

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 068**

51 Int. Cl.:

C40B 50/06 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C40B 40/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2014 PCT/CN2014/087589**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016 WO16037389**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2014 E 14901739 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 3191630**

54 Título: **Método para construir una biblioteca de secuenciación con base en una muestra de sangre y uso de la misma para determinar una anomalía genética fetal**

30 Prioridad:

12.09.2014 WO PCT/CN2014/086418

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

18.09.2018

73 Titular/es:

**BGI GENOMICS CO., LIMITED (100.0%)
Floors 7-14, Building No.7 BGI Park, No.21
Hongan 3rd Street Yantian District
Shenzhen Guangdong 518083, CN**

72 Inventor/es:

**ZHANG, YANYAN;
CHEN, FANG;
JIANG, HUI;
GUO, YULAI;
ZENG, PENG;
XU, XUN;
YANG, HUANMING;
BALLINGER, DENNIS G.;
BASHKIROV, VLADIMIR I. y
SETHI, HIMANSHU**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 682 068 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

Método para construir una biblioteca de secuenciación con base en una muestra de sangre y uso de la misma para determinar una anomalía genética fetal

Campo técnico de la invención

5 La presente divulgación se refiere al campo biomédico, particularmente a un método para construir una biblioteca de secuenciación a partir de fragmentos de ADN y su uso, más particularmente a un método de preparación de una biblioteca para secuenciación con base en una muestra de sangre, un método de secuenciación de un nucleico ácido, un método para determinar una anomalía genética fetal que es una aneuploidía cromosómica en una muestra de sangre obtenida de una mujer embarazada, un aparato para preparar una biblioteca para la secuenciación con base en una muestra de sangre, un montaje para secuenciar un ácido nucleico y un sistema para determinar una anomalía genética fetal que es una aneuploidía cromosómica en una muestra de sangre obtenida de una mujer embarazada.

Antecedentes

15 La aneuploidía cromosómica se relaciona estrechamente con algunas enfermedades genéticas humanas. El síndrome de Down es una de las aneuploidías cromosómicas más comunes, que se presenta en 1 en 1.000 casos, que se presenta como resultado de tener un cromosoma 21 adicional. El síndrome de trisomía 13 y el síndrome de trisomía 18 son causados por tener un cromosoma 13 adicional y un cromosoma 18 adicional, respectivamente, que produce aborto involuntario, etc. La aneuploidía autosómica es otra razón importante que resulta en la falla del embarazo y aborto involuntario. Las anomalías cromosómicas sexuales pueden causar un desarrollo sexual anormal. Un individuo masculino con un cromosoma X adicional (47, XXY) padece el síndrome de Klinefelter. El síndrome de Turner, también conocido como síndrome de disgenesia ovárica congénita, es causado por la ausencia de un cromosoma sexual completo con un cariotipo 45, X.

La secuenciación de alto rendimiento es muy útil en la detección de aneuploidía cromosómica. Sin embargo, aún es necesario mejorar los medios para preparar una biblioteca para la secuencia.

Resumen

25 La presente divulgación está dirigida a resolver al menos uno de los problemas existentes en la técnica anterior. Para este propósito, se proporcionan un método de preparación de una biblioteca para la secuenciación con base en una muestra de sangre, un método para secuenciar un ácido nucleico, un método para determinar una anomalía genética fetal que es una aneuploidía cromosómica en una muestra de sangre obtenida de una mujer embarazada, un aparato para preparar una biblioteca para la secuenciación con base en una muestra de sangre, un montaje para secuenciar un ácido nucleico y un sistema para determinar una anomalía genética fetal que es una aneuploidía cromosómica en una muestra de sangre obtenida de una mujer embarazada.

35 En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para preparar una biblioteca para secuenciación con base en una muestra de sangre. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona así un método para preparar una biblioteca para secuenciación usando una muestra de ADN a partir de muestras de sangre que comprende:

- (a) aislar una muestra de ADN de la muestra de sangre,
- (b) desfosforilación de la muestra de ADN para obtener un producto de fragmentación desfosforilado, y
- (c) someter los fragmentos de ADN desfosforilados de dicho producto de fragmentación a las siguientes etapas para obtener una biblioteca de ADN cíclicos para secuenciación:

40 (i) reparación final para obtener un fragmento de ADN de cadena doble que tiene dos extremos romos con cuatro nucleótidos terminales que carecen cada uno de un grupo fosfato;

45 (ii) ligar un primer adaptador y un segundo adaptador que son diferentes entre sí con el fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en los dos extremos romos en una reacción de una etapa para obtener un primer producto de ligación, siendo cada uno del primer adaptador y el segundo adaptador un oligonucleótido aislado que comprende: una primera cadena que tiene un grupo fosfato en el extremo 5' y un didesoxinucleótido en el extremo 3' y una segunda cadena que carece de un grupo fosfato en el extremo 5' y que tiene un didesoxinucleótido en el extremo 3', teniendo dicha primera cadena una longitud mayor que la de dicha segunda cadena y formando la primera y segunda cadena una estructura de cadena doble,

50 (iii) reemplazar la segunda cadena del primer adaptador con un primer ADN de cadena sencilla y reemplazar la segunda cadena del segundo adaptador con un segundo ADN de cadena sencilla, seguido por una reacción de traslado de muesca obteniendo así un segundo producto de ligación, estando el primer ADN de cadena sencilla adaptado para formar una estructura de cadena doble con la primera cadena del primer adaptador, y estando el segundo ADN de cadena sencilla adaptado para formar una estructura de cadena doble con la primera cadena del segundo adaptador,

5 (iv) amplificar el segundo producto de ligación usando un primer cebador y un segundo cebador para obtener un fragmento amplificado de ADN de doble cadena, en donde el primer cebador comprende una secuencia idéntica a uno de dicho primer ADN de cadena sencilla y dicho segundo ADN de cadena sencilla y el segundo cebador comprende una secuencia idéntica a la otra de dicho primer ADN de cadena sencilla y dicho segundo ADN de cadena sencilla y posee una biotina adicional;

(v) aislar un fragmento de ADN de cadena sencilla que contiene biotina de dicho ADN de cadena doble amplificado y

(vi) ciclar el fragmento aislado de ADN de cadena sencilla.

10 Los inventores de la presente divulgación encontraron sorprendentemente que debido a que el primer y segundo adaptadores tienen cada uno un didesoxinucleótido en el nucleótido del extremo 3' de la primera cadena y los fragmentos de ADN de cadena doble formados como en la etapa (i) anterior tienen dos extremos romos con cuatro nucleótidos terminales que carecen cada uno de un grupo fosfato, no se producirá ligación entre los adaptadores y la ligación entre los fragmentos de ADN de cadena doble. Por lo tanto, la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuencia se mejorará significativamente.

15 De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, la muestra de sangre es una muestra de plasma. Además, de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, la muestra de ADN es una muestra de ácido nucleico circulante. La longitud del ácido nucleico circulante es de aproximadamente 100 a 200 pb, que se puede usar para preparar la biblioteca de ADN directamente. De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, la muestra de ADN es una muestra de ADN genómico aislada de un glóbulo rojo nucleado, y la muestra de ADN genómico se fragmenta antes de la etapa de desfosforilación para obtener fragmentos de ADN con una longitud de aproximadamente 100 pb a aproximadamente 200 pb.

20 De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, cada uno de los adaptadores primero y segundo comprende independientemente:

un primer extremo sobresaliente ubicado en el extremo 3' de la primera cadena, y

25 un segundo extremo sobresaliente opcional ubicado en el extremo 5' de la primera cadena. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.

30 De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, en cada uno de los adaptadores primero y segundo, el primer extremo sobresaliente tiene una longitud mayor que la del segundo primer extremo sobresaliente. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.

De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, en cada uno de los adaptadores primero y segundo, la longitud del primer extremo sobresaliente es de aproximadamente 6 nt a 12 nt. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.

35 De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, en cada uno de los adaptadores primero y segundo, la longitud del segundo extremo sobresaliente es aproximadamente 0 nt a 4 nt. Los inventores encontraron sorprendentemente que mediante el uso de esta característica técnica, la eficacia de preparación de la biblioteca para la secuenciación se mejorará significativamente.

40 De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, en cada uno de los adaptadores primero y segundo, la longitud de la primera cadena es de aproximadamente 20 nt a 25 nt. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.

45 De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, en cada uno de los adaptadores primero y segundo, la longitud de la segunda cadena es de aproximadamente 10 nt a 15 nt. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.

50 Como se indicó anteriormente, la etapa de ligar el primer adaptador y el segundo adaptador con fragmentos de ADN de cadena doble se realiza en una reacción de una etapa. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.

De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, la estructura de cadena doble formada por el primer ADN de cadena sencilla y la primera cadena del primer adaptador tiene una longitud mayor que la de la estructura de cadena doble formada por la primera cadena y la segunda cadena en el primer adaptador, y

la estructura de cadena doble formada por el segundo ADN de cadena sencilla y la primera cadena del segundo

- adaptador tiene una longitud mayor que la de la estructura de cadena doble formada por la primera cadena y la segunda cadena en el segundo adaptador. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.
- 5 De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, la primera cadena del primer adaptador comprende una secuencia de 5' AAGTCGGAGGCCAAGCGGTCGT 3',
- la segunda cadena del primer adaptador comprende una secuencia de 5' TTGGCCTCCGACT 3',
- la primera cadena del segundo adaptador comprende una secuencia de 5' GTCTCCAGTCGAAGCCCCGACG 3',
- la segunda cadena del segundo adaptador comprende una secuencia de 5' GCTTCGACTGGAGA 3',
- 10 el primer ADN de cadena sencilla comprende una secuencia de 5' TCCTAAGACCGCTTGGCCTCCG 3', y el segundo ADN de cadena sencilla comprende una secuencia de 5' AGACAAGCTC(N)_mGATCGGGCTTCGACGGAG 3', en la que el motivo (N)_m representa una secuencia índice que comprende m nucleótidos, m es cualquier número entero en el intervalo de 4 nt a 10 nt, N = A, T, G o C, y
- 15 el ADN de cadena sencilla empleado para ciclación comprende una secuencia de 5' TCGAGCTTGTCTTCCTAAGACCGC 3'. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.
- De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, la etapa de reemplazar la segunda cadena del primer adaptador con el primer ADN de cadena sencilla y reemplazar la segunda cadena del segundo adaptador con el segundo ADN de cadena sencilla se realiza por medio de lisis térmica e hibridación. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.
- 20 Además, de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, la lisis térmica se realiza a una temperatura de aproximadamente 60 grados Celsius. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.
- 25 Como se indicó anteriormente, la etapa de ligar el primer ADN de cadena sencilla y el segundo ADN de cadena sencilla con el ADN de cadena doble respectivamente en los dos extremos romos se realiza por medio de una reacción de traslado de muesca. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.
- 30 De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, la etapa de aislamiento del fragmento de ADN de cadena sencilla que contiene biotina del fragmento amplificado de ADN de doble cadena comprende además las etapas de:
- poner en contacto el fragmento amplificado de ADN de doble cadena con una perla magnética para formar un compuesto de perla-ADN, con la perla magnética que tiene una estreptavidina unida a la misma, y
- 35 poner en contacto el compuesto de perla-ADN con una solución que tiene un pH superior a 7 para obtener el fragmento de ADN de cadena sencilla que contiene biotina. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.
- 40 Además, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, la solución que tiene un pH mayor que 7 comprende NaOH. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.
- De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, la concentración de NaOH en la solución es de aproximadamente 0,5 M hasta aproximadamente 2 M. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.
- 45 Además, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, la concentración de NaOH en la solución es aproximadamente 1 M. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.
- 50 Un método de la invención puede comprender además una etapa de selección del fragmento amplificado de ADN de doble cadena antes de la etapa de aislamiento del fragmento de ADN de cadena sencilla que contiene la biotina. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.

Además, de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, la selección se realiza poniendo en contacto el fragmento amplificado de ADN de doble cadena con una sonda específica para una secuencia predeterminada. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.

5 De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, la secuencia predeterminada comprende al menos un exón. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.

10 La sonda puede proporcionarse en forma de un microarreglo. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.

De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, la etapa de ciclación del fragmento aislado de ADN de cadena sencilla que contiene biotina se realiza usando una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla que comprende:

15 una primera sección adaptada para coincidir con cualquiera de una secuencia que comprende el nucleótido terminal 5' o una secuencia que comprende el nucleótido terminal 3' en dicho fragmento aislado de ADN de cadena sencilla que contiene biotina, y

20 una segunda sección adaptada para coincidir con la otra de una secuencia que comprende el nucleótido terminal 5' o el nucleótido terminal 3' en dicho fragmento aislado de ADN de cadena sencilla que contiene biotina. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.

25 De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, la primera sección y la segunda sección están unidas entre sí de manera adyacente, por ejemplo, el ácido nucleico de cadena sencilla empleado para ciclación comprende la secuencia 5' TCGAGCTTGCTTCCTAAGACCGC 3' como se discutió anteriormente. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mediante el uso de esta característica técnica, se mejorará significativamente la eficiencia de la preparación de la biblioteca para la secuenciación.

En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método de secuenciación de un ácido nucleico, que comprende las etapas de:

30 preparar una biblioteca para secuenciación que contiene dicho ácido nucleico de acuerdo con un método de la invención como se describió anteriormente, y
secuenciación de la biblioteca.

De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, la etapa de secuenciación se lleva a cabo usando una plataforma de secuenciación de CG.

En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para determinar una anomalía genética fetal que es una aneuploidía cromosómica en una muestra de sangre obtenida de una mujer embarazada, que comprende:

35 (a) secuenciar al menos una porción de una pluralidad de las moléculas de ácido nucleico contenidas en la muestra de sangre para obtener un resultado de secuenciación de acuerdo con el método descrito anteriormente;

(b) alinear el resultado de secuenciación obtenido en la etapa (a) con una secuencia de genoma humano de referencia para obtener un grupo de lecturas alineado;

40 (c) determinar el número total de lecturas contenidas en el grupo de lecturas alineadas obtenido en la etapa (b), para obtener un valor de M;

(d) con base en el grupo de lecturas alineadas obtenido en la etapa (b), determinar el número de lecturas que se originan en un cromosoma i , para obtener un valor de N_i , en el que i representa un número de cromosoma;

(e) con base en los valores M y N_i , determinar un parámetro que representa un porcentaje relativo del cromosoma i , para obtener un parámetro R; y

45 (f) con base en el parámetro R, determinar si una anomalía genética fetal está presente para el cromosoma i .

Usando el método anterior, puede detectarse de forma efectiva una aneuploidía cromosómica.

De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, la lectura tiene una longitud que varía de aproximadamente 12 pb a 21 pb.

De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, el grupo de lecturas alineadas consiste en lecturas

alineadas de forma única. Sorprendentemente, los inventores encontraron que mediante el uso de esta característica técnica, la eficacia de detección de una aneuploidía cromosómica mejorará significativamente.

De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, en la etapa (f), el parámetro R es la relación de N_i/M. Sorprendentemente, los inventores encontraron que mediante el uso de esta característica técnica, la eficacia de detección de una aneuploidía cromosómica mejorará significativamente.

De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, la etapa (f) comprende además:

obtener un valor Z con base en la ecuación de

$$Z_i = (R_{i,j} - \text{media}_i) / sd_i,$$

en la cual

$$\text{media}_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n R_{i,j},$$

$$sd_i = \sqrt{\frac{1}{n-1} (R_{i,j} - \text{media}_i)^2}$$

j representa el número de muestra, n representa el número total de las muestras; y

la comparación del valor Z con un primer valor preestablecido y un segundo valor preestablecido. Sorprendentemente, los inventores encontraron que mediante el uso de esta característica técnica, la eficacia de detección de una aneuploidía cromosómica mejorará significativamente.

De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, el primer valor preestablecido y el segundo valor preestablecido se determinan usando una pluralidad de muestras conocidas. Sorprendentemente, los inventores encontraron que mediante el uso de esta característica técnica, la eficacia de detección de una aneuploidía cromosómica mejorará significativamente.

De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, el primer valor preestablecido no es mayor a -3. Sorprendentemente, los inventores encontraron que mediante el uso de esta característica técnica, la eficacia de detección de una aneuploidía cromosómica mejorará significativamente.

De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, el segundo valor preestablecido es al menos +3. Sorprendentemente, los inventores encontraron que mediante el uso de esta característica técnica, la eficacia de detección de una aneuploidía cromosómica mejorará significativamente.

De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, un valor Z menor que el primer valor preestablecido es una indicación de la presencia de un cromosoma i adicional en la muestra, y un valor Z mayor que el segundo valor preestablecido es una indicación de la ausencia de un cromosoma i en la muestra. Sorprendentemente, los inventores encontraron que mediante el uso de esta característica técnica, la eficacia de detección de una aneuploidía cromosómica mejorará significativamente.

La presente divulgación también proporciona un aparato para realizar el método descrito anteriormente.

En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un aparato para preparar una biblioteca para la secuenciación con base en una muestra de sangre y de acuerdo con la invención, que comprende:

(a) una unidad de aislamiento de una muestra de ADN adaptada para aislar una muestra de ADN de la muestra de sangre;

(b) una unidad de desfosforilación adaptada para desfosforilar la muestra de ADN para obtener un producto de fragmentación desfosforilado;

(c) una unidad de reparación final adaptada para reparar el extremo del producto de fragmentación desfosforilado para obtener un fragmento de ADN de cadena doble, con el fragmento de ADN de cadena doble que tiene dos extremos romos con cuatro nucleótidos terminales que carecen cada uno de grupo fosfato;

(d) una primera unidad de ligación adaptada para ligar un primer adaptador y un segundo adaptador que son diferentes entre sí con el fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en los dos extremos romos, para obtener un primer producto de ligación, con cada uno del primer adaptador y siendo el segundo adaptador un oligonucleótido aislado que comprende: una primera cadena que tiene un grupo fosfato en el extremo 5' y un didesoxinucleótido en el nucleótido del extremo 3' y una segunda cadena que carece de un grupo fosfato en el extremo 5' y que tiene un didesoxinucleótido en el nucleótido del extremo 3', teniendo dicha primera cadena una longitud mayor que la de dicha segunda cadena y estando la primera y la segunda cadenas formadas en una estructura de doble cadena,

5 (e) una unidad de reemplazo de cadena y de traslado de muesca adaptada para reemplazar la segunda cadena del primer adaptador con un primer ADN de cadena sencilla y reemplazar la segunda cadena del segundo adaptador con un segundo ADN de cadena sencilla seguido de una reacción de traslado de muesca obteniendo así un segundo producto de ligación con el primer ADN de cadena sencilla que se adapta para formar una estructura de cadena doble con la primera cadena del primer adaptador, y el segundo ADN de cadena sencilla se adapta para formar una estructura de cadena doble con la primera cadena del segundo adaptador,

10 (f) una unidad de amplificación adaptada para amplificar el segundo producto de ligación usando un primer cebador y un segundo cebador para obtener un producto de amplificación, en el que el primer cebador comprende una secuencia idéntica a uno de dicho primer ADN de cadena sencilla y dicho segundo ADN de cadena sencilla y el segundo cebador comprende una secuencia idéntica a la de otra de dicho primer ADN de cadena sencilla y dicho segundo ADN de cadena sencilla y posee una biotina adicional y el producto de amplificación es un fragmento amplificado de ADN de doble cadena;

(g) una unidad de aislamiento de ADN de cadena sencilla adaptada para aislar un fragmento de ADN de cadena sencilla que contiene la biotina del fragmento amplificado de ADN de doble cadena y

15 (h) una unidad de ciclación adaptada para ciclar el fragmento aislado de ADN de cadena sencilla mediante el cual se puede formar una biblioteca de ADN cíclicos para secuenciación.

20 Los inventores encontraron sorprendentemente que mediante el uso de esta característica técnica, la eficacia de detección de una aneuploidía cromosómica mejorará significativamente. La unidad de reemplazo de cadena está adaptada para reemplazar la segunda cadena del primer adaptador con el primer ADN de cadena sencilla y reemplazar la segunda cadena del segundo adaptador con el segundo ADN de cadena sencilla por medio de lisis térmica e hibridación.

De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, la unidad de aislamiento de ADN de cadena sencilla está adaptada para realizar las etapas de:

25 poner en contacto el fragmento amplificado de ADN de doble cadena con una perla magnética para formar un compuesto de perla-ADN, teniendo la perla magnética una estreptavidina unida a la misma, y

poner en contacto el compuesto de perla-ADN con una solución que tiene un pH superior a 7 para obtener el fragmento de ADN de cadena sencilla que contiene biotina.

30 De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, la muestra de sangre es una muestra de plasma, opcionalmente, la muestra de ADN es una muestra de ácido nucleico circulante. De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, la muestra de ADN es una muestra de ADN genómico aislado de un glóbulo rojo nucleado y el aparato comprende además una unidad de fragmentación adaptada para fragmentar el ADN para obtener fragmentos de ADN con una longitud de aproximadamente 100 pb hasta aproximadamente 200 pb.

35 Un aparato de acuerdo con la invención como se describió anteriormente puede comprender además una unidad de selección adaptada para realizar una etapa de selección del fragmento amplificado de ADN de doble cadena antes de la etapa de aislamiento del fragmento de ADN de cadena sencilla que contiene la biotina.

De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, la selección se realiza poniendo en contacto el fragmento amplificado de ADN de doble cadena con una sonda específica para una secuencia predeterminada.

40 De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, la unidad de ciclación está adaptada para ciclar el fragmento aislado de ADN de cadena sencilla usando una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla, que comprende:

una primera sección adaptada para coincidir con una secuencia que comprende el nucleótido terminal 5' o una secuencia que comprende el nucleótido terminal 3' en dicho fragmento aislado de ADN de cadena sencilla que contiene biotina, y

45 una segunda sección adaptada para coincidir con la otra secuencia que comprende el nucleótido terminal 5' o el nucleótido terminal 3' en dicho fragmento aislado de ADN de cadena sencilla que contiene biotina.

En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un montaje para secuenciar un ácido nucleico, que comprende:

un aparato para preparar una biblioteca para la secuenciación con base en una muestra de sangre como se describió anteriormente, y

50 un aparato de secuenciación adaptado para secuenciar la biblioteca.

De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, el aparato de secuenciación es una plataforma de secuenciación de CG.

En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un sistema para determinar una anomalía genética fetal que es una aneuploidía cromosómica en una muestra de sangre obtenida de una mujer embarazada, que comprende:

un montaje mencionado anteriormente adaptado para secuenciar al menos una porción de una pluralidad de las moléculas de ácido nucleico contenidas en la muestra de sangre para obtener un resultado de secuenciación;

5 un montaje adaptado para analizar el resultado de la secuencia de acuerdo con las siguientes etapas de:

alinearse el resultado de la secuenciación con una secuencia del genoma humano de referencia para obtener un grupo de lecturas alineadas;

determinar el número total de lecturas contenidas en el grupo de lecturas alineadas para obtener un valor de M;

10 con base en el grupo de lecturas alineadas, determinar el número de lecturas que se originan en un cromosoma i , para obtener un valor de N_i , en el que i representa un número de cromosoma,

con base en los valores M y N_i , determinar un parámetro que representa el porcentaje relativo del cromosoma i , para obtener un parámetro R; y

con base en el parámetro R, determinar si una anomalía genética fetal está presente para el cromosoma i .

15 De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, la lectura tiene una longitud que varía de aproximadamente 12 pb a 21 pb.

De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, el grupo de lecturas alineadas consiste en lecturas alineadas de manera única.

De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, el parámetro R es la relación de N_i/M . De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, las etapas comprenden además:

20 obtener un valor Z con base en la ecuación de

$$Z_i = (R_{i,j} - \text{media}_i) / sd_i,$$

en la que,

$$\text{media}_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n R_{i,j},$$

$$sd_i = \sqrt{\frac{1}{n-1} (R_{i,j} - \text{media}_i)^2}$$

25 j representa el número de muestra, n representa el número total de las muestras; y

comparar el valor Z con un primer valor preestablecido y un segundo valor preestablecido.

De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, el primer valor preestablecido y el segundo valor preestablecido se determinan usando una pluralidad de muestras conocidas.

30 De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, el primer valor preestablecido no es mayor a -3. De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, el segundo valor preestablecido es al menos +3.

De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, un valor Z menor que el primer valor preestablecido es una indicación de la presencia de un cromosoma i adicional en la muestra, y un valor Z mayor que el segundo valor preestablecido es una indicación de la ausencia de un cromosoma i en la muestra.

Las soluciones técnicas de la presente divulgación pueden lograr las siguientes ventajas:

35 La anomalía genética fetal de una aneuploidía cromosómica puede detectarse utilizando muestras de sangre, por ejemplo, una muestra de sangre de 1 mL, incluso en tan solo 9 semanas de gestación. Además, de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, se pueden analizar de aproximadamente 3.000 hasta aproximadamente 5.000 muestras a la vez.

40 Se proporcionarán en parte aspectos y ventajas adicionales de las realizaciones de la presente divulgación en las siguientes descripciones, que se harán evidentes en parte a partir de las siguientes descripciones, o se aprenderán de la práctica de las realizaciones de la presente divulgación.

Descripción detallada

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

5 Además, los términos tales como "primero" y "segundo" se usan en el presente documento para fines de descripción y no están destinados a indicar o implicar importancia relativa o significado. Por lo tanto, las características restringidas con "primero", "segundo" pueden comprender explícita o implícitamente una o más de las características. Además, en la descripción de la presente divulgación, a menos que se indique lo contrario, el término "una pluralidad de" se refiere a dos o más. El término "aneuploidía" utilizado aquí es un término relacionado con euploidía de un cromosoma, se refiere a uno o más cromosomas faltantes o adicionales en el genoma. En general, existen dos cromosomas de cada tipo en las células normales. Sin embargo, un gameto que tiene un número anormal de cromosomas formados mediante segregación o sin segregación de un par de cromosomas homólogos por anticipado durante la fase de meiosis, generará una variedad de células aneuploides cuando los gametos mencionados anteriormente se combinan entre sí o se combinan con un gameto normal. Además, las células aneuploides también se generarán durante la división celular somática, tal como una célula tumoral con una alta tasa de aberración, etc.

15 Ejemplo

A menos que se indique lo contrario, los siguientes ácidos nucleicos se usan en el ejemplo:

la primera cadena del primer adaptador comprende una secuencia de 5' AAGTCGGAGGCCAAGCGGTCGT 3',

la segunda cadena del primer adaptador comprende una secuencia de 5' TTGGCCTCCGACT 3',

la primera cadena del segundo adaptador comprende una secuencia de 5' GTCTCCAGTCGAAGCCCCGACG 3',

20 la segunda cadena del segundo adaptador comprende una secuencia de 5' GCTTCGACTGGAGA 3',

el primer ADN de cadena sencilla comprende una secuencia de 5' TCCTAAGACCGCTTGGCCTCCG 3', y el segundo ADN de cadena sencilla comprende una secuencia de 5' AGACAAGCTC(N)_mGATCGGGCTTCGACGGAG 3', en la que el motivo (N)_m representa una secuencia índice que comprende m nucleótidos, m es cualquier número entero en el intervalo de 4 nt a 10 nt, N = A, T, G o C, y el ácido nucleico para la etapa de ciclación comprende una secuencia de 5' TCGAGCTTGTCTTCCTAAGACCGC 3'.

25

1. Recolección de muestras de ADN

(1) Se recogieron 2 mL de sangre periférica de 36 mujeres embarazadas, y luego se centrifugaron a 1.600 g a 4°C durante 10 minutos. Los glóbulos rojos se eliminaron, y el plasma sanguíneo restante se centrifugó a 16.000 g a 4°C durante 10 minutos para eliminar los glóbulos blancos. El ADN plasmático se extrajo del plasma utilizando un kit de ADN circulante SnoMag^{MR} (SNOVA), y el ADN resultante se disolvió en una solución de 50 µL de TE.

30

2. Preparación de la biblioteca de ADN para secuenciación

2.1 Tratamiento con rSAP:

La muestra de ADN resultante se trató mediante una enzima rSAP en una mezcla de reacción que comprende:

35

ADN	50 µL
rSAP (1 U/µL)	6 µL
Regulador 2 10X NE	6 µL

La reacción se llevó a cabo en una máquina de PCR, y el proceso se ajustó como: 37°C/45 min, 65°C/10 min, disminuyendo a una velocidad de 0,1°C/s a 4°C.

2.2 Reparación final:

40 El producto de 2.1 se reparó al final en una mezcla de reacción que comprende:

Agua	11 µL
ATP 0,1 M	2 µL
dNTP 25 mM	2 µL
ADN polimerasa T4 (3 U/µL)	3 µL

45 El procedimiento de reacción se estableció como: 12°C/20 min, se mantuvo a 4°C.

2.3 Adaptadores litigantes

Se litigaron dos adaptadores con el producto de 2.2 en una mezcla de reacción que comprende

5	ADN	30 μ L
	primer adaptador 10 μ M	3 μ L
	segundo adaptador 10 μ M	3 μ L
	2x regulador de ligación rápida	40 μ L
	ADN ligasa T4 (600 U/ μ L)	4 μ L

La reacción se llevó a cabo en una máquina de PCR, y el proceso se ajustó como: 20°C/30 min, mantenido a 4°C.

2.4 Reemplazo de cadena y traslado de muesca:

10 El producto de 2.3 se sometió a reemplazo de cadena y traslado de muesca mezclando el producto de 2.3 de la siguiente manera:

15	ADN	40 μ L
	Regulador taq 10x	8 μ L
	ATP 0,1 M	2 μ L
	dNTP 25 mM	2 μ L
	primer ADN de cadena sencilla	2 μ L
	segundo ADN de cadena sencilla	2 μ L

La mezcla obtenida se colocó en una máquina de PCR, y el proceso se ajustó a 60°C/5 min, se redujo a 37°C y luego se añadieron los siguientes compuestos a la mezcla:

20	ADN ligasa T4 (600 U/ μ L)	2 μ L
	Taq polimerasa (5 U/ μ L)	2 μ L.

La mezcla obtenida se colocó en una máquina de PCR, y el proceso se ajustó a 37°C durante 1 hora.

2.5 Amplificación por PCR

El producto de 2.4 se amplificó en una reacción que comprende:

25	ADN	45 μ L
	Mezcla 2xPfuCx	50 μ L
	Turbo polimerasa PfuCx	3 μ L
	primer cebador	2,5 μ L
	segundo cebador	2,5 μ L

30 Y el proceso de la PCR se ajustó como:

94°C	2min	
94°C	15s	}
56°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	10 min	
4°C	Mantener	

El producto de PCR se usó para llevar a cabo lo siguiente.

2.6 Aislamiento de una sola cadena

5 El producto de PCR se mezcló con 30 μ L de perlas de estreptavidina MyOne C1 en un tubo de 1,5 mL. El tubo se colocó entonces en una rejilla magnética hasta que la solución estaba clara y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 30 μ L de regulador de unión de perlas 1x (BBB) al tubo que se colocó nuevamente en una rejilla magnética. Esto se repitió 3 veces, y el sobrenadante se eliminó. Se añadieron 30 μ L de regulador de unión de perlas 1x y 5 μ L de Tween 20 al 0,5%.

El producto de PCR se mezcló con TE hasta un volumen final de 60 μ L, y luego se añadieron 30 μ L de regulador de unión de perlas 1X.

Se añadieron 80 μ L de la muestra obtenida y luego la mezcla resultante se transfirió a un tubo que contenía perlas de estreptavidina MyOne C1, y se dejó reposar el tubo durante 15 minutos después de la mezcla.

10 El tubo se colocó en una rejilla magnética hasta que la solución estaba clara y se eliminó el sobrenadante.

Se añadieron 1000 μ L de regulador de lavado de perlas 1x (BWB) al tubo, seguido de la mezcla del contenido del tubo. El tubo se colocó en una rejilla magnética hasta que la solución estaba clara y se eliminó el sobrenadante.

Se añadieron 78 μ L de NaOH 0,1 M para disolver las perlas magnéticas.

15 El tubo se colocó en una rejilla magnética hasta que la solución estaba clara y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo EP de 1,5 mL.

Se añadieron 37,5 μ L de ácido MOPS 0,3 M al nuevo tubo EP de 1,5 mL.

2.7 Ciclación

La ciclación se realizó a 37°C durante 1,5 h en una mezcla de reacción que comprende:

20	ADN	112 μ L
	Agua	178,3 μ L
	Regulador TA10x	35 μ L
	ATP 0,1 M	3,5 μ L
	ácido nucleico de cadena sencilla (20 μ M)	20 μ L
25	ADN Ligasa T4	1,2 μ L
	37°C	1,5h.

3. Secuenciación

Se usó la biblioteca de ADN de cadena sencilla cíclica para preparar una nanobola de ADN de acuerdo con las instrucciones de Complete Genomics Inc., y luego se secuenció en una máquina de CG. Las lecturas de secuenciación se obtuvieron con una lectura final de 19 pb y la otra lectura final de 12 pb.

30 4. Análisis de datos

El análisis de datos se realizó de acuerdo con las siguientes etapas:

Alineación del resultado de secuenciación obtenido con una secuencia del genoma humano de referencia para obtener un grupo de lecturas alineado;

Determinación del número total de lecturas contenidas en el grupo de lecturas alineadas, para obtener un valor de M;

35 con base en el grupo de lecturas alineadas, determinar el número de lecturas que se originan de un cromosoma i , para obtener un valor de N_i , en el que i representa un número de cromosoma;

con base en los valores de M y N_i , determinar un parámetro que representa el porcentaje relativo del cromosoma i , para obtener un parámetro R; y

con base en el parámetro R, determinar si una anomalía genética fetal está presente para el cromosoma i .

40 El parámetro R es la relación de N_i/M . Sorprendentemente, los inventores encontraron que mediante el uso de esta característica técnica, la eficacia de detección de una aneuploidía cromosómica mejorará significativamente.

La etapa de determinar si existe una anomalía genética fetal para el cromosoma i incluye:

obtener un valor Z con base en la ecuación de

$$Z_i = (R_{i,j} - media_i) / sd_i,$$

en la cual,

$$media_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n R_{i,j},$$

$$sd_i = \sqrt{\frac{1}{n-1} (R_{i,j} - media_i)^2}$$

5 j representa el número de muestra, n representa el número total de las muestras; y

comparando el valor Z con un primer valor preestablecido y un segundo valor preestablecido. El primer valor preestablecido y el segundo valor preestablecido se determinan usando una pluralidad de muestras conocidas. El primer valor preestablecido es -3, y el segundo valor preestablecido es al menos +3. Un valor Z inferior al primer valor preestablecido es una indicación de la presencia de un cromosoma i adicional en la muestra, y un valor Z mayor que el

10

Los resultados de las 36 muestras analizadas se resumen en la siguiente tabla:

Muestra No.	Resultados del análisis de cariotipo	Resultados secuenciación CG
S1	Trisoma 13	Trisoma 13
S2	Trisoma 13	Trisoma 13
S3	normal	normal
S4	normal	normal
S5	normal	normal
S6	normal	normal
S7	normal	normal
S8	normal	normal
S9	normal	normal
S10	normal	normal
S11	normal	normal
S12	normal	normal
S13	normal	normal
S14	normal	normal
S15	normal	normal
S16	normal	normal
S17	normal	normal
S18	normal	normal
S19	normal	normal
S20	normal	normal

S21	normal	normal
S22	normal	normal
S23	normal	normal
S24	normal	normal
S25	normal	normal
S26	normal	normal
S27	normal	normal
S28	normal	normal
S29	normal	normal
S30	normal	normal
S31	normal	normal
S32	Trisoma 21	Trisoma 21
S33	normal	normal
S34	Trisoma 18	Trisoma 18
S35	Trisoma 21	Trisoma 21
S36	Trisoma 18	Trisoma 18

5

La referencia a lo largo de esta memoria descriptiva a "una realización", "algunas realizaciones", "otro ejemplo", "un ejemplo", "un ejemplo específico" o "algunos ejemplos" significa que una característica particular, estructura, material o característica descrita en conexión con la realización o ejemplo se incluye en al menos una realización o ejemplo de la presente divulgación. Por lo tanto, las apariciones de frases tales como "en algunas realizaciones", "en una realización", "en otro ejemplo", "en un ejemplo", "en un ejemplo específico" o "en algunos ejemplos", en varios lugares a lo largo de esta memoria descriptiva no se refieren necesariamente a la misma realización o ejemplo de la presente divulgación. Además, los rasgos, estructuras, materiales o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones o ejemplos.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una biblioteca para la secuenciación usando una muestra de ADN de una muestra de sangre, que comprende:
- (a) aislar una muestra de ADN de la muestra de sangre,
- 5 (b) desfosforilación de la muestra de ADN para obtener un producto de fragmentación desfosforilado, y
- (c) someter los fragmentos de ADN desfosforilados de dicho producto de fragmentación a las siguientes etapas para obtener una biblioteca de ADN cíclicos para secuenciación:
- (i) reparación final para obtener un fragmento de ADN de cadena doble que tiene dos extremos romos con cuatro nucleótidos terminales que carecen cada uno de un grupo fosfato;
- 10 (ii) ligar un primer adaptador y un segundo adaptador que son diferentes entre sí con el fragmento de ADN de cadena doble respectivamente en los dos extremos romos en una reacción de una etapa para obtener un primer producto de ligación, siendo cada uno del primer adaptador y el segundo adaptador un oligonucleótido aislado que comprende: una primera cadena que tiene un grupo fosfato en el extremo 5' y un didesoxinucleótido en el extremo 3' y una segunda cadena que carece de un grupo fosfato en el extremo 5' y que tiene un didesoxinucleótido en el extremo 3', teniendo dicha primera cadena una longitud mayor que la de dicha segunda cadena y formando la primera y segunda cadena una estructura de cadena doble,
- 15 (iii) reemplazar la segunda cadena del primer adaptador con un primer ADN de cadena sencilla y reemplazar la segunda cadena del segundo adaptador con un segundo ADN de cadena sencilla, seguido por una reacción de traslado de muesca obteniendo así un segundo producto de ligación, estando el primer ADN de cadena sencilla adaptado para formar una estructura de cadena doble con la primera cadena del primer adaptador, y estando el segundo ADN de cadena sencilla adaptado para formar una estructura de cadena doble con la primera cadena del segundo adaptador,
- 20 (iv) amplificar el segundo producto de ligación usando un primer cebador y un segundo cebador para obtener un fragmento amplificado de ADN de doble cadena, en donde el primer cebador comprende una secuencia idéntica a uno de dicho primer ADN de cadena sencilla y dicho segundo ADN de cadena sencilla y el segundo cebador comprende una secuencia idéntica a la otra de dicho primer ADN de cadena sencilla y dicho segundo ADN de cadena sencilla y posee una biotina adicional;
- 25 (v) aislar un fragmento de ADN de cadena sencilla que contiene biotina de dicho ADN de cadena doble amplificado y
- (vi) ciclar el fragmento aislado de ADN de cadena sencilla.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de sangre es una muestra de plasma,
- 30 dicha muestra de ADN es una muestra de ácido nucleico circulante y
- se proporcionan fragmentos de ADN con una longitud de aproximadamente 100 pb a 200 pb para la desfosforilación.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que cada uno de los adaptadores primero y segundo comprende independientemente:
- un primer extremo sobresaliente ubicado en el extremo 3' de la primera cadena, y
- 35 un segundo extremo sobresaliente opcional ubicado en el extremo 5' de la primera cadena, opcionalmente, en cada uno de los adaptadores primero y segundo, el primer extremo sobresaliente tiene una longitud mayor que la del segundo extremo sobresaliente,
- preferiblemente, en cada uno de los adaptadores primero y segundo, la longitud del primer extremo sobresaliente es de aproximadamente 6 nt a 12 nt,
- 40 preferiblemente, en cada uno de los adaptadores primero y segundo, la longitud del segundo extremo sobresaliente es aproximadamente 0 nt a 4 nt.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en cada uno de los adaptadores primero y segundo, la longitud de la primera cadena es de aproximadamente 20 nt a 25 nt,
- opcionalmente, la longitud de la segunda cadena es de aproximadamente 10 nt a 15 nt,
- 45 opcionalmente,
- la estructura de cadena doble formada por el primer ADN de cadena sencilla y la primera cadena del primer adaptador tiene una longitud mayor que la de la estructura de cadena doble formada por la primera cadena y la segunda cadena en el primer adaptador; y

la estructura de cadena doble formada por el segundo ADN de cadena sencilla y la primera cadena del segundo adaptador tiene una longitud mayor que la de la estructura de cadena doble formada por la primera cadena y la segunda cadena en el segundo adaptador,

opcionalmente,

- 5 la primera cadena del primer adaptador comprende una secuencia de 5' AAGTCGGAGGCCAAGCGGTCGT 3';
la segunda cadena del primer adaptador comprende una secuencia de 5' TTGGCCTCCGACT 3',
la primera cadena del segundo adaptador comprende una secuencia de 5' GTCTCCAGTCGAAGCCCCGACG 3';
la segunda cadena del segundo adaptador comprende una secuencia de 5' GCTTCGACTGGAGA 3',
- 10 el primer ADN de cadena sencilla comprende una secuencia de 5' TCCTAAGACCGCTTGGCCTCCG 3', y el segundo ADN de cadena sencilla comprende una secuencia de 5' AGACAAGCTC(N)_mGATCGGGCTTCGACTGGAG 3', en la que el motivo (N)_m representa una secuencia índice que comprende m nucleótidos, m es cualquier número entero que varía de 4 nt a 10 nt, N = A, T, G o C.
- 15 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se realiza la etapa de reemplazar la segunda cadena del primer adaptador con el primer ADN de cadena sencilla y reemplazar la segunda cadena del segundo adaptador con el segundo ADN de cadena sencilla mediante lisis térmica e hibridación,
preferiblemente, la lisis térmica se realiza a una temperatura de aproximadamente 60 grados Celsius.
- 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa de aislar el fragmento de ADN de cadena sencilla que contiene biotina del fragmento amplificado de ADN de cadena doble comprende además las etapas de
poner en contacto el fragmento amplificado de ADN de doble cadena con una perla magnética para formar un compuesto de perla-ADN, con la perla magnética que tiene una estreptavidina unida a la misma, y
poner en contacto el compuesto de perla-ADN con una solución que tiene un pH superior a 7 para obtener el fragmento de ADN de cadena sencilla que contiene biotina;
preferiblemente, la solución que tiene un pH mayor que 7 que comprende NaOH,
- 25 más preferiblemente, siendo la concentración de NaOH en la solución de aproximadamente 0,5 a 2 M, incluso más preferiblemente aproximadamente 1 M;
opcionalmente, el método que comprende además la etapa de seleccionar el fragmento amplificado de ADN de doble cadena antes de la etapa de aislamiento del fragmento de ADN de cadena sencilla que contiene biotina,
- 30 preferiblemente, la selección se realiza poniendo en contacto el fragmento amplificado de ADN de doble cadena con una sonda específica para una secuencia predeterminada,
más preferiblemente, la secuencia predeterminada comprende al menos un exón,
más preferiblemente, la sonda se proporciona en forma de un microarreglo.
- 35 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la etapa de ciclación del fragmento de ADN aislado de cadena sencilla que contiene biotina se realiza usando una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla que comprende:
una primera sección adaptada para coincidir con cualquiera de una secuencia que comprende el nucleótido terminal 5' o una secuencia que comprende el nucleótido terminal 3' en dicho fragmento aislado de ADN de cadena sencilla que contiene biotina, y
- 40 una segunda sección adaptada para coincidir con la otra de una secuencia que comprende el nucleótido terminal 5' o el nucleótido terminal 3' en dicho fragmento aislado de ADN de cadena sencilla que contiene biotina,
preferiblemente, estando la primera sección y la segunda sección unidas entre sí de forma adyacente,
preferiblemente, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico de cadena sencilla la secuencia 5' TCGAGCTTGTCTTCCTAAGACCGC 3'.
- 45 8. Un método de secuenciación de un ácido nucleico, que comprende las etapas de:
preparar una biblioteca para secuenciación que contiene dicho ácido nucleico de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y

secuenciar la biblioteca,

preferiblemente realizando la etapa de secuenciación mediante el uso de una plataforma de secuenciación CG.

9. Un método para determinar una anomalía genética fetal que es una aneuploidía cromosómica en una muestra de sangre obtenida de una mujer embarazada, que comprende:

- 5 (a) secuenciar al menos una porción de una pluralidad de las moléculas de ácido nucleico contenidas en la muestra de sangre para obtener un resultado de secuenciación de acuerdo con el método descrito anteriormente;
- (b) alinear el resultado de secuenciación obtenido en la etapa (a) con una secuencia de genoma humano de referencia para obtener un grupo de lectura alineado;
- 10 (c) determinar el número total de lecturas contenidas en el grupo de lecturas alineadas obtenido en la etapa (b), para obtener un valor de M;
- (d) con base en el grupo de lecturas alineadas obtenido en la etapa (b), determinar el número de lecturas que se originan en un cromosoma i, para obtener un valor de N_i, en el que i representa un número de cromosoma;
- (e) con base en los valores M y N_i, determinar un parámetro que representa un porcentaje relativo del cromosoma i, para obtener un parámetro R; y
- 15 (f) con base en el parámetro R, determinar si una anomalía genética fetal está presente para el cromosoma i, en donde el parámetro R es la relación de N_i/M.

10. El método de la reivindicación 9, en el que la lectura tiene una longitud que varía de aproximadamente 12 pb a 21 pb.

20 11. El método de la reivindicación 9 o 10, en el que el grupo de lecturas alineadas consiste en lecturas alineadas de forma única.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la etapa (f) comprende además: obtener un valor Z con base en la ecuación de

$$Z_i = (R_{i,j} - \text{media}_i) / sd_i,$$

en la cual,

$$\text{media}_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n R_{i,j},$$

$$sd_i = \sqrt{\frac{1}{n-1} (R_{i,j} - \text{media}_i)^2}$$

j representa el número de muestra, n representa el número total de las muestras; y

comparar el valor Z con un primer valor preestablecido y un segundo valor preestablecido,

30 preferiblemente, el primer valor preestablecido y el segundo valor preestablecido se determinan usando una pluralidad de muestras conocidas, más preferiblemente, el primer valor preestablecido no es mayor a -3,

incluso más preferiblemente, el segundo valor preestablecido es al menos +3,

incluso más preferiblemente, el valor Z menor que el primer valor preestablecido es una indicación de la presencia de un cromosoma i adicional en la muestra, y el valor Z mayor que el segundo valor preestablecido es una indicación de la ausencia de un cromosoma i en la muestra.

35 13. Un aparato para preparar una biblioteca para la secuenciación de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

(a) una unidad de aislamiento de muestra de ADN adaptada para aislar una muestra de ADN de la muestra de sangre;

(b) una unidad de desfosforilación adaptada para desfosforilar la muestra de ADN para obtener un producto de fragmentación desfosforilado;

(c) una unidad de reparación final adaptada para llevar a cabo dicha etapa de reparación final;

40 (d) una primera unidad de ligación adaptada para llevar a cabo dicha etapa de ligación para obtener dicho primer producto de ligación;

- (e) una unidad de reemplazo de cadena y traslado de muesca adaptada para reemplazar la segunda cadena del primer adaptador con un primer ADN de cadena sencilla y reemplazar la segunda cadena del segundo adaptador con un segundo ADN de cadena sencilla seguido por una reacción de traslado de muesca obteniendo de ese modo dicho segundo producto de ligación;
- 5 (f) una unidad de amplificación adaptada para amplificar el segundo producto de ligación para obtener dicho fragmento amplificado de ADN de doble cadena;
- (g) una unidad de aislamiento de ADN de cadena sencilla adaptada para aislar dicho fragmento de ADN de cadena sencilla que contiene biotina de dicho fragmento amplificado de ADN de doble cadena y
- (h) una unidad de ciclación adaptada para ciclar el fragmento aislado de ADN de cadena sencilla,
- 10 por medio de lo cual se puede formar una biblioteca de ADN cíclicos para la secuenciación.
14. Un montaje para secuenciar un ácido nucleico, que comprende:
- un aparato para preparar una biblioteca para la secuenciación de acuerdo con la reivindicación 13, y
- un aparato de secuenciación adaptado para secuenciar la biblioteca,
- preferiblemente siendo el aparato de secuenciación una plataforma de secuenciación CG.
- 15 15. Un sistema para determinar una anomalía genética fetal que es una aneuploidía cromosómica en una muestra de sangre obtenida de una mujer embarazada, que comprende:
- un montaje de acuerdo con la reivindicación 14 adaptado para secuenciar al menos una porción de una pluralidad de las moléculas de ácido nucleico contenidas en dicha muestra para obtener un resultado de secuenciación;
- un montaje adaptado para analizar el resultado de la secuenciación de acuerdo con las siguientes etapas de:
- 20 alinear el resultado de la secuenciación con una secuencia del genoma humano de referencia para obtener un grupo de lecturas alineadas;
- determinar el número total de lecturas contenidas en el grupo de lecturas alineadas para obtener un valor de M;
- con base en el grupo de lecturas alineadas, determinar el número de lecturas que se originan de un cromosoma i , para obtener un valor de N_i , en el que i representa un número de cromosoma;
- 25 con base en los valores M y N_i , determinar un parámetro que representa un porcentaje relativo del cromosoma i , para obtener un parámetro R; y
- con base en el parámetro R, determinar si la anomalía genética fetal está presente para el cromosoma i ,
- preferiblemente el parámetro R es la relación de N_i/M .