + b$ , en la que  $y$  representa el contenido de GC del segmento de ADN del cromosoma para detectar,  $x$  representa la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma para detectar con respecto al ADN total,  $a$  y  $b$  son constantes, y  $a$  es positivo.

60 Preferentemente, la relación lineal entre los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas 1, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 19, 20, 21 y 22 y las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total es como se muestra en la Tabla 2.

65 Preferentemente, el método incluye calcular la proporción del número de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en todo el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb en la misma muestra con respecto al número total de todos los segmentos de ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb solamente por secuenciación y resultados de comparación de todo el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a

250 pb, corregir la proporción según el contenido de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en todo el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb, y calcular la variación de la proporción corregida de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en la muestra para detectar, y determinar el número de copias de los cromosomas para detectar según el grado de variación.

Preferentemente, se realiza secuenciación de la biblioteca de secuenciación de ADN mediante secuenciación de secuencias cortas de extremos emparejados, secuenciación de secuencias largas de extremos individuales o secuenciación de secuencias cortas de extremos individuales.

Preferentemente, el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del tramo de 100 pb a 250 pb es el ADN de 150 pb-170 pb, más preferentemente el ADN de 167 pb.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una imagen obtenida por electroforesis en gel de agarosa 1 % después de preparar el ADN en plasma materno en una biblioteca para secuenciación de extremos emparejados. El canal izquierdo es una imagen de un marcador de 100 pb de ADN, el canal derecho es una imagen de una biblioteca para secuenciación de extremos emparejados, y la tira más evidente se localiza a aproximadamente 280 pb, que contiene cebadores de conexión de 120 pb.

La Fig. 2 es un gráfico de distribución del tamaño de segmentos de ADN de la muestra G356.

La Fig. 3 es un gráfico de distribución de segmento de ADN de cromosoma X en una muestra G356 comparada realizado según el tamaño del segmento.

La Fig. 4 es un gráfico de distribución de segmentos de ADN calculados y realmente medidos del cromosoma X de G356 según el tamaño del segmento, en el que la línea con un asterisco representa un gráfico obtenido multiplicando el número total de secuencias de ADN de la muestra G356 por el porcentaje de cromosoma X, el círculo representa el número de secuencia de cromosomas X realmente medidos. Como se muestra en la figura, la distribución del segmento de ADN del cromosoma X de G356 calculada es la misma que la distribución medida realmente esencialmente, estas dos líneas son básicamente uniformes entre sí.

Las Figs. 5A-5H son curvas patrón dibujadas según los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en G356, G397 (repetido 8 veces), G426, G735, G756, G760, G763, G770, G778, G779, G780, G781, G824 y G825 y las proporciones de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar con respecto a los segmentos de ADN total, en los que las muestras G346, G397, G426, G735, G756, G760, G763, G770, G778, G779, G780, G781, G824 y G825 se identifican como muestras de feto femenino normal [46, XX] mediante amniocentesis por cariotipo de cromosomas en el Colegio Médico Xiangya de la Universidad Central del Sur. El eje X presenta la proporción del número de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar con respecto a los segmentos de ADN total, el eje Y representa el contenido de GC de segmentos de ADN de los cromosomas para detectar. Cada una de 5A-5F muestra curvas patrón de tres cromosomas, que muestran ordenadamente curvas patrón de los cromosomas 1 a 18, la Fig. 5G muestra una curva patrón de los cromosomas 19 al 22, la Fig. 5H muestra una curva patrón del cromosoma X. Las funciones de las curvas patrón de cada cromosoma son como se muestra en la Tabla 1 y la Tabla 2.

La FIG. 6 es un diagrama esquemático de una muestra de trisomía del 13 detectada por el método de la invención, en el que el eje X representa la proporción del número de segmentos de ADN del cromosoma 13 con respecto a los segmentos de ADN total, el eje Y representa el contenido de GC de los segmentos de ADN del cromosoma 13. El rombo en el eje X muestra la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma 13 con respecto a los segmentos de ADN total en cada muestra, el rectángulo indicado por flecha representa una muestra de trisomía del 13 detectada después de corregir el contenido de GC de segmentos de ADN del cromosoma 13. Si no se realiza la corrección del contenido de GC de segmentos de ADN de los cromosomas para detectar de la presente invención, no se pueden encontrar tres muestras anómalas indicadas por la flecha solamente por la proporción de los segmentos de ADN del cromosoma 13 con respecto a los segmentos de ADN total, y habría un resultado de falso negativo.

La Fig. 7 es un diagrama esquemático de una muestra de trisomía del 18 detectada por el método de la invención, en el que el eje X representa la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma 18 con respecto a los segmentos de ADN total, el eje Y representa el contenido de GC de los segmentos de ADN del cromosoma 18. El rombo en el eje X muestra la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma 18 con respecto a los segmentos de ADN total en cada muestra, el rectángulo indicado por la flecha representa una muestra de trisomía del 18 detectada después de corregir el contenido de GC de segmentos de ADN del cromosoma 18. Si la corrección del contenido de GC de segmentos de ADN de los cromosomas para detectar de la presente invención no se realiza, puede encontrarse solamente que 5 muestras en las que la proporción del segmento de ADN del cromosoma 18 con respecto a los segmentos de ADN total es mayor que o igual a 0,031 es la trisomía del 18, y no

puede encontrarse que dos muestras con una proporción de aproximadamente 0,03 son anómalas, solamente por la proporción de los segmentos de ADN del cromosoma 18 con respecto a los segmentos de ADN total, con respecto a las dos muestras, habría un resultado de falso negativo.

- 5 La Fig. 8 es un diagrama esquemático de una muestra de monosomía o trisomía del X detectada por el método de la divulgación en el que el eje X representa la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma X con respecto a los segmentos de ADN total, el eje Y representa el contenido de GC de los segmentos de ADN del cromosoma X. El rombo en el eje X muestra la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma X con respecto a los segmentos de ADN total en cada muestra, el rectángulo indicado por la flecha a la izquierda de la curva patrón representa una muestra de monosomía del X detectada después de corregir el contenido de GC de segmentos de ADN del cromosoma X, el rectángulo indicado por la flecha a la derecha de la curva patrón representa una muestra de trisomía del X detectada después de corregir el contenido de GC de segmentos de ADN del cromosoma X. Si no se realiza la corrección del contenido de GC de segmentos de ADN de los cromosomas para detectar la presente invención, solamente puede encontrarse una muestra de trisomía del X y la muestra de monosomía del X no puede encontrarse fácilmente solamente por la proporción de los segmentos de ADN del cromosoma X con respecto a los segmentos de ADN total, y habría un resultado de falso negativo.

- Las Figs. 9A-9B son diagramas esquemáticos de una muestra de trisomía del 21 detectada por el método de la divulgación en el que el eje X representa la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma 21 con respecto a los segmentos de ADN total, el eje Y representa el contenido de GC de los segmentos de ADN del cromosoma 21. El rombo en el eje X muestra la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma 21 con respecto a los segmentos de ADN total en cada muestra, el rectángulo indicado por flecha representa una muestra de trisomía del 21 detectada después de corregir el contenido de GC de segmentos de ADN del cromosoma 18. Si puede encontrarse que solamente 4 muestras en las que la proporción de segmento de ADN del cromosoma 21 en la Fig. 9 con respecto a los segmentos de ADN total es el máximo es la trisomía del 21, y no puede encontrarse que las muestras con una proporción de aproximadamente 0,0138 sean anómalas, solamente por la proporción de los segmentos de ADN del cromosoma 18 con respecto a los segmentos de ADN total en lugar de corrigiendo el contenido de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar, con respecto a las muestras, hay un resultado de falso negativo.

### 30 Descripción detallada de las realizaciones

- Debería observarse que, sin contradicción, las realizaciones de la solicitud y las características en las realizaciones pueden combinarse. La invención se describe posteriormente con referencia a dibujos junto con realizaciones. Los dibujos de la invención y las realizaciones se usan solamente para explicar la invención, y no se pretende que limiten la invención.

#### Definición de expresiones

- 40 Secuencia corta de extremos emparejados se refiere a una secuencia de menos de 50 pb junto a cebador conector 5' terminal y una secuencia de menos de 50 pb junto a cebador conector 3' terminal. Preferentemente, la secuencia corta de extremos emparejados se refiere a una secuencia de no más de 36 pb junto a cebador conector 5' terminal y una secuencia de no más de 36 pb junto a cebador conector 3' terminal.
- 45 Secuencia corta de extremo individual se refiere a una secuencia de menos de 50 pb junto a cebador conector 5' terminal o una secuencia de menos de 50 pb junto a cebador conector 3' terminal. Preferentemente, la secuencia corta de extremo individual se refiere a una secuencia de no más de 36 pb junto a cebador conector 5' terminal o una secuencia de no más de 36 pb junto a cebador conector 3' terminal.
- 50 Secuencia larga de extremo individual se refiere a una secuencia de más de 99 pb junto a cebador conector 5' terminal o una secuencia de más de 99 pb junto a cebador conector 3' terminal.

Secuenciación de extremos emparejados se refiere a ensayar la secuencia de ambos extremos de la secuencia.

- 55 Secuenciación de extremo individual se refiere a ensayar la secuencia en un extremo de la secuencia.

- Grupo de ADN se refiere a múltiples moléculas de ADN formadas amplificando una molécula de ADN y localizadas en un área de superficie fija. En las realizaciones de la solicitud, el grupo de ADN se refiere a aproximadamente 1000 moléculas de ADN formadas amplificando una molécula de ADN y localizada dentro de un 1 micrómetro cuadrado.

- 60 La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de emulsión se refiere a realizar reacción de PCR colocando reactivos de PCR incluyendo ADN molde de PCR, cebador de PCR, polimerasa de PCR y bases libres dentro de una gota de aceite. Habitualmente, dentro de una gota de aceite, el molde de PCR de emulsión tiene solamente una molécula de ADN.

- 65

El contenido de GC se refiere a la proporción del número de guanina y citosina con respecto al número total de todas las bases en ácidos nucleicos o ácidos desoxirribonucleicos.

**Realización 1: Un método para detectar el número de copias de cromosomas fetales**

5

Etapa 1: Recoger sangre materna para preparar plasma.

10

En la realización, se extraen 14 muestras de sangre materna, códigos de muestra: G356, G397, G426, G735, G756, G760, G763, G770, G778, G779, G780, G781, G824 y G825, todos identificados como muestras de feto femenino normales [46, XX] por el Profesor Wu Lingqian del Colegio Médico Xiangya de la Universidad Central del Sur mediante amniocentesis por cariotipo de cromosomas. Los datos detectados de las muestras anteriores se usan para dibujar una curva patrón, y las muestras anteriores también se usan como muestras patrón. Se obtienen muestras de plasma de las que se retiran células sanguíneas después de centrifugar las muestras de sangre a alta velocidad, y cada muestra tiene un volumen de plasma de aproximadamente 1 ml.

15

Etapa 2: Extraer ADN de plasma.

Se extrae ADN en el plasma usando el kit de extracción de ADN producido por Qiagen (número de producto: 57704).

20

Etapa 3: Preparar el ADN de plasma en una biblioteca de secuenciación.

25

El ADN de plasma puede prepararse en una biblioteca para secuenciación de secuencias cortas de extremos emparejados, secuenciación de secuencias largas de extremos individuales o secuenciación de secuencias cortas de extremos individuales. El proceso para preparar la biblioteca para secuenciación de secuencias cortas de extremos emparejados es el siguiente.

30

Los extremos del ADN extraído se hacen romos y se somete el ADN a fosforilación 5' terminal: 30 µl de ADN, 45 µl de agua pura, 10 µl de tampón de ADN ligasa T4 con ATP 10 mM, 4 µl de mezcla de dNTP 10 mM, 5 µl de ADN polimerasa T4, 1 µl de enzima Klenow y 5 µl de PNK T4 se tratan en un baño caliente durante 30 min a 20 ° C después de mezclar (los reactivos se proporcionan por el kit de preparación de muestras Illumina PE-102-1001). El ADN se purifica mediante el kit de purificación de PCR QIAquick de QIAGEN (parte n.º 28104) después del tratamiento con baño caliente.

35

Suspensión de A en el extremo: el producto resultante de la etapa anterior se disuelve en 32 µl de tampón, 5 µl de tampón Klenow, 10 µl de dATP 1 mM y 3 µl de Exo Klenow se añaden a la mezcla y se mantienen durante 30 min a 37 ° C (los reactivos se proporcionan por el kit de preparación de muestras Illumina PE-102-1001), el producto resultante se purifica mediante el kit de purificación de PCR MinElute de QIAGEN (parte n.º 28004).

40

Conexión: el ADN se disuelve en 10 µl de tampón, 2 x 25 µl de tampón de ADN ligasa, 10 µl de Mezcla de Oligos Adaptadores PE y 5 µl de ADN ligasa se añaden a la mezcla, y se mantienen durante 15 min a 20 ° C (los reactivos se proporcionan por el kit de preparación de muestras de Illumina PE-102-1001). El ADN se purifica mediante el kit de purificación de PCR QIAquick de QIAGEN (parte n.º 28104) después del tratamiento con baño caliente.

45

La Fig. 1 es una imagen de electroforesis en gel, en la que el ADN en una muestra se prepara en una biblioteca para secuenciación de extremos emparejados, el ADN de la biblioteca se somete a electroforesis por 1 % de gel de agarosa, localizándose la tira más evidente a 280 pb, debido a que contiene cebadores enlazadores de 120 pb, los segmentos de ADN principales en el plasma materno principalmente se centran en aproximadamente 160 pb.

50

Preferentemente, también puede realizarse amplificación por PCR en la biblioteca para secuenciación de extremos emparejados: 1 µl de ADN, 22 µl de agua pura, 1 µl de cebador de PCR PE PE 2.0, 1 µl de cebador de PCR PE PE 1.0 y ADN polimerasa Phusion 2x (Finnzymes Oy) (los reactivos se proporcionan por el kit de preparación de muestras Illumina PE-102-1001). El ADN se amplifica mediante instrumento de PCR, el procedimiento es 98 °C, 30 s, 98 °C, 40 s, 65 °C, 30 s, 72 °C, 30 s, 12 ciclos en total, 72 °C, 5 min.

55

Etapa 4: Secuenciación de la biblioteca de secuenciación de ADN.

60

Según diferentes bibliotecas preparadas en la Etapa 3, puede realizarse secuenciación de secuencias cortas de extremos emparejados, secuenciación de secuencias largas de extremos individuales o secuenciación de secuencias cortas de extremos individuales respectivamente. El proceso para realizar secuenciación de secuencias cortas de extremos emparejados es el siguiente.

65

Se prepara una molécula de ADN individual en biblioteca de secuenciación de extremos emparejados de ADN en grupo de ADN mediante instrumento cBot de Illumina, esta etapa también puede ser una etapa de cambio de molécula de ADN individual en polimolécula en una gota mediante PCR de emulsión. El grupo de ADN generado o la gota de ADN obtenida mediante PCR de emulsión se someten a secuenciación de extremos emparejados en



Analizador de Genoma o secuenciador HiSeq2000 de Illumina. El proceso se finaliza automáticamente por el propio instrumento.

5 Como alternativa, el grupo de ADN generado o la gota de ADN obtenida mediante PCR de emulsión se somete a secuenciación de secuencias largas de extremos individuales en Analizador de Genoma o HiSeq2000 de Illumina, o secuenciador SOLiD de Life Technologies. Las etapas de secuenciación y las condiciones de reacción en el Analizador de Genoma o HiSeq2000 de Illumina, o secuenciador SOLiD de Life Technologies son las mismas que se han descrito anteriormente.

10 Etapa 5: Determinar de qué cromosoma viene el segmento de ADN en el plasma y determinar si el número de copias de los cromosomas para detectar es normal.

15 Después de realizar secuenciación de secuencias cortas de extremos emparejados de la biblioteca de ADN (como alternativa, medir secuenciación de secuencias largas de extremos individuales o secuenciación de secuencias cortas de extremos individuales), cuando se conoce cada secuencia de base de 36 pb en cada extremo de un segmento de ADN, las secuencias en ambos extremos pueden compararse con la secuencia patrón de genoma humano 37.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/human/data/?build=37>), que también se denomina hg19 para determinar la posición respectiva de las secuencias en ambos extremos del cromosoma. La distancia entre las secuencias en ambos extremos es la longitud del segmento de ADN, al mismo tiempo, la posición cromosómica de las secuencias en ambos extremos determina de qué cromosoma viene el segmento de ADN.

La Fig. 2 es un gráfico de distribución del tamaño de segmento de ADN de la muestra G356 determinado según el método anterior, del que el ADN corto en el plasma materno se centra principalmente entre 100 pb y 220 pb.

25 La Fig. 3 es un gráfico de distribución de segmento de ADN del cromosoma X en una muestra comparada G356 preparada según el tamaño del segmento. El gráfico obtenido es sustancialmente igual que en la Fig. 2.

30 Etapa 6: Calcular la proporción del número de segmentos de ADN de los cromosomas para detectar con respecto a todos los segmentos de ADN en el ADN en la misma muestra, corregir la proporción de acuerdo con el contenido de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar, y calcular la variación de la proporción corregida de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en una muestra para detectar, y determinar el número de copias de los cromosomas para detectar según el grado de variación.

35 Preferentemente, el método incluye calcular la proporción del número de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en todo el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb en la misma muestra con respecto al número total de todos los segmentos de ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb mediante secuenciación y resultados de comparación de todo el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb de longitud de secuencia de ADN, corrigiendo la proporción según el contenido de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar, y calcular la variación de la proporción corregida de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en la muestra para detectar, y determinar el número de copias de los cromosomas para detectar según el grado de variación.

45 En experimentos, se ha descubierto que la precisión del resultado experimental puede mejorarse mediante secuenciación y resultados de comparación de todo el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb de longitud de secuencia de ADN.

50 El algoritmo específico es el siguiente: Usando muestras convencionales, calcular la proporción de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en la misma muestra con respecto a todos los segmentos de ADN, obtener el contenido de GC del segmento de ADN de los cromosomas para detectar según los resultados de secuenciación; dibujar una curva patrón de contenido de GC (eje Y) y el porcentaje (eje X) de cada cromosoma o cromosoma parcial con respecto a todos los cromosomas de acuerdo con la proporción anterior y contenido de GC; corregir la proporción medida del cromosoma de muestra para detectar en un valor de GC fijo (habitualmente media aritmética de valor de GC) según su propia función del cromosoma; y calcular el valor de variación Z de la proporción corregida de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en la muestra para detectar, y determinar el número de copias de los cromosomas para detectar según el valor Z.

60 Las Figs. 5A-5H son curvas patrón dibujadas según los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en muestras medidas y las proporciones de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar con respecto a los segmentos de ADN total. Puede verse a partir de las figuras que los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 18 y X están respectivamente en proporción inversa a las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total, la relación lineal con las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total, la relación lineal puede representarse mediante  $y=ax+b$ , en la que y representa el contenido de GC del segmento de ADN del cromosoma para detectar, x representa la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma para detectar con respecto al ADN total, a y b son constantes y a es negativa.

Deberá observarse que, con respecto a diferentes muestras de referencia, pueden producirse pequeños cambios en parámetros específicos de la fórmula, pero la tendencia general no cambia. Las funciones de los cromosomas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 18 y X se muestran en la Tabla 1:

5

Tabla 1	
Cromosoma n.º	Función
2	Y = -1274,5X + 154,48
3	Y = -682,68X + 88,11
4	Y = -391,42X + 62,075
5	Y = -772,25X + 88,517
6	Y = -729,61X + 84,354
7	Y = -2874,7X + 197,28
8	Y = -1599,4X + 122,84
12	Y = -1936,7X + 129,32
13	Y = -827,29X + 67,049
14	Y = -933,9X + 74,22
18	Y = -1946,4X + 97,323
X	Y = -749,77X + 71,33

Los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas, 1, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 19, 20, 21 y 22 están respectivamente en proporción con las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total, la relación lineal puede representarse mediante  $y=ax+b$ , en la que y representa el contenido de GC del segmento de ADN del cromosoma para detectar, x representa la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma para detectar con respecto al ADN total, a y b son constantes y a es positivo.

10

Tabla 2	
Cromosoma n.º	Función
1	Y = 909,17X - 29,372
9	Y = 2211,3X - 45,632
10	Y = 1886,8X - 51,026
11	Y = 1255X - 15,714
15	Y = 1775,8X - 10,124
16	Y = 797,17x + 23,883
17	Y = 560,83X + 31,227
19	Y = 513,79X + 43,088
20	Y = 1006,7X + 22,818
21	Y = 7298X - 51,083
22	Y = 596,24X + 43,346

15 Después, la proporción medida de cromosoma de muestra para detectar se corrige en un valor de GC fijo (habitualmente media aritmética del valor de GC) según su propia función del cromosoma.

Por ejemplo, puede verse a partir de la función  $y=ax+b$  representada por los contenidos de GC de los segmentos de ADN de cada cromosoma y las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total, que la proporción x de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total en cada muestra pueden corregirse mediante la función de acuerdo con el valor de GC. La

20

fórmula de corrección puede ser  $x = \bar{e} - \frac{(y - \hat{y})}{a}$ , en la que x es la proporción corregida de los segmentos de

ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total;  $\bar{e}$  es la proporción del segmento de cromosoma específico con respecto a los segmentos de ADN total en la muestra detectada; y es el contenido de GC del segmento de cromosoma específico en la muestra para detectar;  $\hat{y}$  es la media aritmética del valor de GC del segmento de cromosoma en la muestra patrón detectada (muestra normal conocida, tal como 14 muestras patrones normales conocidas detectadas en la Realización 1). a es la pendiente de esta curva. Para la función de cada cromosoma, véase Tabla 1 y Tabla 2; para muestras diferentes,  $\bar{e}$  e  $\hat{y}$  son valores medidos de este ensayo, que varían junto con diferentes muestras para detectar.

25

Mediante el cálculo de los valores promedios de estos valores X corregidos y errores convencionales, se obtiene el valor Z:  $Z=(\text{proporción corregida } x \text{ de la muestra para detectar} - \text{valor promedio corregido de proporción de cada muestra patrón})/\text{Error típico}$ . Se calcula la variación de la proporción x corregida en cada muestra para detectar, y se determina el número de copias de los cromosomas para detectar o cromosomas parciales para detectar según el valor Z de variación. En general, el valor absoluto de Z que es menor de 3 se considera error de detección normal, y el valor absoluto Z que es mayor de 3 se considera anómalo.

30

Las siguientes Tablas 3, 4, y 5 muestran resultados de detección y corrección de los cromosomas 13, 18 y 21 calculados detectando muestras G356, G397 (repetida 8 veces), G426, G735, G756, G760, G763, G770, G778,

## ES 2 605 372 T3

G779, G780, G781, G824 y G825 con el método de la Realización 1.

Tabla 3: Tabla de corrección del cromosoma 13

Muestra		X	Y	X corregido
G356		0,032128056	40,40838593	0,0312599
G397L1		0,031796287	40,74129367	0,031330538
G397L2		0,031829498	40,74485255	0,031368051
G397L3		0,031300856	41,02955526	0,031183548
G397L4		0,031461675	40,97527314	0,031278753
G397L5		0,030861045	41,52415988	0,031341599
G397L6		0,031076999	41,18977275	0,031153357
G397L7		0,030740791	41,5445585	0,031246002
G397L8		0,031068253	41,29163215	0,031267736
G426		0,032116722	40,65542488	0,031547179
G735		0,030833804	41,76349467	0,031603657
G756		0,032145341	40,54153095	0,031438126
G760		0,032505467	40,22754276	0,031418714
G763		0,03135526	41,028428	0,03123659
G770		0,029324725	42,84226241	0,031398557
G778		0,030580783	41,74167735	0,031324265
G779		0,030604185	41,75611131	0,031365114
G780		0,03115125	41,49762797	0,031599733
G781		0,030039316	42,09062396	0,031204592
G824		0,032731055	39,92248585	0,031275559
G825		0,032354852	40,14196058	0,03116465
	Valor promedio	0,03133363	41,1266026	0,03133363
	Error típico	0,000853052	0,714097704	0,000131819
	Pendiente	-827,2898903		

Tabla 4: Tabla de corrección del cromosoma 18

Muestra		X	Y	X corregido
G356		0,028355	42,32462	0,028009403
G397L1		0,028042	42,66689	0,027871871
G397L2		0,028211	42,5936	0,028003058
G397L3		0,027866	42,92468	0,027828101
G397L4		0,028163	42,8853	0,028105316
G397L5		0,027723	43,42382	0,027941782
G397L6		0,027887	43,01112	0,027893673
G397L7		0,027615	43,52203	0,027884151
G397L8		0,027718	43,18862	0,027815666
G426		0,028085	42,34471	0,027749591
G735		0,027524	43,74306	0,027906323
G756		0,028028	42,56583	0,027805722
G760		0,028321	42,13679	0,02787838
G763		0,027859	42,81759	0,027766269
G770		0,027028	44,70943	0,027907267
G778		0,02775	43,55682	0,028036728
G779		0,02766	43,52168	0,027929435
G780		0,027819	43,34723	0,027998124
G781		0,027553	43,88948	0,028010923
G824		0,02851	41,7596	0,027874031

Muestra		X	Y	X corregido
G825		0,028393	42,02757	0,027894578
	Valor promedio	0,02791	42,99812	0,027910019
	Error típico	0,000353	0,710198	0,0000921681
	Pendiente	-1946,44		

Tabla 5: Tabla de corrección del cromosoma 21

Muestra		X	Y	X corregido
G356		0,01313	44,40818	0,013271072
G397L1		0,013154	44,93124	0,013223969
G397L2		0,013215	44,89741	0,013289069
G397L3		0,013191	45,45013	0,013189714
G397L4		0,013192	45,39349	0,013197949
G397L5		0,013315	46,10443	0,013224459
G397L6		0,013301	45,56648	0,013283986
G397L7		0,013347	46,32729	0,013225833
G397L8		0,01339	45,78404	0,013342788
G426		0,013157	44,51204	0,013283828
G735		0,013269	46,54507	0,013117886
G756		0,013212	44,89562	0,013286433
G760		0,013046	44,22742	0,01321199
G763		0,013181	45,2873	0,013202366
G770		0,01351	47,67432	0,013203677
G778		0,013235	45,93867	0,0131666
G779		0,013146	46,1604	0,013047278
G780		0,013177	45,80678	0,013126693
G781		0,013333	46,55558	0,013180262
G824		0,013081	43,62277	0,0133298
G825		0,013164	44,15792	0,013339786
	Valor promedio	0,013226	45,44031	0,013225973
	Error típico	0,000109	0,973152	0,0000762249
	Pendiente	7298,004		

5 Obsérvese que el método de detección y cálculo anterior no solamente es adecuado para detectar la anomalía del número de copias del cromosoma completo, sino que también es adecuado para detectar la anomalía de número de copias del cromosoma parcial.

**A continuación hay una realización en la que se detecta el número de copias del cromosoma fetal 13 en una muestra para detectar**

10 Como se ha descrito anteriormente, se extraen un total de 15 muestras de sangre materna, se obtienen muestras de plasma de las que se retiran células sanguíneas después de centrifugar las muestras de sangre a alta velocidad, y cada muestra tiene un volumen de plasma de aproximadamente 1 ml. El código de muestra es G352, G362, G372, G383, G397 (repetida 8 veces), G402, G409, G415, G424, G445, G503, G488, G735 y G783. Las muestras anteriores se recogen por el Profesor Wu Lingqian del Colegio Médico de Xiangya de la Universidad Central del Sur.

20 Se detecta la trisomía del 13 que está posiblemente presente. El resultado de detección se verifica mediante la curva patrón del cromosoma 13 obtenida anteriormente. Como se muestra en la Fig. 6, en ausencia de corrección de GC (marcado con un rombo en el eje X de la figura), es imposible distinguir las muestras de trisomía del 13 G445, G352 y G402 (muestras marcadas con 3 círculos en el eje x) de muestras normales (muestras sin marcas en el eje x). Sin embargo, en presencia de corrección de GC (representada por un rectángulo en la figura), es posible distinguir claramente muestras de trisomía del 13 G445, G352 y G402 (muestras marcadas con 3 flechas en la figura) de muestras normales (otras muestras representadas por un rectángulo en la figura). El resultado de corrección de GC es el mismo que el resultado identificado por el Profesor Wu Lingqian del Colegio Médico de Xiangya de la Universidad Central del Sur mediante amniocentesis por cariotipo de cromosoma. Como resultado, la corrección del contenido de GC puede usarse para detectar la trisomía del 13 para reducir la aparición de resultados falsos

negativos.

La siguiente Tabla 6 ilustra solamente la detección y el resultado del cálculo de parte de las muestras para detectar, y no ilustra el resultado de otras muestras.

5

Tabla 6: Tabla de cálculo de valor Z del cromosoma 13 corregido

Muestra	Resultado de Cariotipo	X corregido	Valor Z corregido
G445	47,XX,+13	0,033854	19,12307
G352	47,XY,+13	0,033835	18,97637
G402	47,XY,+13	0,034761	25,99744
G383	46,XY	0,031641	2,331371
G415	47,XX,+18	0,031497	1,23855
G503	46,XY	0,031504	1,29343
G424	47,XY,+18	0,031567	1,771192

Cromosoma 13	X corregido
Valor promedio	0,031334
Error típico	0,000132

10 Puede verse a partir de la tabla anterior que el valor Z de las muestras G445, G352, G402 es mayor de 3, lo que puede valorarse como trisomía del 13. El valor Z de otras muestras está entre -3 y +3.

**A continuación hay una realización en la que se detecta el número de copias del cromosoma fetal 18 en una muestra para detectar**

15 Como se ha descrito anteriormente, se extraen un total de 16 muestras de sangre materna, se obtienen muestras de plasma de las que se retiran células sanguíneas después de centrifugar las muestras de sangre a alta velocidad, y cada muestra tiene un volumen de plasma de aproximadamente 1 ml. El código de muestra es G362, G372, G383, G397 (repetida 8 veces), G407, G409, G415, G424, G432, G445, G440, G595, G588, G735 y G783. Las muestras anteriores se recogen por el Profesor Wu Lingqian del Colegio Médico de Xiangya de la Universidad Central del Sur.

20 Se detecta la trisomía del 18 que está posiblemente presente. Como se muestra en la Fig. 7, el resultado de detección se verifica mediante curva patrón del cromosoma 18 obtenido anteriormente. En ausencia de corrección de GC (marcado con un rombo en el eje X en la figura), es imposible distinguir algunas muestras de trisomía del 18 (muestras marcadas con 1 círculo negro en el eje x) de muestras normales (muestras sin marcas en el eje x representadas por un rombo), lo que da como resultado muestras de falso negativo. Otras muestras de trisomía del 18 (muestras marcadas con una flecha hacia abajo en el eje x) pueden detectarse sin corrección de GC. Sin embargo, en presencia de corrección de GC (representada por un rectángulo en la figura), es posible distinguir claramente todas las muestras de trisomía del 18 (muestras marcadas con flechas horizontales en la figura) de muestras normales (otras muestras representadas por el rectángulo en la figura). El resultado de corrección de GC es el mismo que el resultado identificado por el Profesor Wu Lingqian del Colegio Médico de Xiangya de la Universidad Central del Sur mediante amniocentesis por cariotipo de cromosoma. Como resultado, la corrección del contenido de GC puede usarse para detectar trisomía del 18 para reducir la aparición de resultados falsos negativos.

35 La siguiente Tabla 7 ilustra solamente la detección y el resultado de cálculo de parte de las muestras para detectar, y no ilustra el resultado de otras muestras.

Tabla 7: Tabla de cálculo de valor Z de cromosoma 18 corregido

Muestra	Resultado de Cariotipo	X corregido	Valor Z corregido
G424	47,XY,+18	0,031846	42,7029466
G442	47,XY,+18	0,03259	50,7813669
G432	47,XY,+18	0,031475	38,6805289
G415	47,XX,+18	0,029786	20,35574454
G595	47,XY,+18	0,031124	34,87420168
G407	47,XY,+18	0,030189	24,72396854
G372	46,XY	0,027704	-2,234074343
G383	46,XY	0,027657	-2,740277188
G362	46,XY	0,02795	0,428428385

Muestra	Resultado de Cariotipo	X corregido	Valor Z corregido
---------	------------------------	-------------	-------------------

Cromosoma 18	X corregido
Valor promedio	0,027910019
Error típico	0,0000921681

Puede verse a partir de la tabla anterior que el valor Z de las muestras G424, G442, G432, G415, G595, G407 es mayor de 3, lo que puede valorarse como trisomía del 18. El valor Z de otras muestras está entre -3 y +3.

5 **A continuación hay una realización en la que se detecta el número de copias del cromosoma fetal 21 en una muestra para detectar**

10 Como se ha descrito anteriormente, se extraen un total de 14 muestras de sangre materna, se obtienen muestras de plasma de las que se retiran células sanguíneas después de centrifugar las muestras de sangre a alta velocidad, y cada muestra tiene un volumen de plasma de aproximadamente 1 ml. El código de muestra es G267, G387, G393, G376, G397 (repetida 8 veces), G405, G408, G409, G440, G491, G588, G641, G735 y G783. Las muestras anteriores se recogen por el Profesor Wu Lingqian del Colegio Médico de Xiangya de la Universidad Central del Sur.

15 Se detecta la trisomía del 21 (es decir, muestra de síndrome de Down) que está posiblemente presente. Como se muestra en la Fig. 9A, el resultado de detección se verifica mientras curva patrón del cromosoma 21 obtenido anteriormente. En ausencia de corrección de GC (marcada con rombo en el eje X en la figura), la muestra con trisomía del 21 (una muestra marcada con círculos negros y 3 flechas verticales en el eje x) puede detectarse solamente mediante el porcentaje de la trisomía del 21 en todos los cromosomas. La diferencia entre una muestra  
20 (una muestra marcada con un círculo negro en el eje x) y muestra normal (otras muestras marcadas con rombos) no es evidente, lo que puede dar como resultado muestras de falso negativo. Sin embargo, en presencia de corrección de GC (representada por un rectángulo en la figura), es posible distinguir claramente todas las muestras de trisomía del 21 (muestras marcadas con 4 flechas horizontales en la figura) de muestras normales (otras muestras representadas por un rectángulo en la figura). El resultado de corrección de GC es el mismo que el resultado  
25 identificado por el Profesor Wu Lingqian del Colegio Médico de Xiangya de la Universidad Central del Sur mediante amniocentesis por cariotipo de cromosoma. La mejora de la precisión de la trisomía del 21 mediante corrección del contenido de GC puede medirse por distancia mínima entre la muestra con trisomía del 21 y la normal. Como se muestra en la Fig. 9B, la distancia mínima corregida d1 es mayor que la distancia mínima d2 que no se ha corregido. Como resultado, la corrección del contenido de GC puede usarse para detectar trisomía del 21 para reducir la  
30 aparición de resultados de falso negativo.

La siguiente Tabla 8 ilustra solamente la detección y el resultado de cálculo de parte de las muestras para detectar, y no ilustra el resultado de otras muestras.

35 Tabla 8: Tabla de cálculo de valor Z de cromosoma 21 corregida

Muestra	Resultado de Cariotipo	X corregido	Valor Z corregido
G405	47,XX,+21	0,014702324	19,36834952
G387	47,XX,+21	0,014591238	17,91101164
G376	47,XX,+21	0,014355433	14,81746245
G393	47,XX,+21	0,014044123	10,73336561
G491	46,XY	0,013049564	-2,314322329
G641	46,XY	0,013287067	0,801496645
G488	46,XY	0,013284892	0,772960653
G408	46,XX	0,013038312	-2,461945144

Cromosoma 18	X corregido
Valor promedio	0,013225973
Error típico	0,0000762249

Puede verse a partir de la tabla anterior que el valor Z de las muestras G405, G387, G376, G393 es mayor de 3, lo que puede valorarse como trisomía del 21. El valor Z de otras muestras está entre -3 y +3.

40

**Realización 2: Un kit para detectar el número de copias de cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales**

5 Con respecto al método de detección de la Realización 1, el inventor de la solicitud desarrolla un kit para detectar el número de copias de cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales, que incluye:

un instrumento para recoger sangre de una mujer embarazada o un paciente con tumor, que puede ser cualquier aguja de recogida de sangre para recoger sangre, jeringa o similares;

10 un instrumento para separar células sanguíneas de plasma en sangre, que puede ser un micro-tubo adecuado para contener sangre en una centrifuga o cualquier otro recipiente o instrumento para separación;

15 reactivos e instrumentos para extraer ADN del plasma, que pueden incluir proteasa, fenol saturado, cloroformo: isoamilol (24:1), acetato sódico, alcohol anhídrido, etanol 70 %, solución de TE, etc., el ADN en el plasma puede extraerse usando kit de extracción de ADN producido por Qiagen (número de producto: 57704) y cualquier otro reactivo o recipiente para extraer el ADN;

20 un reactivo y un instrumento para preparar el ADN en una biblioteca de secuenciación, la biblioteca de secuenciación puede ser una biblioteca para la secuenciación de secuencias cortas de extremos emparejados, una biblioteca para secuenciación de secuencias largas de extremos individuales o una biblioteca para la secuenciación de secuencias cortas de extremos individuales, el reactivo y un instrumento para preparar el ADN en la biblioteca para secuenciación de secuencias cortas de extremos emparejados incluye: tampón de ADN ligasa T4 con ATP 10 mM, Mezcla de dNTP 10 nM, ADN polimerasa T4, enzima de Klenow y PNK T4 (los reactivos anteriores se proporcionan por el kit de preparación de muestras de Illumina PE-102-1001), así como resina de intercambio iónico con afinidad por el ADN en ciertas circunstancias para realizar la separación de ADN, además, pueden seleccionarse el kit de separación de producto de PCR QIAquick QIAGEN (número de producto: n.º 28104) o kit de separación de producto de PCR MinElute QIAGEN (número de producto: n.º 28004);

30 un reactivo y un instrumento para secuenciar el ADN, que pueden usarse para realizar la secuenciación de secuencias cortas de extremos emparejados, la secuenciación de secuencias largas de extremos individuales o secuenciación de secuencias cortas de extremos individuales en el ADN. El reactivo y un instrumento para realizar secuenciación de secuencias cortas de extremos emparejados pueden incluir cebador de PCR PE PE 2.0, cebador de PCR PE PE 1.0, ADN polimerasa Phusion (Finnzymes Oy) (los reactivos se proporcionan por el kit de preparación de muestras de Illumina PE-102-1001).

35 **Realización 3: Otro kit para detectar el número de copias de cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales**

40 El inventor de la solicitud desarrolla otro kit para detectar el número de copias de cromosomas fetales o cromosomas de células de tumorales, que incluye:

un instrumento para recoger sangre de una mujer embarazada o un paciente con tumor, que puede ser cualquier aguja de recogida de sangre para recoger sangre, jeringa o similares;

45 un instrumento para separar células sanguíneas de plasma en sangre, que puede ser un micro-tubo adecuado para contener sangre en una centrifuga o cualquier otro recipiente o instrumento para separación;

50 un reactivo y un instrumento para extraer ADN del plasma, que pueden incluir proteasa, fenol saturado, cloroformo: isoamilol (24:1), acetato sódico, alcohol anhídrido, etanol al 70 %, solución de TE, etc., el ADN en el plasma puede extraerse usando el kit de extracción de ADN producido por Qiagen (número de producto: 57704) y cualquier otro reactivo o recipiente para extraer el ADN;

55 un reactivo y un instrumento para separar el ADN con un método físico según el tamaño de los segmentos de ADN, que puede incluir: polvo de agarosa (Biowest 11860), marcador (marcador de ADN de 100 pb Takara, número de producto: D5050A), etc.; y

un reactivo y un instrumento para secuenciar ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb, que puede incluir una cuchilla para cortar gel de agarosa en un cierto intervalo.

60 Preferentemente, el kit puede incluir un reactivo y un instrumento para amplificar el ADN recuperado de gel de agarosa cortado y prepararlo en una biblioteca de secuenciación.

**Realización 4: Un dispositivo para detectar el número de copias de cromosoma fetal o cromosomas de células tumorales**

Un dispositivo para detectar el número de copias de cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales incluye:

un módulo de detección, que se adapta para secuenciar ADN en una muestra de plasma materno o plasma de paciente con tumor, en el que la secuenciación incluye una etapa de preparar todo el ADN en la muestra de plasma materno o plasma de paciente con tumor en una biblioteca de secuenciación para secuenciar el ADN en la muestra de plasma materno, el módulo de detección puede incluir instrumento cBot de Illumina y Analizador de Genoma o secuenciador HiSeq2000 de Illumina o secuenciador SOLiD de ABI;

un módulo de comparación, que se adapta para comparar un resultado de secuenciación del ADN con un mapa de secuencia genómica para determinar de qué cromosoma viene cada secuencia de ADN y la longitud de secuencia de cada segmento de ADN, el módulo de comparación puede ser la base de datos de secuencias convencionales de genoma humano hg19;

un módulo de cálculo, que se adapta para calcular la proporción del número de segmentos de ADN de los cromosomas para detectar con respecto a todos los segmentos de ADN en la misma muestra, corregir la proporción de acuerdo con un contenido de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar, y calcular la variación de la proporción corregida de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en una muestra para detectar, y determinar el número de copias de los cromosomas para detectar según el grado de variación; y

un módulo de resultado, que se adapta para producir el número de copias de los cromosomas para detectar.

Opcionalmente, el módulo de detección puede detectar todos los segmentos de ADN en la muestra, también pueden detectar solamente todo el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb tal como 150 pb a 175 pb, el módulo de detección puede ser un módulo o un dispositivo para realizar electroforesis en gel de agarosa incluyendo un reactivo y un instrumento para separar el ADN en el plasma materno según el tamaño de segmento de ADN cadena arriba del dispositivo de detección.

Evidentemente, los expertos en la materia deberían entender que algunos módulos o algunas etapas de la invención pueden implementarse mediante dispositivos informáticos generales. Los módulos o las etapas pueden centrarse en un único dispositivo informático, o distribuirse en la red compuesta por múltiples dispositivos informáticos. Opcionalmente, los módulos o las etapas pueden implementarse mediante código de programa ejecutable por dispositivo informático, almacenándolos por lo tanto en un dispositivo de almacenamiento y ejecutándolos mediante dispositivo informático, o implementando los módulos o las etapas introduciéndolos en cada módulo de circuito integrado respectivamente, o introduciendo muchos de los módulos o de las etapas en un único módulo de circuito integrado. De esta manera, la invención no está limitada a la combinación de cualquier hardware y software particular.

Lo anterior es solamente la realización preferida de la invención y no se pretende que limite el alcance de protección de la invención. Para los expertos en la materia, pueden realizarse diversas variaciones y cambios a la invención.

**Referencias:**

1. Cunningham F, *et al.* (2002) In Williams Obstetrics (McGraw-Hill Professional, Nueva York), p. 942.
2. Wapner T, *et al.* (2003) First-trimester screening for trisomies 21 and 18. N Engl J Med, 349: 1405-1414.
3. Lo YM, *et al.* (1997) Presence of fetal DAN in maternal plasma and serum. Lancet, 350: 485-487.
4. Lo YM, *et al.* (2007) Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. Nat Metd, 13: 218-223.
5. Tong YK, *et al.* (2006) Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations. Clin Chem, 52: 2194-2202.
6. Fan HC, Quake SR. (2007) Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. Anal Chem., 79: 7576-7579.
7. Lo YM, *et al.* (2007) Digital PCR for molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. Proc Natl Acad Sci USA, 104: 13116-13121.
8. Bentley DR, *et al.* (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature, 456: 53-59.



9. McKernan KJ, *et al.* (2009) Sequence and structure variation in a human genome uncovered by short-read, massively parallel ligation sequencing using two-base encoding. *Genome Research*, 119: 1527-1541.
- 5 10. Harris TD, *et al.* (2008) Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. *Science*, 320: 106-109.
11. Fan HC, *et al.* (2008) Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 16266-16271.
- 10 12. Chiu RWK, *et al.* (2008) Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 20458-20463.
13. Chiu RWK, *et al.* (2010) Maternal plasma DNA analysis with massively parallel sequencing by ligation for noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Chin Chem*.
- 15 14. Lewis DE, *et al.* (2010) Antigenic approach to the detection and isolation of microparticles associated fetal DNA. PCT, US2010, n.º 025209.
- 20 15. Fan HC, *et al.* (2010) Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by double-end sequencing. *Clin Chem*, 56: 1279-1286.

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo para detectar el número de copias de cromosomas fetales o cromosomas de células tumorales, que comprende:

- 5 un módulo de detección, que se adapta para secuenciar ADN en una muestra de plasma de mujeres embarazadas o plasma de paciente con tumor;
- un módulo de comparación, que se adapta para comparar un resultado de secuenciación del ADN con un mapa de secuencia genómica para determinar de qué cromosoma viene cada secuencia de ADN y la longitud de cada secuencia de ADN;
- 10 un módulo de cálculo, que se adapta para calcular la proporción del número de segmentos de ADN de los cromosomas para detectar con respecto al número total de segmentos de ADN en la misma muestra, y corregir la proporción según un contenido de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar; y calcular la variación de la proporción corregida de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en una muestra para detectar, y determinar el número de copias de los cromosomas para detectar según un grado de variación, en el que el módulo de cálculo corrige la proporción según un contenido de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar según la siguiente función: los contenidos de GC de los segmentos de ADN de cada cromosoma tienen respectivamente relaciones lineales con las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total, y la relación lineal puede representarse mediante  $y=ax+b$ , en la que y representa contenido de GC del segmento de ADN del cromosoma para detectar, x representa la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma para detectar con respecto al ADN total, a y b son constantes, a y b pueden ser valores diferentes para diferentes cromosomas; y
- un módulo de salida, que se adapta para producir el número de copias de los cromosomas para detectar.

2. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que el módulo de cálculo corrige las proporciones de los cromosomas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 18 y X según la siguiente función: los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 18 y X respectivamente tienen relaciones lineales con las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total, la relación lineal puede representarse mediante  $y=ax+b$ , en la que y representa el contenido de GC del segmento de ADN del cromosoma para detectar, x representa la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma para detectar con respecto al ADN total, a y b son constantes, y a es negativo; y preferentemente en el que la relación lineal entre los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 18 y X y las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total se proporciona a continuación:

n.º de cromosoma	Función
2	$Y = -1274,5X + 154,48$
3	$Y = -682,68X + 88,11$
4	$Y = -391,42X + 62,075$
5	$Y = -772,25X + 88,517$
6	$Y = -729,61 X + 84,354$
7	$Y = -2874,7X + 197,28$
8	$Y = -1599,4X + 122,84$
12	$Y = -1936,7X + 129,32$
13	$Y = -827,29X + 67,049$
18	$Y = -1946,4X + 97,323$
X	$Y = -749,77X + 71,33$

3. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que el módulo de cálculo corrige la proporción de los cromosomas 1, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 19, 20, 21 y 22 según la siguiente función: los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas 1, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 19, 20, 21 y 22 respectivamente tienen relaciones lineales con las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total, la relación lineal puede representarse mediante  $y=ax+b$ , en la que y representa el contenido de GC del segmento de ADN del cromosoma para detectar, x representa la proporción del número de los segmentos de ADN del cromosoma para detectar con respecto al ADN total, a y b son constantes, y a es positivo; preferentemente en el que la relación lineal entre los contenidos de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas 1, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 19, 20, 21 y 22 y las proporciones de los segmentos de ADN de cada cromosoma con respecto a los segmentos de ADN total se proporciona a continuación:

n.º de cromosoma	Función
1	$Y = 909,17X - 29,372$
9	$Y = 2211,3X - 45,632$
10	$Y = 1886,8X - 51,026$
11	$Y = 1255X - 15,714$
15	$Y = 1775,8X - 10,124$
16	$Y = 797,17X + 23,883$

n.º de cromosoma	Función
17	$Y = 560,83X + 31,227$
19	$Y = 513,79X + 43,088$
20	$Y = 1006,7X + 22,818$
21	$Y = 7298X - 51,083$
22	$Y = 596,24X + 43,346$

5 4. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que el módulo de cálculo se adapta para calcular la proporción del número de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en todo el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb en la misma muestra con respecto al número total de todos los segmentos de ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb, corregir la proporción según el contenido de GC de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb, y calcular la variación de la proporción corregida de los segmentos de ADN de los cromosomas para detectar en la muestra para detectar, y determinar el número de copias de los cromosomas para detectar según el grado de variación.

15 5. El dispositivo según la reivindicación 4, en el que el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb en la muestra de plasma materno o plasma del paciente con tumor se prepara en una biblioteca de secuenciación; preferentemente en el que el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb es el ADN de 150 pb-170 pb; y más preferentemente en el que el ADN con longitud en cualquier punto o en cualquier intervalo dentro del intervalo de 100 pb a 250 pb es el ADN de 167 pb.

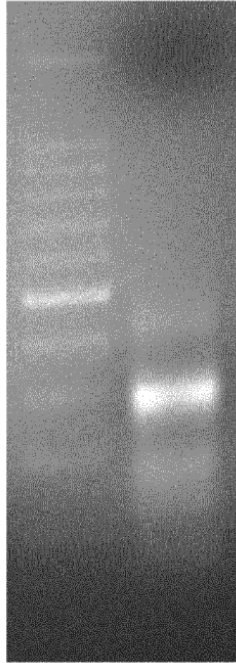


Fig.1

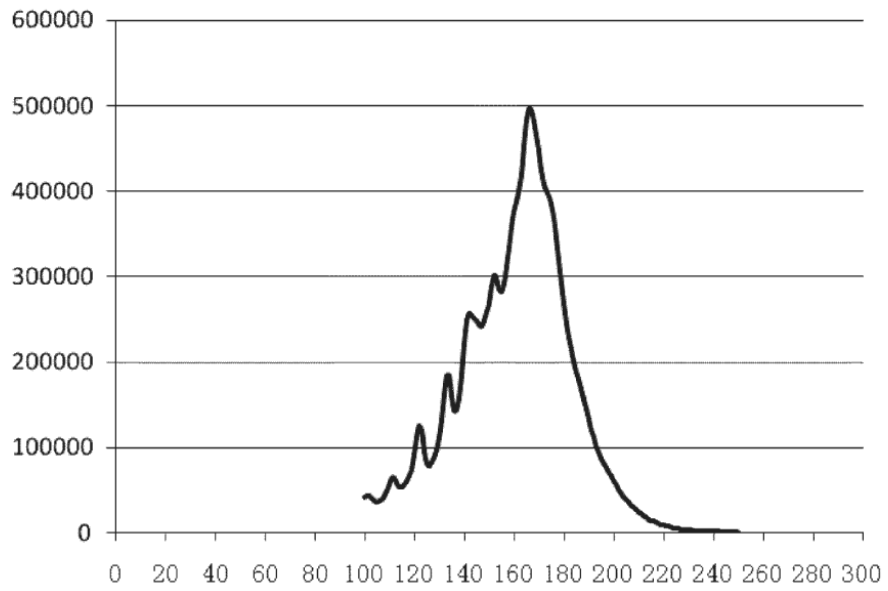


Fig.2

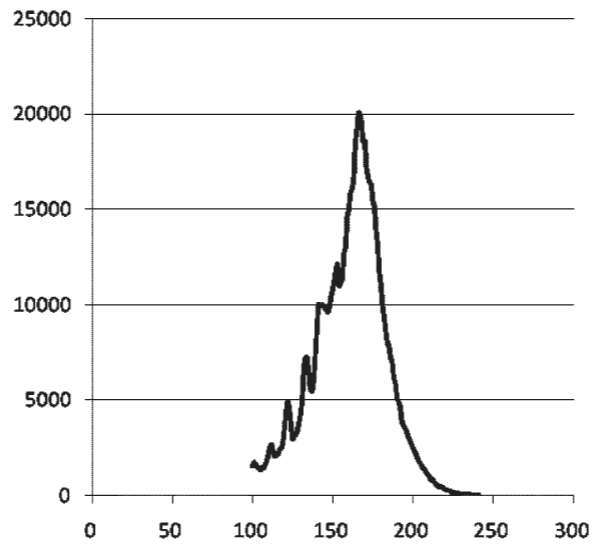


Fig.3

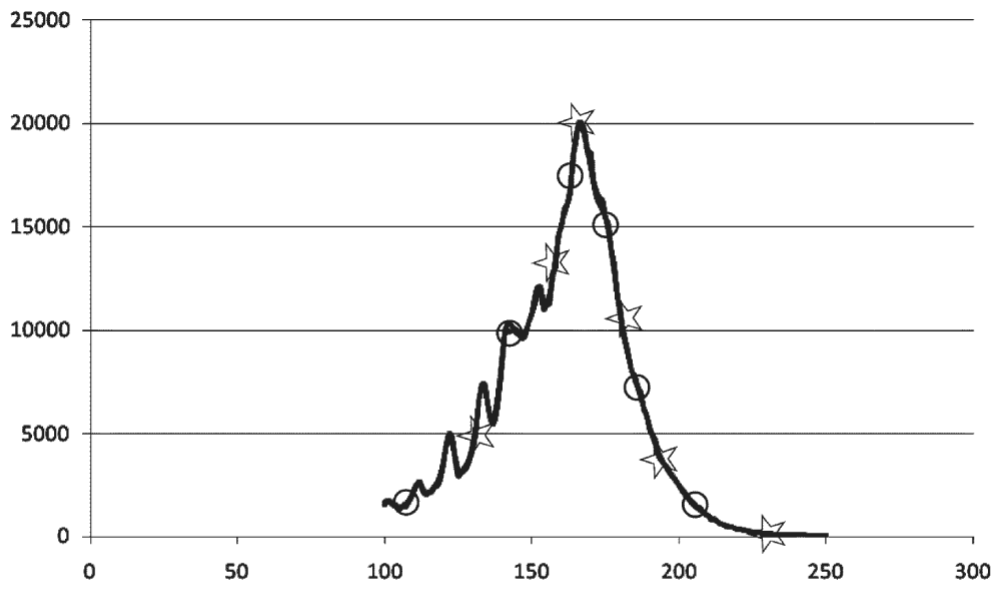


Fig.4

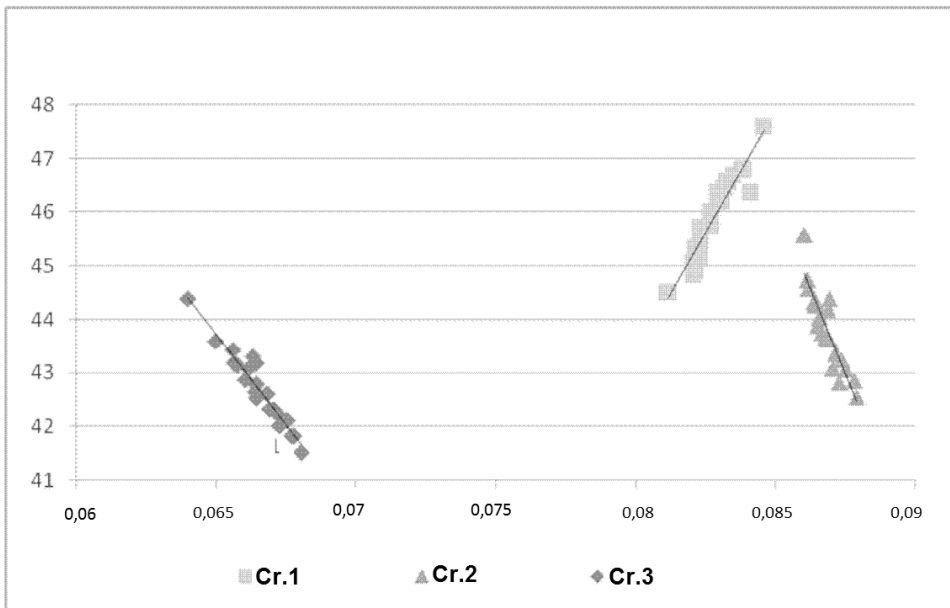


Fig.5A

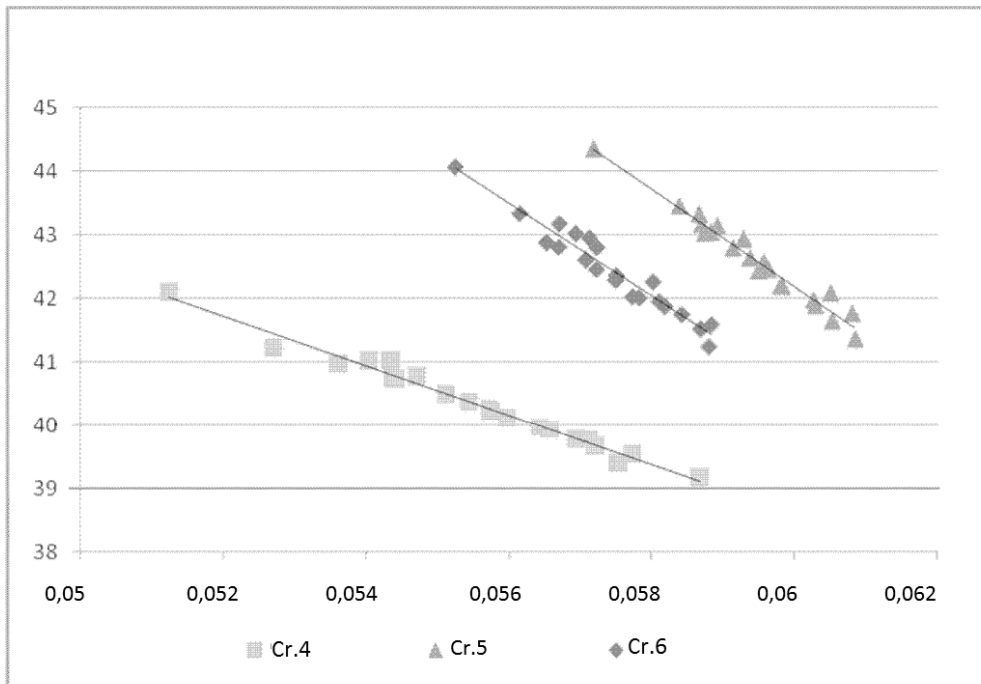


Fig.5B

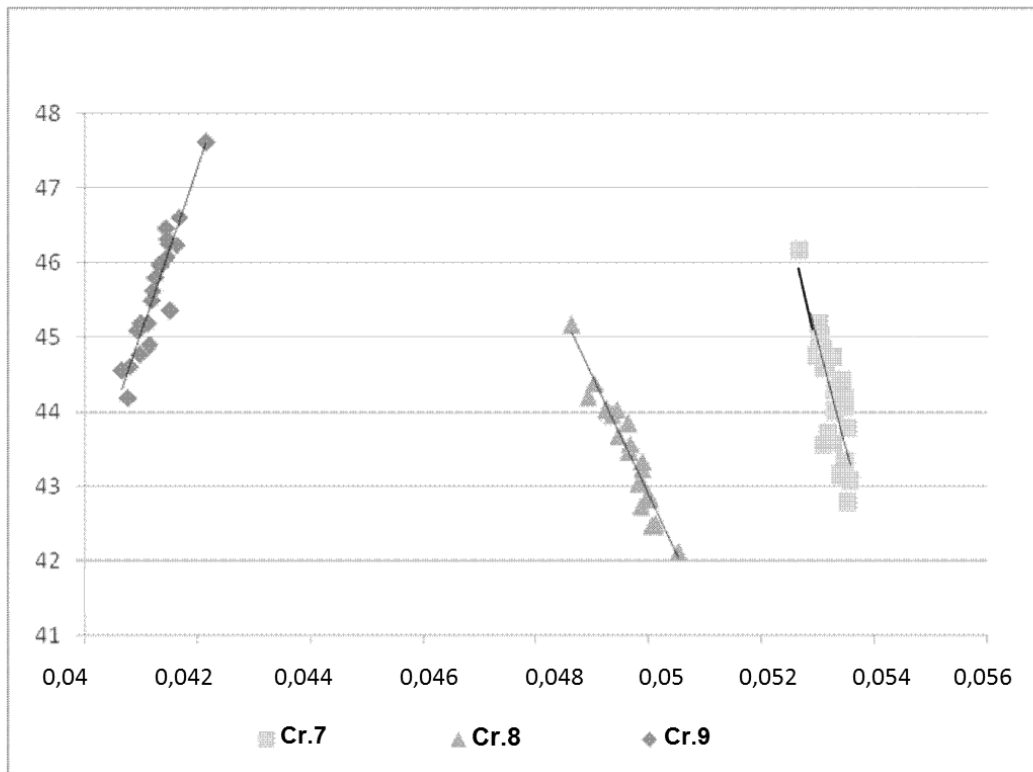


Fig.5C



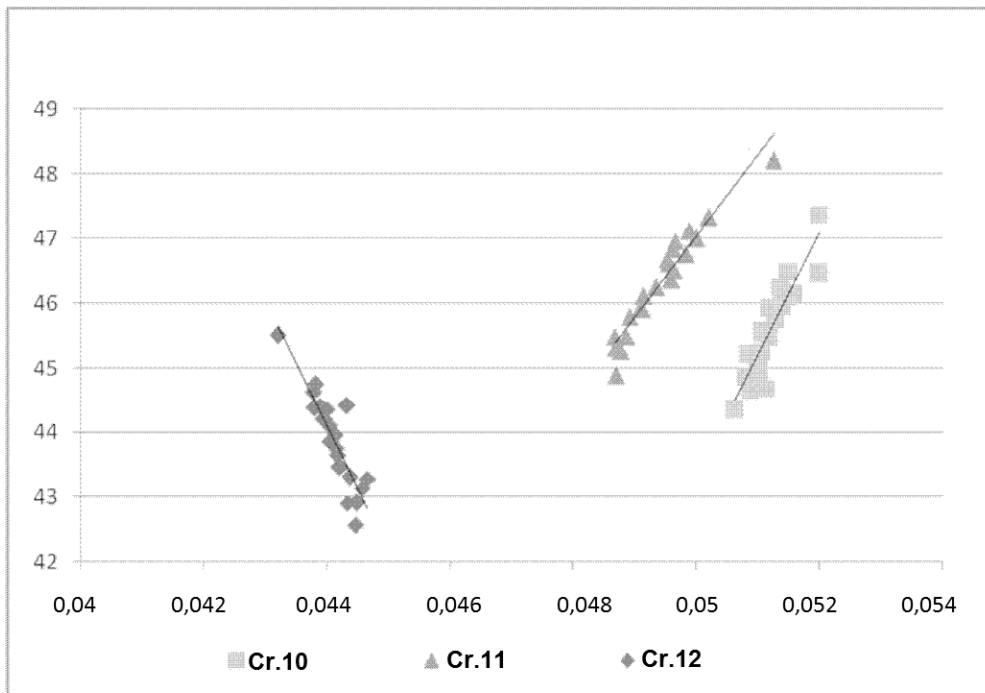


Fig.5D

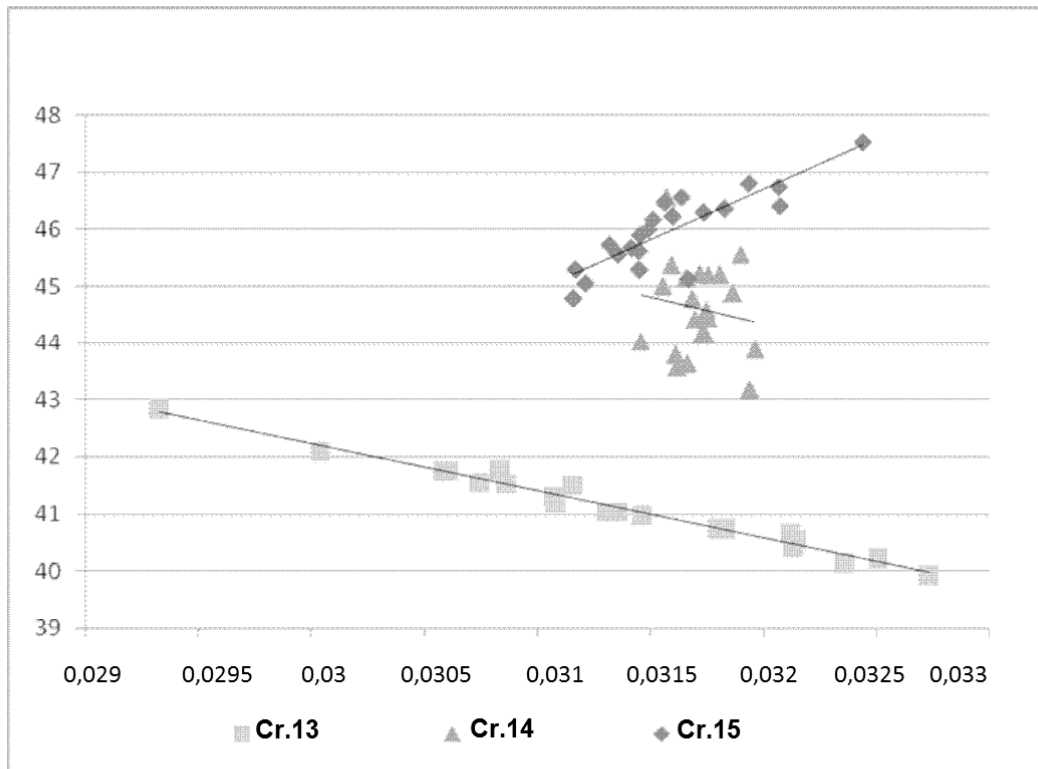


Fig.5E

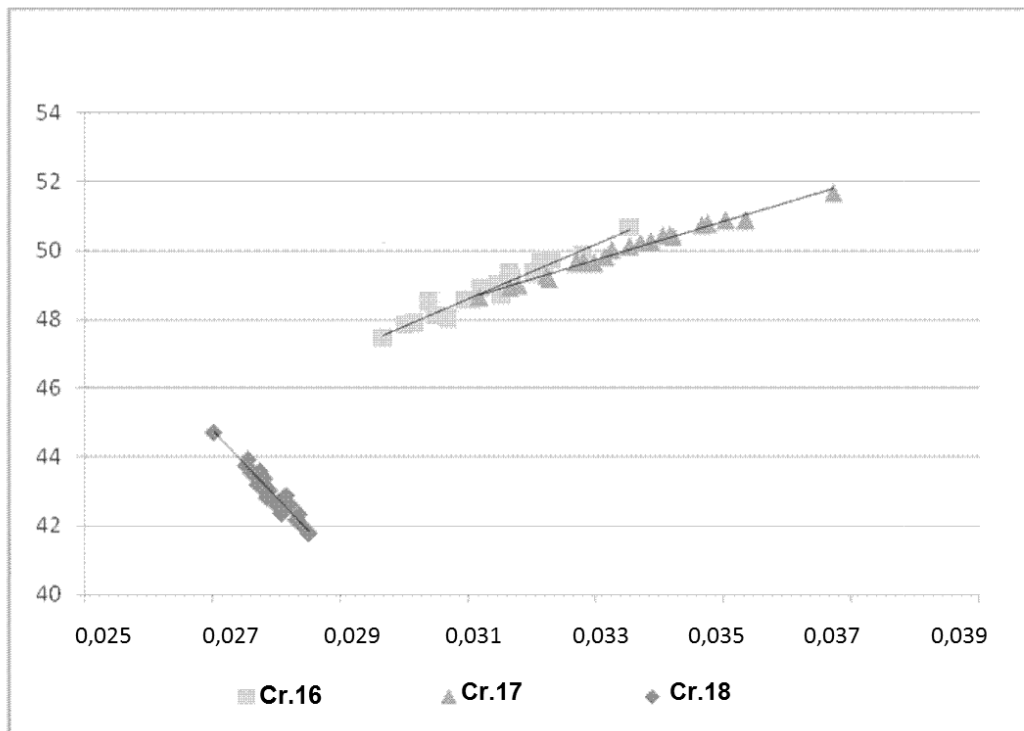


Fig.5F

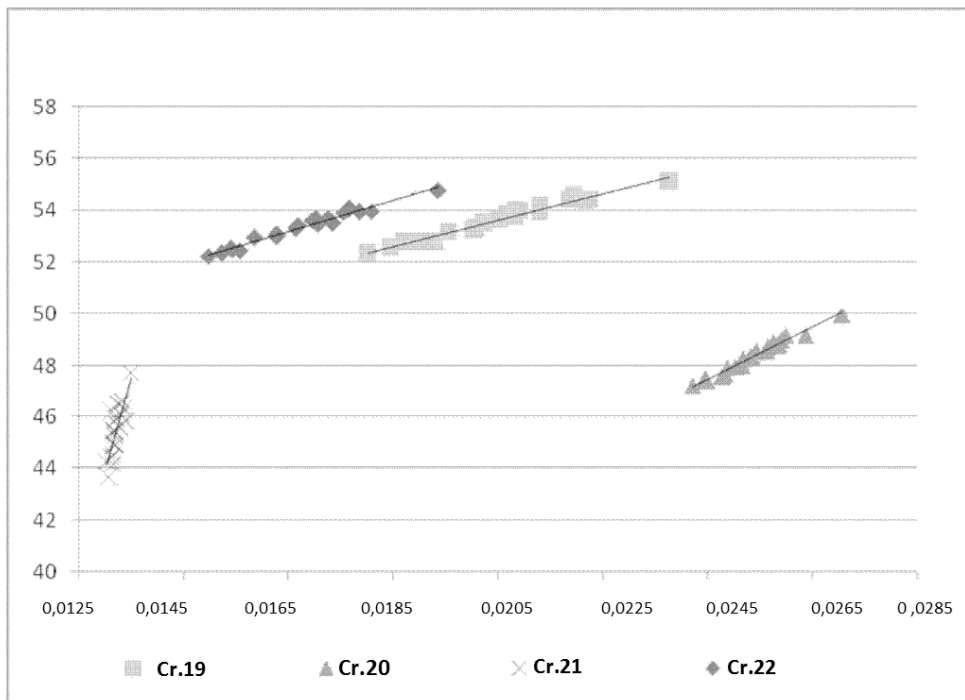


Fig.5G

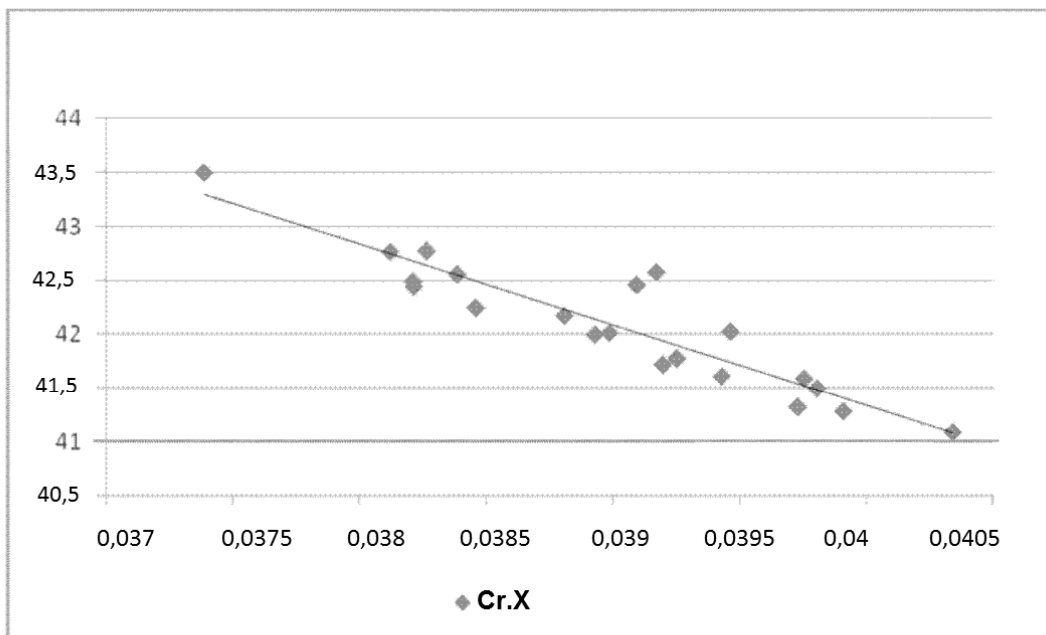


Fig.5H

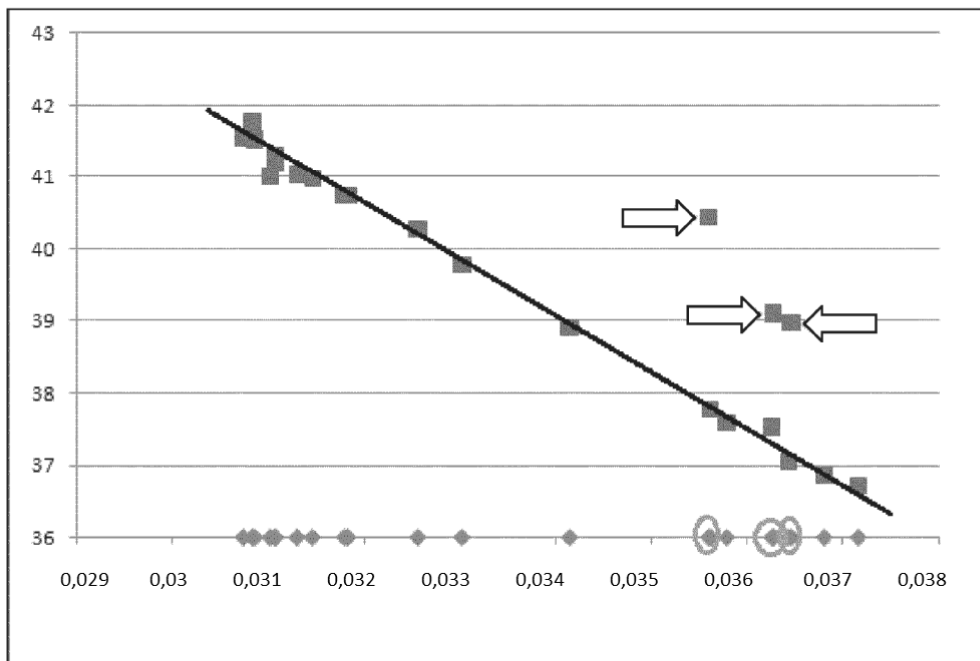


Fig.6

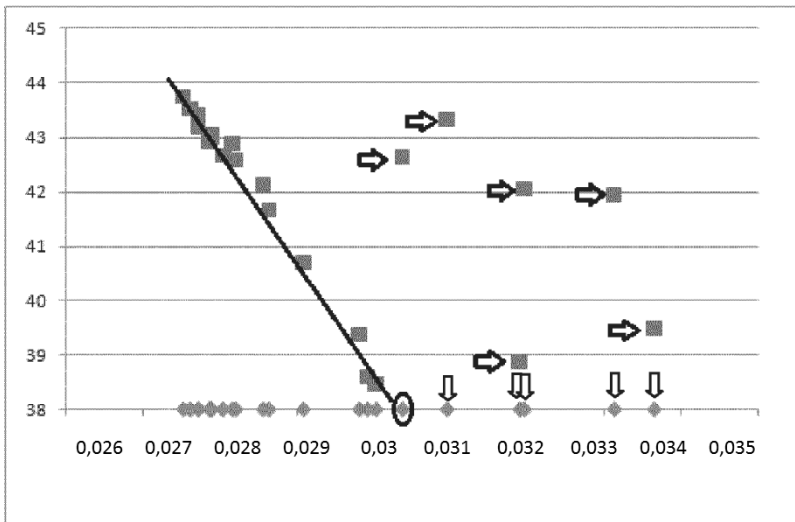


Fig.7

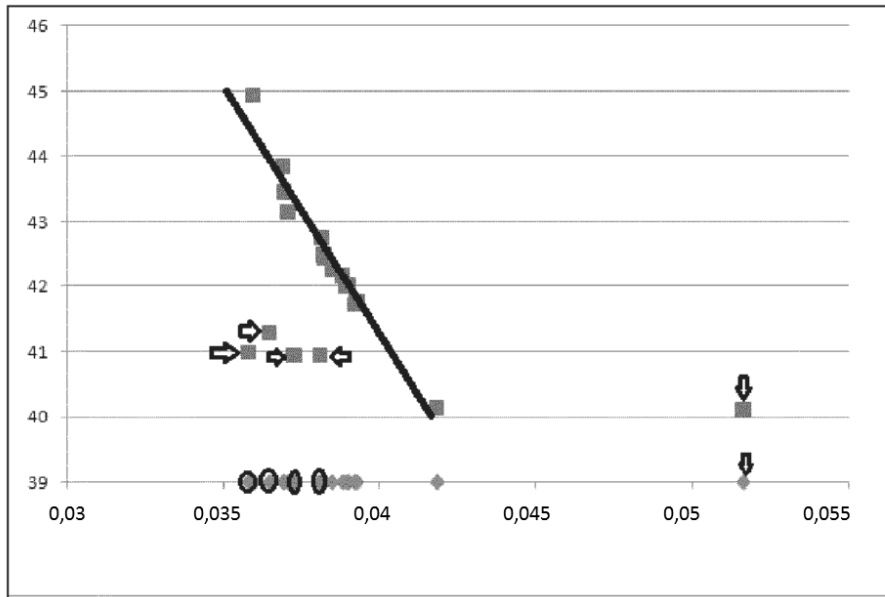


Fig.8



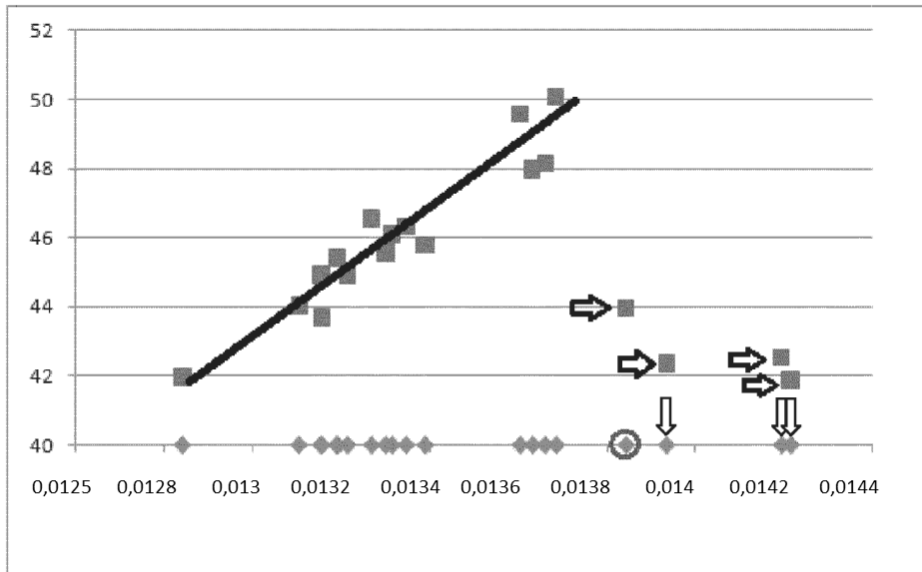


Fig.9A

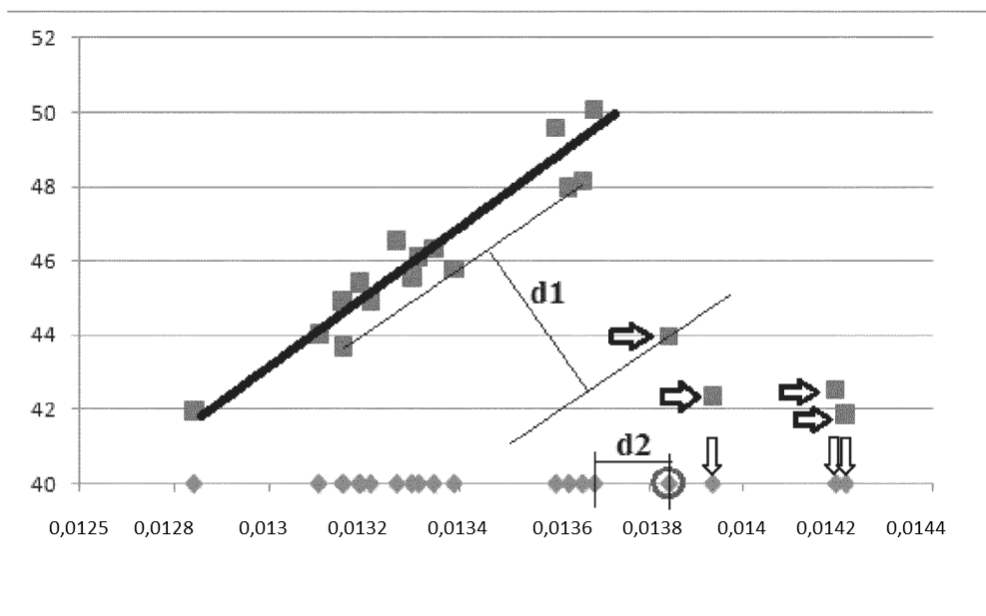


Fig.9B