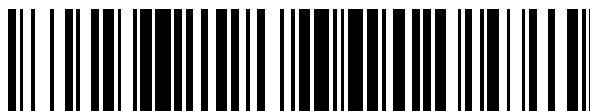


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 601**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6827 (2008.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2015** **E 15164907 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019** **EP 2937422**

54 Título: **Un método y un kit para detectar de forma no invasiva mutaciones de genes patógenos de sordera fetal**

30 Prioridad:

23.04.2014 CN 201410174277

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

27.07.2020

73 Titular/es:

**BERRY GENOMICS CO., LTD (100.0%)
No. 19 Building, No. 6 Jingshun East Street,
Chaoyang District
Beijing 100015, CN**

72 Inventor/es:

**LIU, YIQIAN;
GUO, XIANCHAO;
FU, YONG;
HU, YUGANG;
LI, TIANCHENG y
ZHANG, JIANGUANG**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 775 601 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 método y un kit para detectar de forma no invasiva mutaciones de genes patógenos de sordera fetal

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico genético. Más específicamente, la presente invención se dirige a un método para detectar mutaciones de genes patógenos de sordera fetal. La presente invención también se refiere a un kit y a los usos del mismo para detectar mutaciones de genes patógenos de sordera fetal.

10 Estado de la técnica

La sordera es una enfermedad común que produce discapacidad y afecta a la salud en los seres humanos y es también una de las enfermedades genéticas más comunes en clínica. Según las estadísticas, Se produce un caso de disaudia entre cada 1000 nuevos nacimientos en el mundo (Steel K P. New interventions in hearing impairment [J]. BMJ, 2000, 320(4):622~625). La sordera puede tener muchas razones, siendo la principal el factor genético. La discapacidad auditiva que sucede en el momento de nacer o antes de los 3 años de edad se denomina hipoacusia prelingual, la mitad de los casos por lo menos se deben a una deficiencia genética. En un gran número de pacientes con pérdida auditiva tardía, muchos pacientes desarrollaron dicha enfermedad debido a su deficiencia genética o debido a una mayor susceptibilidad al ambiente causada por deficiencia genética y polimorfismo. Se estima que hay en total más de 100 genes de sordera genética no sindrómica globalmente. A la vista del progreso de investigación nacional, la mayoría de los loci de patogenicidad encontrados en China son en GJB2, GJB3, SLC26A4 y 12SrRNA de mitocondrias.

En el presente documento se proporcionan introducciones breves sobre GJB2, GJB3 y SLC26A4 para una mejor comprensión. Gen GJB2: este gen se localiza en la región autosómica 13q11-12 y la longitud total de ADN es 4804 pb, incluyendo 2 exones. La región codificante es de 678 pb y codifica una conexión Connexin26 que consiste en 266 restos de aminoácidos, que pertenece a la proteína beta-2 que es parte de la ruta de circulación del potasio. La mutación del gen GJB2 es la causa más común de la sordera genética y la sordera que resulta de la mutación del gen GJB2 es prelingual, bilateral y de sordera simétrica, la cual varía mucho en términos del grado de pérdida auditiva. Puede variar desde leve a extremadamente severa, si bien la mayoría es una sordera severa o extremadamente severa. En la población china, los principales tipos de mutación del gen GJB2 son 235delC, 299-300delAT, 176-191del116 y similares, que representan sobre el 80 % de las poblaciones con la mutación del gen GJB2. Gen GJB3: este gen se localiza en la región autosómica 1q33-35, tiene 2 exones y codifica una conexión Connexin 31 que comprende 270 aminoácidos. La mutación del gen GJB3 puede conducir a una sordera no sindrómica genética autosómica, dominante o recesiva y se considera que se asocia con pérdida auditiva de alta frecuencia. El gen SLC26A1 se localiza en la región autosómica 7q31, tiene 21 exones y codifica una proteína transmembrana de varias pasadas Pendrina que consiste en 780 restos de aminoácidos, que pertenece a la familia transportadora relacionada principalmente con el transporte iónico yodo/cloruro y juega un papel importante en el manteniendo del equilibrio de las composiciones de iones del cuerpo. Recientemente, muchos estudios fuera del país demuestran que SLC26A4 está relacionado estrechamente con el síndrome de Pendred (acueducto vestibular dilatado o acompañado con sordera nerviosa o malformación del oído interno y bocio) y con el síndrome de acueducto vestibular dilatado (LVAS, del inglés, Large Vestibular Aqueduct Syndrome). Entre las numerosas mutaciones, muchas están presentes tanto en el síndrome de Pendred como en el LVAS. Por tanto, las mutaciones en los mismos loci pueden dar como resultado distintas interpretaciones clínicas. Existen muchos tipos de mutaciones del gen SLC26A4, mientras que las frecuencias de mutación de 281 C>T, 589G>A, IVS7-2A>G, 1174A>T(N392Y), 1226G>A, 1229C>T(T410M), 1975G>C, 2027T>A(L676Q), 2168A>G(HIS723ARG) y IVS15+5G>A son hasta del 82.51 %.

Con el desarrollo de la ciencia y la tecnología, muchos pacientes con sordera recién nacidos se diagnostican utilizando métodos de secuenciación Sanger, chip de genes y detección de proteínas. Existe también la detección prenatal basada en diagnóstico invasivo de genes patógenos de sordera fetal. Sin embargo, la detección no invasiva de genes patógenos de sordera fetal no se ha conseguido todavía.

55 Objeto de la invención

Los presentes inventores exploran un método para la detección de mutaciones de genes patógenos de sordera fetal (genotipo) que utiliza ADN de fragmento de sangre venosa de una mujer embarazada basado en tecnología de secuenciación de alto rendimiento de segunda generación. Tras el descubrimiento de ADN embrionario en sangre materna, es posible el diagnóstico no invasivo y la detección de anomalías cromosómicas fetales y mutaciones de genes de forma directa (Lo YM et al., (1997) Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet, 350:485-487). Los productos de Illumina son los mejores entre las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento de segunda generación, entre los cuales Miseq y Hiseq son dos productos representativos, uno conocido por la longitud de secuenciación y el otro conocido por el rendimiento de secuenciación. En la presente invención se utiliza el secuenciador Miseq. Sin embargo, la cantidad de ADN embrionario en sangre es baja y todavía es un problema técnico a resolver cómo determinar rápidamente y con precisión los genotipos fetales relacionados.

El problema técnico a resolver en la presente invención es cómo detectar de forma no invasiva los genotipos de genes patógenos de sordera fetal utilizando la sangre venosa de una mujer embarazada. Por consiguiente, el primer objetivo de la presente invención, como se define mediante las reivindicaciones adjuntas, es proporcionar un método que es capaz de detectar eficazmente mutaciones génicas en loci de mutación predeterminados de genes patógenos de sordera en un feto a través del uso de muestras de ADN de plasma, que comprende las siguientes etapas:

a) diseñar cebadores según una pluralidad de loci de mutación predeterminados de genes patógenos de sordera que comprenden 22 loci del gen GJB2, gen GJB3 y gen SLC26A4;
b) probar simultáneamente la pluralidad de loci de mutación predeterminados de genes patógenos de sordera mediante:

i) conectar los ADN de plasma contenidos en una muestra de ADN de plasma obtenida de una mujer embarazada con enlazadores de códigos de barras de preamplificación para obtener productos conectados marcando las posiciones iniciales y finales de los ADN de plasma y 6 bases diferentes en el extremo 3' del enlazador de preamplificación;
ii) preamplificar por PCR el producto conectado para obtener productos preamplificados;
iii) ciclar el producto preamplificado para obtener ADN ciclados;
iv) amplificar por PCR los ADN ciclados utilizando los cebadores diseñados para obtener productos amplificados; y
v) secuenciar con alto rendimiento los productos amplificados y detectar mutaciones de los genes patógenos de sordera fetal, en los que los cebadores son al menos un par de cebadores que están elongados hacia atrás y son:

GJB2-F1 (SEQ ID NO: 2): CACGCTGCAGACGATCC
GJB2-R1 (SEQ ID NO: 3): CCCCAATCCATCTTCTACTCT
GJB2-F2 (SEQ ID NO: 4): TCCCACATCCGGCTATG
GJB2-R2 (SEQ ID NO: 5): GATGGGGAAGTAGTGATCGTAG
GJB3-F (SEQ ID NO: 7): CGTGGACTGCTACATTGCC
GJB3-R (SEQ ID NO: 8): ATGTTGGGGCAGGGG
PDS3-F (SEQ ID NO: 10): CGTCATTTCCGGGAGT
PDS3-R (SEQ ID NO: 11): CTAAGCAGCCATTCC
PDS5-F (SEQ ID NO: 13): CCCTGACTCTGCTGG
PDS5-R (SEQ ID NO: 14): CACTGGCAATCAGGA
PDS7-F2 (SEQ ID NO: 16): TGGCAGTAGCAATTATCGTG
PDS7-R2 (SEQ ID NO: 17): TTTCATATGGAGCCAACCTG
PDS10-F (SEQ ID NO: 19): CCACTGCTCTTTCCCGC
PDS10-R (SEQ ID NO: 20): CAAGAGAAGAATCCTGAGAAGATG
PDS17-F (SEQ ID NO: 22): TTCCTGGACGTTGTTGGAG
PDS17-R (SEQ ID NO: 23): GATATAGCTCCACAGTCAAGCAC
PDS19-F (SEQ ID NO: 25): TCTTGAGATTTCACTTGGTT
PDS19-R (SEQ ID NO: 26): GTTCCATTTTAGAAACGGTA.

Según una realización preferida de la invención, la detección de los 22 loci del gen GJB2, gJB3 y gen SLC26A4 se consigue en una PCR utilizando 9 pares de cebadores.

Según una realización preferida de la invención, hay al menos diferencias de dos bases entre los enlazadores.

Según una realización preferida de la invención, los enlazadores son enlazadores de tipo Y emparejados parcialmente.

Según una realización preferida de la invención, el método utilizado en la ciclación de la etapa c) es una ciclación de tablilla, en el que se utilizan como tablillas los ADN de cadena única complementarios de ambos extremos del ADN preamplificado; y el cierre del anillo se completa mediante una Taq ligasa resistente al calor.

Según una realización preferida de la invención, la ciclación de la etapa c) consiste en reacciones múltiples de una circulación de sistema único que consta de desnaturalización de ADN, alineamiento de ADN de tablilla y conexión.

Según una realización preferida de la invención, el método de la invención adicionalmente comprende la digestión del ADN lineal sin ciclar.

Según una realización preferida de la invención, el método de la invención detecta el genotipo de genes patógenos de sordera fetal utilizando ADN de fragmento de sangre venosa de una mujer embarazada.

Según una realización preferida de la invención, los genes patógenos de sordera tienen mutaciones de inserción,

deleción, sustitución o de fusión de genes.

El segundo objetivo de la presente invención, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas, es proporcionar un kit para detectar mutaciones de genes patógenos de sordera fetal de forma no invasiva, que comprende:

5 reactivos para extraer los ADN de plasma, un enlazador de código de barras para marcar los ADN de plasma extraídos a través de las posiciones iniciales y finales de los ADN de plasma extraídos y 6 bases diferentes en el extremo 3' del enlazador, una ADN ciclasa, cebadores y reactivos para amplificar los ADN diana y cebadores y reactivos para preamplificar los loci predeterminados de genes patógenos de sordera, en los que los cebadores para preamplificar los loci predeterminados de genes patógenos de sordera son un par de cebadores que están

10 elongados hacia atrás y diseñados para probar simultáneamente una pluralidad de loci de mutación que comprenden 22 loci del gen GJB2, gen GJB3 y gen SLC26A4, siendo el par de cebadores:

GJB2-F1 (SEQ ID NO: 2): CACGCTGCAGACGATCC
 GJB2-R1 (SEQ ID NO: 3): CCCCAATCCATCTTCTACTCT
 15 GJB2-F2 (SEQ ID NO: 4): TCCCACATCCGGCTATG
 GJB2-R2 (SEQ ID NO: 5): GATGGGGAAGTAGTGATCGTAG
 GJB3-F (SEQ ID NO: 7): CGTGGACTGCTACATTGCC
 GJB3-R (SEQ ID NO: 8): ATGTTGGGGCAGGGG
 PDS3-F (SEQ ID NO: 10): CGTCATTTCCGGAGT
 20 PDS3-R (SEQ ID NO: 11): CTAAGCAGCCATTCC
 PDS5-F (SEQ ID NO: 13): CCCTGACTCTGCTGG
 PDS5-R (SEQ ID NO: 14): CACTGGCAATCAGGA
 PDS7-F2 (SEQ ID NO: 16): TGGCAGTAGCAATTATCGTC
 PDS7-R2 (SEQ ID NO: 17): TTTCATATGGAGCCAACCTG
 25 PDS10-F (SEQ ID NO: 19): CCACTGCTCTTTCCCGC
 PDS10-R (SEQ ID NO: 20): CAAGAGAAGAATCCTGAGAAGATG
 PDS17-F (SEQ ID NO: 22): TTCCTGGACGTTGTTGGAG
 PDS17-R (SEQ ID NO: 23): GATATAGCTCCACAGTCAAGCAC
 PDS19-F (SEQ ID NO: 25): TCTTGAGATTTCACTTGGTT
 30 PDS19-R (SEQ ID NO: 26): GTTCCATTTTAGAAACGGTA.

Descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra el diseño de cebadores utilizados en la presente invención.

La Fig. 2 muestra la estructura de productos conectados de la presente invención.

La Fig. 3 muestra la secuencia auxiliar y la secuencia enlazadora de la presente invención, en la que la flecha apunta hacia la posición necesaria para que sea unida por la Taq ADN ligasa.

La Fig. 4 muestra una realización del método de la invención, que ilustra el esquema de construcción de una librería.

Descripción detallada de la invención

El primer objetivo de la presente invención es proporcionar un método para detectar mutaciones génicas de loci de mutación predeterminados de genes patógenos de sordera en un feto a través del uso de muestras de ADN de plasma, que comprende las etapas como se definieron anteriormente en el presente documento.

Los métodos tradicionales para detectar ADN de fragmento se realizan principalmente mediante PCR, que amplifica las regiones a prueba antes de la detección. Como los cebadores de PCR están en ambos extremos de las regiones a prueba, se necesita que las regiones a prueba estén completas. Sin embargo, las regiones a prueba en la mayoría de los ADN de fragmento son incompletas, dado que los ADN de fragmento se producen por escisión aleatoria. Por consiguiente, el número de los ADN de fragmento que puede utilizarse como moldes de amplificación es escaso y difícil de detectar. En la invención, el intervalo de adecuación de la amplificación de cebador y la cantidad eficaz de moldes se incrementa grandemente mediante la ciclación de los ADN de fragmento, mejorando así la sensibilidad de la detección del ADN de fragmento considerablemente. Un aspecto más importante de la invención es marcar el molde inicial utilizando las posiciones inicial y terminal del ADN de fragmento, así como 6 bases diferentes en el extremo 3' del enlazador, mejorando al mismo tiempo la utilidad del molde. Por tanto, se puede determinar eficazmente si los loci predeterminados en madre y feto han mutado, así como el tipo de mutación. Otro aspecto importante de la invención es detectar loci múltiples para que sean probados simultáneamente, por ejemplo, para detectar los 22 loci patógenos de alta frecuencia al mismo tiempo en una muestra a prueba utilizando la tecnología Multi-PCR.

El método de detección de la invención se puede usar para detectar ADN de fragmento que comprende mutaciones, tales como mutación homocigótica y mutación heterocigótica; o deleción de bases, inserción o sustitución. "ADN de

fragmento" de la invención se refiere a un fragmento corto de ADN con la longitud de aproximadamente 166 pb que se forma por escisión aleatoria del ADN genómico de un organismo.

En resumen, la ciclación de molde de la invención hace a los moldes de ADN más disponibles que la PCR convencional, mejorando así la sensibilidad de detección. Marcando los moldes iniciales, utilizando las posiciones inicial y terminal del ADN de fragmento, así como las 6 bases diferentes de Código de barras en el extremo 3' del enlazador, es posible reducir eficazmente la secuencia a una secuencia molde a través de secuenciación antes de la amplificación por PCR, disminuyendo por tanto la desviación de secuencia resultado de la amplificación por PCR y determinando si los loci predeterminados en madre y feto han mutado, así como el tipo de mutaciones más exactamente. Por otra parte, se diseñan y optimizan 9 pares de cebadores elongados hacia atrás contra loci de mutación de alta frecuencia de los genes patógenos de sordera GJB2, GJB3 y SLC26A4 y se detectan los 22 loci patógenos de alta frecuencia en una muestra a prueba al mismo tiempo utilizando la tecnología Multi-PCR.

Diseño experimental de un ejemplo de sordera

1. Diseño de cebador de los loci de mutación predeterminados de genes patógenos de sordera.

Para conseguir la detección de genotipos de mutación de los loci predeterminados de genes patógenos de sordera fetal en sangre venosa materna, la mutación de los loci predeterminados de la invención es al menos una mutación de un gen seleccionado de los 22 loci del gen GJB2, gen GJB3 y gen SLC26A4, preferentemente, la mutación del gen GJB2 es al menos una mutación seleccionada de 35delG, 109G>A(VAL37ILE)167delT, 176-191del6, 235delC y 299-300delAT; la mutación del gen GJB3 es al menos una mutación seleccionada de 421A>G(ILE141VAL), 421-423delATT, 497A-G(ASN166SER), 538C>T(ARG180TER), 547G>A(GLU183LYS) y 580G>A(ALA194THR); y la mutación del gen SCL26A4 es al menos una mutación seleccionada de 281C>T, 589G>A, IVS7-2A>G, 1174A>T(N392Y), 1226G>A, 1229C>T(T410M), 1975G>C, 2027T>A(L676Q), 2162C>T(T721M), 2168A>G(HIS723ARG) y IVS15+5G>A. Los loci probados no incluyen C1494T de mitocondrias y loci de mutación de A1555G, dado que la cantidad de ADN de mitocondria en plasma es muy escasa. Más preferentemente, los pares de cebadores están diseñados para elongar hacia atrás para detectar los loci de mutación predeterminados y el cebador de extremo anterior está más cerca de los loci probados, como se muestra en la Fig. 1. Más preferentemente, los 22 loci de los genes GJB2, GJB3 y SLC26A4 se detectan en una PCR utilizando 9 pares de cebadores mediante Multi-PCR que resuelve la detección multipunto. Las secuencias específicas probadas en los genes GJB2, GJB3 y SLC26A4 y los cebadores son como sigue:

Cebadores de amplificación elongados hacia atrás en la región diana destinados al exón 2 de GJB2.

La secuencia del exón 2 de GJB2 es como sigue (SEQ ID NO: 1):

```
CGTCTTTTCCAGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCA
GACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCT
CACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTG
TGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAA
GAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCCACATCCGGCTATGGGCCCTG
CAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACC
GGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTT
AAGGACATCGAGGAGATCAAACCCAGAAGGTCCGCAT
```

GJB2-F1 (SEQ ID NO: 2): CACGCTGCAGACGATCC

GJB2-R1 (SEQ ID NO: 3): CCCCAATCCATCTTCTACTCT

GJB2-F2 (SEQ ID NO: 4): TCCCACATCCGGCTATG

GJB2-R2 (SEQ ID NO: 5): GATGGGGAAGTAGTGATCGTAG

Cebadores de amplificación elongados hacia atrás en la región diana destinados al exón 2 de GJB3.

La secuencia del exón 2 de GJB3 es como sigue (SEQ ID NO: 6):

AGGCAAGAAGCACGGAGGCCTGTGGTGGACCTACCTGTTTCAGCCTCATCTTCAA
GCTCATCATTGAGTTCCTCTTCCTCTACCTGCTGCACACTCTCTGGCATGGCTTCA
ATATGCCGCGCCTGGTGCAGTGTGCCAACGTGGCCCCCTGCCCCAACATCGTGG
ACTGCTACATTGCCCCGACCTACCGAGAAGAAAATCTTCACCTACTTCATGGTGGG
CGCCTCCGCGTCTGCATCGTACTCACCATCTGTGAGCTCTGCTACCTCATCTGC

CACAGGGTCCTGCGAGGCCTGCACAAGGACAAGCCTCGA

GJB3-F (SEQ ID NO: 7): CGTGGACTGCTACATTGCC
GJB3-R (SEQ ID NO: 8): ATGTTGGGGCAGGGG

5

Cebadores de amplificación elongados hacia atrás en la región diana destinados al exón 3 de SLC26A4.

La secuencia del exón 3 de SLC26A4 es como sigue (SEQ ID NO: 9):

TCATGATAGTTTAGAAAAGATACATCTGTAGAAAGGTTGAATATTTACCGTTTCTA
AAATGGAACCTTGACCCTCTTGAGATTTCACTTGGTTCTGTAGATAGAGTATAGC
ATCATGGACCGTCAAAAAGAATGTGTCCTTTCTAATGTTGTCGTCAAAGAACCCG
CATTGCTCCAGCTTTTCTATCACATAATCTTCAAAAAGAAAGACACAATGTTTTGTT
AGTTCCTAGGAAAAGAAA

10

PDS3-F (SEQ ID NO: 10): CGTCATTTGGGAGT PDS3-R (SEQ ID NO: 11): CTAAGCAGCCATTCC

Cebadores de amplificación elongados hacia atrás en la región diana destinados al exón 5 de SLC26A4.

15

La secuencia del exón 5 de SLC26A4 es como sigue (SEQ ID NO: 12):

AATGTATAATTCAGAAAACCAGAACCTTACCACCCGCAGTGATCTCACTCCAACA
ACGTCCAGGAAAGATATAGCTCCACAGTCAAGCACAAAGGCTATGGATTGGCACT
TTGGGAACGTTCACTTTGACTGGAAGCTCAGAGTTCCAATCCACTTGAATCTCTA
TTTCCTTGGTTGGGATATCAAGTTCCTCCAGATCTTCAATATCCTCATCAGGCTCA
AAAGCATTATTTGTTGAAACAGCATCACTTATGATGCCATTCTAAACGAAGAAAA
CACTGTCAACTTAATTGTCAAAGAT

20

PDS5-F (SEQ ID NO: 13): CCCTGACTCTGCTGG
PDS5-R (SEQ ID NO: 14): CACTGGCAATCAGGA

Cebadores de amplificación elongados hacia atrás en la región diana destinados al exón 7, intrón 7 y exón 8 de SLC26A4. La secuencia del exón 7 de SLC26A4, intrón 7 y exón 8 son como sigue (SEQ ID NO: 15):

25

ACGCTGGTTGAGATTTTTCAAAATATTGGTGATACCAATCTTGCTGATTTCACTGC
TGGATTGCTCACCATTGTCGTCTGTATGGCAGTTAAGGAATTAAATGATCGGTTTA
GACACAAAATCCCAGTCCCTATTCCTATAGAAGTAATTGTGGTAAGTAGAATATGT
AGTTAGAAAGTTCAGCATTATTTGGTTGACAAACAAGGAATTATTAACCAATG
GAGTTTTTAACATCTTTTGTATTTCAGACGATAATTGCTACTGCCATTTCATAT
GGAGCCAACCTGGAAAAAATTACAATGCTGGCATTGTAAATCCATCCCAAGG
GG

PDS7-F2 (SEQ ID NO: 16): TGGCAGTAGCAATTATCGTC
PDS7-R2 (SEQ ID NO: 17): TTTCATATGGAGCCAACCTG

5

Cebadores de amplificación elongados hacia atrás en la región diana destinados al exón 10 de SLC26A4.

La secuencia del exón 10 de SLC26A4 es como sigue (SEQ ID NO: 18):

GAATTCATTGCCTTTGGGATCAGCAACATCTTCTCAGGATTCTTCTCTTGTGTTTGT
GGCCACCACTGCTCTTTCCCGCACGGCCGTCCAGGAGAGCACTGGAGGAAAGA
CACAG

10

PDS10-F (SEQ ID NO: 19): CCACTGCTCTTTCCCGC
PDS10-R (SEQ ID NO: 20): CAAGAGAAGAATCCTGAGAAGATG

15

Cebadores de amplificación elongados hacia atrás en la región diana destinados al exón 17 de SLC26A4.

La secuencia del exón 17 de SLC26A4 es como sigue (SEQ ID NO: 21):

AATGGCATCATAAGTGATGCTGTTTCAACAAATAATGCTTTTGAGCCTGATGAGG
ATATTGAAGATCTGGAGGAAGTTGATATCCCAACCAAGGAAATAGAGATTCAAGT
GGATTGGAAGTCTGAGCTTCCAGTCAAAGTGAACGTTCCCAAAGTGCCAATCCA
TAGCCTTGTGCTTGACTGTGGAGCTATATCTTTCCTGGACGTTGTTGGAGTGAGA
TCACTGCGGGTG

20

PDS17-F (SEQ ID NO: 22): TTCCTGGACGTTGTTGGAG
PDS17-R (SEQ ID NO: 23): GATATAGCTCCACAGTCAAGCAC

Cebadores de amplificación elongados hacia atrás en la región diana destinados al exón 19 de SLC26A4.

25

La secuencia del exón 19 de SLC26A4 es como sigue (SEQ ID NO: 24):

AAAACATTGTGTCTTTCTTTTGAAGATTATGTGATAGAAAAGCTGGAGCAATGCG
GGTTCTTTGACGACAACATTAGAAAGGACACATTCTTTTGGACGGTCCATGATGC
TATACTCTATCTACAGAACCAAGTGAAATCTCAAGAGGGTCAAGGTTCCATTTTA
GAAACGGTAAATATTCAACCTTTCTACAGATGTATCTTTTCTAAACTATCATG

30

PDS19-F (SEQ ID NO: 25): TCTTGAGATTTCACTTGGTT
PDS19-R (SEQ ID NO: 26): GTTCCATTTTAGAAACGGTA

2. Diseño de enlazador del ADN de plasma

Para conseguir detección de molde cuantificada de los loci de genes patógenos de sordera, la invención empleó enlazadores de códigos de barras (secuencias múltiples marcadas) para marcar las secuencias de ADN de plasma. El marcado se obtiene utilizando las posiciones inicial y terminal del ADN de fragmento así como las 6 bases diferentes del extremo 3' del enlazador. La marcación anterior consigue dos objetivos: uno es marcar cuantitativamente los moldes iniciales de los loci probados; el otro es excluir la contaminación entre diferentes muestras en el mismo lote. Para conseguir el primer objetivo, el número de tipos de combinación de un grupo de enlazadores de códigos de barra tiene que ser mucho mayor que el número máximo de los moldes con las mismas posiciones de inicio y las mismas posiciones terminales. Por ejemplo, en 1 ml de plasma, el número máximo de moldes con las mismas posiciones de inicio y las mismas posiciones terminales es aproximadamente 10 y el número de tipos de combinaciones de cada grupo de enlazadores de código de barra de la invención es 10, por tanto, el número de combinaciones aleatorias de dirección 5' y dirección 3' de los enlazadores es 100. El número de combinaciones de 100 es mucho mayor que el número de moldes de 10, por tanto cada molde se asegura la unión a distinto tipo de enlazadores de código de barras. Para conseguir el segundo objetivo, se diseñaron en la invención diferentes combinaciones de enlazadores de código de barras. En total hay 16 grupos de enlazadores de código de barras sin repetición entre cada grupo de enlazadores, por tanto, se puede detectar un máximo de 16 muestras en un experimento. Más preferentemente, hay al menos diferencias de dos bases entre diferentes enlazadores de códigos de barras, para reducir por tanto la posibilidad de error. La función de corrección de los enlazadores de código de barras consigue la cuantificación y elimina la contaminación. Por tanto, se puede determinar eficazmente si los loci predeterminados en madre y feto han mutado, así como el tipo de mutación. El enlazador específico y las secuencias de cebador son como sigue:

Diseño de enlazador, necesidad de alinearse con una cadena doble:

ssCycAB-1 (SEQ ID NO: 27): GTCTCATCCCTGCGTG(NNNNNNT)
ssCycAB-2 (SEQ ID NO: 28): p(NNNNNN)CACGCAGGGTACGTGT

en el que N puede ser cualquier aminoácido.

Cebadores de amplificación de prelibrería:

ssCycUniprimer-F(SEQ ID NO: 29): GTCTCATCCCTGCGTG
ssCycUniprimer-R(SEQ ID NO: 30): ACACGTACCCTGCGTG

3. Ciclación de la prelibrería

Los métodos tradicionales para detectar ADN de fragmento se realizan principalmente mediante PCR, que amplifica las regiones a prueba antes de la detección. Como los cebadores de PCR están diseñados en ambos extremos de las regiones a prueba, se necesita que las regiones a prueba estén completas. Sin embargo, las regiones a prueba en la mayoría de los ADN de fragmento son incompletas, dado que los ADN de fragmento se producen por escisión aleatoria. Por consiguiente, el número de los ADN de fragmento que pueden utilizarse como moldes de amplificación es escaso y difícil de detectar mediante PCR. La invención utiliza un fragmento de ADN de plasma (aproximadamente 166 pb) para conseguir detección de molde cuantificada de los loci de los genes patógenos de sordera. Primero, el ADN de fragmento se cicla. Siempre que el punto de escisión no esté en el molde de los cebadores elongados hacia atrás, se puede llevar a cabo la amplificación. Por tanto, el intervalo de adaptación de la amplificación del cebador y la cantidad eficaz de moldes se incrementan y la sensibilidad de detección del fragmento de ADN también mejora considerablemente. Después de la conexión del ADN de plasma y los enlazadores, se amplifica la prelibrería y posteriormente se cicla. La ciclación de la prelibrería se puede ser de autoconexión en un anillo. La invención selecciona la ciclación de tablilla de cadena única con secuencias auxiliares específicas. Preferentemente, los enlazadores conectados a ADN de fragmento de plasma son enlazadores de tipo Y emparejados parcialmente, en los que la longitud de bases emparejadas siguiente al código de barras es 9 pb y la longitud de bases desemparejadas es 7 pb. Preferentemente, se utiliza un ADN de cadena única que es complementario de los enlazadores de tipo Y para ayudar a la ciclación. Los enlazadores y secuencias auxiliares son complementarios entre sí para formar cadenas dobles, en las que la longitud de la secuencia auxiliar es 32 pb. Preferentemente, los extremos entre las secuencias de enlazadores están conectados mediante la Taq ADN ligasa (M0208L) de NEB.

Secuencia auxiliar:

Puente (SEQ ID NO: 31): GTGCGTCCCTACTCTGTGTGCATGGGACGCAC

Realizaciones específicas

Protocolos experimentales:

1. Extracción de ADN de plasma

- 5 El ADN de plasma se extrajo de 1-2 ml de plasma mediante el kit QIAamp Circulating Nucleic Acid (N.º de catálogo 55114). El ADN se eluyó en 45 µl de tampón de elución, en el que se utilizaron 2 µl para la detección de concentración mediante Qubit.

2. Relleno final y adición de A en el ADN de plasma

- 10 La mezcla de reacción se preparó como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Tampón de ADN polimerasa de T4 (10 X)	5 µl
ADN de plasma	40,5 µl
Taq polimerasa	0,5 µl
ADN polimerasa de T4	2,0 µl
dNTP 10 mM	2,0 µl
Volumen total	50 µl

Reacción en una máquina de PCR:

- 15
37 °C: 20 min
72 °C: 20 min
4 °C: mantener

- 20 El producto con adición de A se purificó en una columna, se disolvió en 25 µl de tampón EB y se eluyó dos veces.

3. Conexión con los enlazadores

La mezcla de reacción se preparó como se muestra en la Tabla 2.

25

Tabla 2

ADN	22 µl
Tampón de ligasa Quick 2X	25 µl
Enlazador CycAB 7,5 µM	2 µl
ADN ligasa de T4 (HC)	1 µl
Volumen total	50 µl

Reacción en una máquina de PCR:

- 30
20 °C: 15 min
65 °C: 10 min
4 °C: mantener

4. Construcción de prelibrería

35

4.1 PCR (sistema 100 µl), la mezcla de reacción se preparó como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Phusion PCR Master Mix (2X)	50 µl
CycUniprimer (F-10 µM, R-35 µM)	2 µl
Productos conectados con enlazadores	50 µl
Volumen total	100 µl

- 40 4.2 Los programas de PCR se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

98 °C	30 s	1 ciclo
98 °C	10 s	14 ciclos
65 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	1 ciclo
4 °C	mantener	

5. Fosforilación y ciclación

5.1 El sistema de fosforilación y ciclación se preparó como se muestra en la Tabla 5.

5

Tabla 5

ATP	0,4 µl
T4 PNK	0,5 µl
Tampón de Taq ligasa 10X	4 µl
Puente (10 µM)	4 µl
Productos prelibrería	12 µl
Taq Ligasa	2 µl
EB	17,1 µl
Volumen total	50 µl

5.2 Los programas de PCR se muestran en la Tabla 6.

10

Tabla 6

37 °C	30 min	30 ciclos
95 °C	30 s	
50 °C	2 min	
4 °C	mantener	

6. Digestión de exonucleasa

6.1 Los componentes, como se muestran en la Tabla 7, se añadieron en el sistema de reacción de la etapa 5, en orden.

15

Tabla 7

Exo I	1 µl
Exo III	1 µl
Reacción en una máquina de PCR a 37 °C durante 10 min	
PK (3 mg/ml)	1 µl

6.2 Las condiciones de reacción son como se muestran en la Tabla 8.

20

Tabla 8

50 °C	10 min
99 °C	4 min
4 °C	mantener

7. Cribado de PCR de la región diana utilizando los cebadores elongados hacia atrás

25 La detección de los 22 loci del gen GJB2, gen gJB3 y gen SLC26A4 se realizó en una PCR utilizando 9 pares de cebadores mediante Multi-PCR, que resuelve la detección multipunto.

7.1 El sistema de reacción de PCR se preparó como se muestra en la Tabla 9

30

Tabla 9

Phusion PCR Master Mix (2x)	50 µl
Mezcla de cebadores (Primer Mix) (0.5-2 µM para cada uno)	4 µl
ADN ciclado	43 µl
EB	3 µl
Volumen total	50 µl

7.2 Las condiciones de reacción de PCR se muestran en la Tabla 10

Tabla 10

98 °C	30 s	1 ciclo
-------	------	---------

35

(continuación)

98 °C	10 s	25 ciclos
60 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	1 ciclo
4 °C	mantener	

Después de la reacción de PCR, el producto se purificó inmediatamente utilizando 90 µl de perlas XP Beads (0.9x) y se disolvió después en 26 µl de tampón EB.

5 8. Generación de la librería final

8.1 El sistema de reacción de PCR se preparó como se muestra en la Tabla 11

Tabla 11

Phusion PCR Master Mix (2x)	25 µl
Illumina-Nextera-F (25 µM)	0,5 µl
Cebador índice (Index Primer) (25 µM)	0,5 µl
Productos de PCR cribados	24 µl
Volumen total	50 µl

10

8.2 Las condiciones de reacción de PCR fueron como se muestran en la Tabla 12

Tabla 12

98 °C	30 s	1 ciclo
98 °C	10 s	25 ciclos
65 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	1 ciclo
4 °C	mantener	

15 Después de la reacción de PCR, se analizaron 10 µl de producto mediante electroforesis en gel de agarosa 2 %, mientras que otros productos se purificaron y reciclaron utilizando perlas XP Beads 0.8x y se disolvieron finalmente en 22 µl de tampón EB, los cuales se utilizaron en una Q-PCR (PCR cuantitativa) posterior como la librería final. El tamaño de la librería final es 320 pb (utilizado en calcular la concentración de Q-PCR) y se debe mezclar con el cebador de secuenciación Read1 de NEXTERA para la secuenciación. La secuenciación de extremo doble de 300 pb se realizó utilizando Miseq de Illumina.

La muestra fue plasma de una mujer embarazada. Preferentemente, la mutación de los loci predeterminados es al menos una mutación de un gen seleccionado de los 22 loci del gen GJB2, gen GJB3 y gen SLC26A4. Más preferentemente, la mutación del gen GJB2 es al menos una mutación seleccionada de 35delG, 109G>A(VAL37ILE)167delT, 176-191 del6, 235delC y 299_300delAT; la mutación del gen GJB3 es al menos una mutación seleccionada de 421A>G(ILE141VAL), 421-423delATT, 497A-G(ASN166SER), 538C>T(ARG180TER), 547G>A(GLU183LYS) y 580G>A(ALA194THR); y la mutación del gen SCL26A4 es al menos una mutación seleccionada de 281 C>T, 589G>A, IVS7-2A>G, 1174A>T(N392Y), 1226G>A, 1229C>T(T410M), 1975G>C, 2027T>A(L676Q), 2162C>T(T721 M), 2168A>G(HIS723ARG) y IVS15+5G>A. Para mayor comodidad de la descripción, los loci de mutación anteriores probados mediante combinaciones de cebadores se resumen como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13 Cebadores e información de los loci predeterminados a prueba

Gen	Cebadores correspondientes al locus probado	locus	Observación de la HGMD (Base de Datos de Mutaciones de Genes Humanos)
GJB2	GJB2-F1: CACGCTGCAGACGATCC GJB2-R1: CCCCAATCCATCTTCTACTCT	35delG	CD972240 sordera, herencia recesiva autosómica
	GJB2-F2: TCCCACATCCGGCTATG GJB2-R: GATGGGGAAGTAGTGATCGTA G	109G>A (VAL37ILE)	CM000016 sordera, herencia recesiva autosómica
		167delT	CD972241 sordera, herencia recesiva autosómica
		176-191del16	CD000073 sordera, herencia recesiva autosómica
		235delC	CD991730 sordera, herencia recesiva autosómica
		299-300delAT	CD000074 sordera, herencia recesiva autosómica
GJB3	GJB3-F: CGTGGAAGTCTACATTGCC GJB3-R: ATGTTGGGGCAGGGG	421A>G (ILE141VAL)	CM000019 sordera, herencia recesiva autosómica
		421-423delATT	CD000075 sordera, herencia recesiva autosómica
		497A-G (ASN166SER)	CM090826 sordera, no sindrómica, herencia recesiva autosómica
		538C>T (ARG180TER)	CM980934 sordera, no sindrómica, autosómica dominante
		547G>A (GLU183LYS)	CM980935 sordera, no sindrómica, autosómica dominante
		580G>A (ALA194THR)	CM090827 sordera, no sindrómica, herencia recesiva autosómica
SCL26A4	PDS2-F: CGTCATTTCTGGGAGT PDS2-R: CTAAGCAGCCATTC	281C>T	CM074541 LVAS
	PDS5-F: CCCTGACTCTGCTGG PDS5-R: CACTGGCAATCAGGA	589G>A	CM074557 LVAS
	PDS7-F2: TGGCAGTAGCAATTATCGTC PDS7-R2: TTTCATATGGAGCCAACCTG	IVS7-2 A>G	CS991479 síndrome de sordera Síndrome de Pendred
	PDS10-F: CCACTGCTCTTTCCCGC PDS10-R: CAAGAGAAGAATCCTGAGAAG ATG	1174 A>T (N392Y)	CM030959 sordera, no sindrómica, herencia recesiva autosómica
		1226G>A	CM981503 síndrome de sordera
		1229 C>T(T410M)	CM981504 síndrome de sordera
	PDS17-F: TTCCTGGACGTTGTTGGAG PDS17-R: GATATAGCTCCACAGTCAAGCA C PDS19-F: TCTTGAGATTTCACTTGTT PDS19-R: GTTCCATTTTAGAACGGTA	1975G>C	CM073354 sordera, no sindrómica, herencia recesiva autosómica
		2027 T>A (L676Q)	CM030963 sordera, no sindrómica, herencia recesiva autosómica
		2162C>T (T721M)	CM991031 sordera, no sindrómica, herencia recesiva autosómica
		2168A>G (HIS723ARG)	CM981513 síndrome de sordera
		IVS15+5G> A	CS050413 LVAS

Resultados experimentales

Tabla 14

Muestra	Información proporcionada por el hospital		Resultados de la detección no invasiva						Conclusión de la detección no invasiva	
	Genotipo materno	Genotipo fetal	mutación	moldes mutados ¹	Moldes totales ²	%	Genotipo materno	Genotipo fetal		
Mujer embarazada 1	No se observó mutación.	GJB2 109 G>A mutación heteróloga	GJB2109 G>A	16	331	4,83 %	No se observó mutación.	GJB2 109G>A El feto es heterólogo.		
			SLC26A4 IVS7-2A> G	0	376	0,00 %				
			GJB2 299-300delAT	0	162	0,00 %				
			GJB3538C>T	0	262	0,00 %				
Mujer embarazada 2	GJB2 109 G>A mutación heteróloga	GJB2 109 G>A mutación heteróloga	GJB2109 G>A	78	159	49,06 %	GJB2 109 G>A La madre es heteróloga.	GJB2 109G>A El feto es heterólogo.		
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	198	0,00 %				
			GJB2 299-300delAT	0	72	0,00 %				
			GJB3538C>T	0	162	0,00 %				
Mujer embarazada 3	GJB2 109 G>A mutación heteróloga	GJB2 109 G>A mutación heteróloga	GJB2109 G>A	177	343	51,60 %	GJB2 109 G>A La madre es heteróloga.	GJB2109 G>A El feto es heterólogo.		
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	425	0,00 %				
			GJB2 299-300delAT	0	132	0,00 %				
			GJB3538C>T	0	362	0,00 %				
Mujer embarazada 4	GJB2 109 G>A mutación heteróloga	GJB2 109 G>A mutación homocigótica	GJB2109 G>A	52	93	55,91 %	GJB2 109 G>A La madre es heteróloga.	GJB2 109 G>A El feto es homocigótico.		
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	137	0,00 %				
			GJB2 299-300delAT	0	41	0,00 %				
			GJB3538C>T	1	97	1,03 %				
Mujer embarazada 5	SLC26A4 IVS7-2I mutación heteróloga	SLC26A4 IVS7-2 mutación heteróloga	GJB2 109 G>A	0	67	0,00 %	SLC26A4 IVS7-2A>G La madre es heteróloga.	SLC26A4 IVS7-2A>G El feto es heterólogo.		
			SLC26A4 IVS7-2A>G	59	114	51,75 %				
			GJB2 299-300delAT	0	28	0,00 %				
			GJB3538C>T	0	71	0,00 %				
Mujer embarazada 6	GJB2 109 G>A mutación heteróloga	No se observó mutación.	GJB2 109 G>A	383	837	45,76 %	GJB2 109 G>A La madre es heteróloga.	No se observó mutación.		
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	958	0,00 %				
			GJB2 299-300delAT	0	381	0,00 %				
			GJB3538C>T	0	702	0,00 %				

(continuación)

Muestra	Información proporcionada por el hospital		Resultados de la detección no invasiva						Conclusión de la detección no invasiva	
	Genotipo materno	Genotipo fetal	mutación	moldes mutados ¹	Moldes totales ²	%	Genotipo materno	Genotipo fetal		
Mujer embarazada 7	No se observó mutación.	GJB2 109 G>A mutación heteróloga	GJB2 109 G>A	10	122	8,20 %	No se observó mutación.	GJB2109 G>A El feto es heterólogo.		
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	157	0,00 %				
			GJB2 299-300delAT	0	43	0,00 %				
			GJB3538C>T	1	107	0,93 %				
Mujer embarazada 8	No se observó mutación.	GJB2 299-300delAT mutación heteróloga	GJB2 109 G>A	0	291	0,00 %	No se observó mutación.	GJB2 299-300delAT El feto es heterólogo.		
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	381	0,00 %				
			GJB2 299-300delAT	14	149	9,40 %				
			GJB3538C>T	0	255	0,00 %				
Mujer embarazada 9	No se observó mutación.	GJB2 109 G>A mutación heteróloga	GJB2 109 G>A	34	627	5,42 %	No se observó mutación.	GJB2109 G>A El feto es heterólogo.		
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	748	0,00 %				
			GJB2 299-300delAT	0	271	0,00 %				
			GJB3538C>T	0	506	0,00 %				
Mujer embarazada 10	GJB2 109 G>A mutación heteróloga	No se observó mutación.	GJB2 109 G>A	79	169	46,75 %	GJB2 109 G>A La madre es heteróloga.	No se observó mutación.		
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	250	0,00 %				
			GJB2 299-300delAT	0	75	0,00 %				
			GJB3538C>T	0	188	0,00 %				
Mujer embarazada 11	GJB2 109 G>A mutación heteróloga	GJB2 109 G>A mutación heteróloga	GJB2 109 G>A	117	233	50,21 %	GJB2 109 G>A La madre es heteróloga.	GJB2109 G>A El feto es heterólogo.		
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	265	0,00 %				
			GJB2 299-300delAT	0	83	0,00 %				
			GJB3538C>T	0	205	0,00 %				
Mujer embarazada 12	GJB3538C>T mutación heteróloga	No se observó mutación.	GJB2 109 G>A	0	287	0,00 %	GJB3 538C>T La madre es heteróloga.	No se observó mutación.		
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	354	0,00 %				
			GJB2 299-300delAT	0	130	0,00 %				
			GJB3538C>T	124	292	42,47 %				

(continuación)

Muestra	Información proporcionada por el hospital		Resultados de la detección no invasiva				Conclusión de la detección no invasiva	
	Genotipo materno	Genotipo fetal	mutación	moldes mutados ¹	Moldes totales ²	%	Genotipo materno	Genotipo fetal
Mujer embarazada 13	No se observó mutación.	No se observó mutación.	GJB2 109 G>A	0	465	0,00 %	No se observó mutación.	No se observó mutación.
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	577	0,00 %		
			GJB2 299-300delAT	0	231	0,00 %		
			GJB3538C>T	0	447	0,00 %		
Mujer embarazada 14	No se observó mutación.	No se observó mutación.	GJB2 109 G>A	0	388	0,00 %	No se observó mutación.	No se observó mutación.
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	470	0,00 %		
			GJB2 299-300delAT	0	176	0,00 %		
			GJB3538C>T	2	313	0,64 %		
Mujer embarazada 15	No se observó mutación.	No se observó mutación.	GJB2 109 G>A	0	248	0,00 %	No se observó mutación.	No se observó mutación.
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	283	0,00 %		
			GJB2 299-300delAT	0	82	0,00 %		
			GJB3538C>T	1	219	0,46 %		
Mujer embarazada 16	No se observó mutación.	No se observó mutación.	GJB2 109 G>A	0	84	0,00 %	No se observó mutación.	No se observó mutación.
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	94	0,00 %		
			GJB2 299-300delAT	0	35	0,00 %		
			GJB3538C>T	0	64	0,00 %		
Mujer embarazada 17	No se observó mutación.	No se observó mutación.	GJB2109 G>A	0	275	0,00 %	No se observó mutación.	No se observó mutación.
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	380	0,00 %		
			GJB2 299-300delAT	0	86	0,00 %		
			GJB3538C>T	0	304	0,00 %		

(continuación)

Muestra	Información proporcionada por el hospital		Resultados de la detección no invasiva				Conclusión de la detección no invasiva	
	Genotipo materno	Genotipo fetal	mutación	moldes mutados ¹	Moldes totales ²	%	Genotipo materno	Genotipo fetal
Mujer embarazada 18	No se observó mutación.	No se observó mutación.	GJB2109 G>A	0	364	0,00 %	No se observó mutación.	No se observó mutación.
			SLC26A4 IVS7-2A>G	0	481	0,00 %		
			GJB2 299-300delAT	0	163	0,00 %		
			GJB3538C>T	0	385	0,00 %		
Notas:								
1. Moldes mutados: el número de moldes de los correspondientes loci mutados en la detección prenatal no invasiva.								
2. Moldes totales: el número total de moldes de los correspondientes loci en la detección prenatal no invasiva.								

Entre los reactivos principales se incluyen: kit de ácido nucleico circulante QIAamp (QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit), tampón de fosforilación de ADN de T4 (10x), mezcla de dNTP 10 µM, ADN polimerasa de T4, ADN fosforilasa de T4, solución dATP, tampón de ligadura rápida (Quick ligation buffer) (5x), enlazadores de cadena doble de ADN tipo Y, ADN ligasa de T4 (HC), ADN ligasa de T4 rápida (Quick T4 DNA ligase) (NEB), Phusion DNA polymerase (mezcla de ADN polimerasa Phusion), cebadores de preamplificación, agua ultrapura, tampón de Taq ligasa 10X, Taq Ligasa, NEBuffer 1 10x, Exo III.

El estándar de datos para la conclusión de los resultados experimentales:

Según unas estadísticas internas, la cantidad media de ADN de plasma fetal en una mujer embarazada en una edad gestacional de 12-26 semanas es aproximadamente de un 10 % basándose en la cantidad de ADN de plasma de la mujer embarazada. La alteración de genes de sordera se heredan autosómicamente y por tanto, el estándar de datos de varias combinaciones de genotipos patógenos maternos y fetales se puede obtener basándose en las leyes de la herencia. La conclusión experimental se deduce basándose en los datos de genotipo de los genotipos patógenos probados.

Genotipos		Valores teóricos		
Madre	Feto	madre	feto	total
Mutación homocigótica	Mutación heterocigótica	90 %	10 %	100 %
Mutación homocigótica	Mutación heterocigótica	90 %	5 %	95 %
Mutación heterocigótica	Mutación homocigótica	45 %	10 %	55 %
Mutación heterocigótica	Mutación heterocigótica	45 %	5 %	50 %
Mutación heterocigótica	Tipo silvestre	45 %	0 %	45 %
Tipo silvestre	Mutación heterocigótica	0 %	5 %	5 %
Tipo silvestre	Tipo silvestre	0 %	0 %	0 %

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Beijing BerryGenomics Co., Ltd.

<120> Un método y un kit para detectar de forma no invasiva mutaciones de genes patógenos de sordera fetal

<160> 31

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 417

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

cgtcttttcc agagcaaacc gccagagta gaagatggat tggggcacgc tgcagacgat      60
cctgggggggt gtgaacaaac actccaccag cattggaaag atctggetca ccgtcctctt    120
catttttctgc attatgatcc tcgttgtggc tgcaaaggag gtgtggggag atgagcaggc    180
cgactttgtc tgcaacaccc tgcagccagg ctgcaagaac gtgtgctacg atcactactt    240
ccccatctcc cacatccggc tatgggccct gcagctgata ttcgtgtcca cgccagcgct    300
cctagtggcc atgcacgtgg cctaccggag acatgagaag aagaggaagt tcatcaaggg    360
ggagataaag agtgaattta aggacatcga ggagatcaaa acccagaagg tccgcac      417

```

<210> 2

<211> 17

<212> ADN

<213> Artificial

<400> 2

cacgctgcag acgatcc

ES 2 775 601 T3

5	<210> 3 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial		
10	<400> 3 cccaatcca tcttactc t	21	
15	<210> 4 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial		
20	<400> 4 tcccatcc ggctatg	17	
25	<210> 5 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial		
30	<400> 5 gatgggaag tagtgatcg ag	22	
	<210> 6 <211> 313 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 6 aggcaagaag cacggaggcc tgtggtggac ctacctgttc agcctcatct tcaagctcat 60 cattgagttc ctcttcctct acctgctgca cactctctgg catggcttca atatgccgcg 120 cctggtgcag tgtgccaacg tggccccctg cccaacatc gtggactgct acattgcccg 180 acctaccgag aagaaaatct tcacctactt catggtgggc gcctccgccg tctgcatcgt 240 actcaccatc tgtgagctct gctacctcat ctgccacagg gtcctgcgag gcctgcacaa 300 ggacaagcct cga 313		
35	<210> 7 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial		
40	<400> 7 cgtggactgc tacattgcc	19	
45	<210> 8 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial		
50	<400> 8 atgtggggc agggg	15	
55	<210> 9 <211> 240 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>		

ES 2 775 601 T3

<400> 9

tcatgatagt	ttagaaaaga	tacatctgta	gaaagggtga	atatttaccg	tttctaaaat	60
ggaaccttga	ccctcttgag	atttcacttg	gttctgtaga	tagagtatag	catcatggac	120
cgtcaaaaag	aatgtgtcct	ttctaattgt	gtcgtcaaag	aaccgcatt	gctccagctt	180
ttctatcaca	taatcttcaa	aagaaagaca	caatgttttg	ttagttccta	ggaaaagaaa	240

5 <210> 10
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

10 <400> 10
cgtcatttcg ggagt 15

15 <210> 11
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

20 <400> 11
ctaagcagcc attcc 15

<210> 12
<211> 300
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 12

aatgtataat	tcagaaaacc	agaaccttac	cacccgcagt	gatctcactc	caacaacgtc	60
caggaaagat	atagctccac	agtcaagcac	aaggctatgg	attggcactt	tggaacggtt	120
cactttgact	ggaagctcag	agttccaatc	cacttgaatc	tctatttcct	tggttgggat	180
atcaagttcc	tccagatcct	caatatcctc	atcaggctca	aaagcattat	ttggtgaaac	240
agcatcactt	atgatgccat	tctaaacgaa	gaaaacactg	tcaacttaat	tgtcaaagat	300

30 <210> 13
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

35 <400> 13
ccctgactct gctgg 15

40 <210> 14
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

45 <400> 14
cactggcaat cagga 15

<210> 15
<211> 336
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

50

ES 2 775 601 T3

<400> 15

```

acgctggttg agatttttca aaatattggt gataccaatc ttgctgattt cactgctgga      60
ttgctcacca ttgtcgtctg tatggcagtt aaggaattaa atgatcggtt tagacacaaa      120
atcccagttcc ctattcctat agaagtaatt gtggttaagta gaatatgtag ttagaaagtt      180
cagcattatt tggttgacaa acaaggaatt attaaaacca atggagtttt taacatcttt      240
tggttttattt cagacgataa ttgctactgc catttcatat ggagccaacc tggaaaaaaa      300
ttacaatgct ggcattgtta aatccatccc aagggg                                336

```

5 <210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

10 <400> 16
tggcagtagc aattatcgtc 20

15 <210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

20 <400> 17
ttcatatgg agccaacctg 20

25 <210> 18
<211> 114
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

```

<400> 18
gaattcattg cctttgggat cagcaacatc ttctcaggat tcttctcttg ttttgtggcc      60
accactgctc tttcccgcac ggccgtccag gagagcactg gaggaaagac acag          114

```

30 <210> 19
<211> 17
<212> ADN
<213> Artificial

35 <400> 19
ccactgctct ttccgc 17

40 <210> 20
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

45 <400> 20
caagagaaga atcctgagaa gatg 24

50 <210> 21
<211> 231
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

ES 2 775 601 T3

	aatggcatca taagtgatgc tgtttcaaca aataatgctt ttgagcctga tgaggatatt	60
	gaagatctgg aggaacttga tatcccaacc aaggaaatag agattcaagt ggattggaac	120
	tctgagcttc cagtcaaagt gaacgttccc aaagtgccaa tccatagcct tgtgcttgac	180
	tgtggagcta tatctttcct ggacgttggt ggagtgaat cactgcgggt g	231
5	<210> 22 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
10	<400> 22 ttcctggacg ttgttgag	19
15	<210> 23 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
20	<400> 23 gatatagctc cacagtcaag cac	23
25	<210> 24 <211> 218 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 24	
	aaaacattgt gtctttcttt tgaagattat gtgatagaaa agctggagca atgcgggttc	60
	tttgacgaca acattagaaa ggacacattc tttttgacgg tccatgatgc tatactctat	120
	ctacagaacc aagtgaaatc tcaagagggt caaggttcca ttttagaaac ggtaaatatt	180
	caacctttct acagatgtat cttttctaaa ctatcatg	218
30	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
35	<400> 25 tcttgagatt tcacttggt	20
40	<210> 26 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
45	<400> 26 gttcatttt agaaacggt	20
50	<210> 27 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial <400> 27 gtctcatccc tgcgtg	16
	<210> 28	

ES 2 775 601 T3

	<211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
5	<400> 28 cacgcagggt acgtgt	16
10	<210> 29 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
15	<400> 29 gtctcatccc tgcgtg	16
20	<210> 30 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
25	<400> 30 acacgtaccc tgcgtg	16
30	<210> 31 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
30	<400> 31 gtgcgtccct actctgtgtg catgggacgc ac	32

REIVINDICACIONES

1. Un kit para detectar de forma no invasiva mutaciones de genes patógenos de sordera fetal, que comprende:
 reactivos para extraer los ADN de plasma, un enlazador de código de barras para marcar los ADN de plasma
 extraídos a través de las posiciones iniciales y finales de los ADN de plasma extraídos y 6 bases diferentes en el
 extremo 3' del enlazador de código de barras, una ADN ciclase, cebadores y reactivos para amplificar los ADN diana
 y cebadores y reactivos para preamplificar los loci predeterminados de genes patógenos de sordera, en los que los
 cebadores para preamplificar los loci predeterminados de genes patógenos de sordera son pares de cebadores que
 están elongados hacia atrás y diseñados para probar simultáneamente una pluralidad de loci de mutación que
 comprenden 22 loci del gen GJB2, gen GJB3 y gen SLC26A4; siendo los pares de cebadores:
 - GJB2-F1 (SEQ ID NO: 2): CACGCTGCAGACGATCC,
 - GJB2-R1 (SEQ ID NO: 3): CCCCAATCCATCTTCTACTCT;
 - GJB2-F2 (SEQ ID NO: 4): TCCCACATCCGGCTATG,
 - GJB2-R2 (SEQ ID NO: 5): GATGGGGAAGTAGTGATCGTAG;
 - GJB3-F (SEQ ID NO: 7): CGTGGACTGCTACATTGCC,
 - GJB3-R (SEQ ID NO: 8): ATGTTGGGGCAGGGG;
 - PDS3-F (SEQ ID NO: 10): CGTCATTTCCGGAGT,
 - PDS3-R (SEQ ID NO: 11): CTAAGCAGCCATTCC;
 - PDS5-F (SEQ ID NO: 13): CCCTGACTCTGCTGG,
 - PDS5-R (SEQ ID NO: 14): CACTGGCAATCAGGA;
 - PDS7-F2 (SEQ ID NO: 16): TGGCAGTAGCAATTATCGTC,
 - PDS7-R2 (SEQ ID NO: 17): TTTCATATGGAGCCAACCTG;
 - PDS10-F (SEQ ID NO: 19): CCACTGCTCTTTCCCGC,
 - PDS10-R (SEQ ID NO: 20): CAAGAGAAGAATCCTGAGAAGATG;
 - PDS17-F (SEQ ID NO: 22): TTCCTGGACGTTGTTGGAG,
 - PDS17-R (SEQ ID NO: 23): GATATAGCTCCACAGTCAAGCAC; y
 - PDS19-F (SEQ ID NO: 25): TCTTGAGATTTCACTTGTT,
 - PDS19-R (SEQ ID NO: 26): GTTCCATTTTAGAAACGGTA.
2. El kit según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el kit comprende adicionalmente reactivos para la
 secuenciación de alto rendimiento.
3. El kit según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el par de cebadores elongados hacia atrás contienen una
 región de cebador universal adecuada para diferentes plataformas de secuenciación de alto rendimiento.
4. El kit según la reivindicación 1, **caracterizado por que** hay al menos diferencias de dos bases entre los
 enlazadores.
5. El kit según la reivindicación 1, **caracterizado por que** los enlazadores son enlazadores de tipo Y emparejados
 parcialmente.
6. El kit según la reivindicación 1, **caracterizado por que** los genes patógenos de sordera tienen mutaciones de
 inserción, delección, sustitución o de fusión de genes.
7. Un conjunto de pares de cebadores como se define en la reivindicación 1 para el uso de detección no invasiva de
 mutaciones de genes patógenos de sordera en un feto.
8. Un método para la detección no invasiva de mutaciones de genes patógenos de sordera fetal, que comprende:
 - diseñar cebadores según una pluralidad de loci de mutación predeterminados de genes patógenos de sordera
 que comprenden 22 loci del gen GJB2, gen GJB3 y gen SLC26A4;
 - probar simultáneamente la pluralidad de loci de mutación predeterminados de genes patógenos de sordera
 mediante:
 - conectar los ADN de plasma contenidos en una muestra de ADN de plasma obtenida de una mujer
 embarazada con enlazadores de códigos de barras de preamplificación para obtener productos conectados
 marcando las posiciones iniciales y finales de los ADN de plasma y 6 bases diferentes en el extremo 3' del
 enlazador de preamplificación;
 - preamplificar por PCR el producto conectado para obtener productos preamplificados;
 - ciclar el producto preamplificado para obtener ADN ciclados;
 - amplificar por PCR los ADN ciclados utilizando los cebadores diseñados para obtener productos
 amplificados; y
 - secuenciar con alto rendimiento los productos amplificados y detectar mutaciones de genes patógenos de
 sordera fetal en los que los cebadores son un conjunto de pares de cebadores que están elongados hacia
 atrás y son:

GJB2-F1 (SEQ ID NO: 2): CACGCTGCAGACGATCC,
 GJB2-R1 (SEQ ID NO: 3): CCCCAATCCATCTTCTACTCT;
 GJB2-F2 (SEQ ID NO: 4): TCCCACATCCGGCTATG,
 GJB2-R2 (SEQ ID NO: 5): GATGGGGAAGTAGTGATCGTAG;
 GJB3-F (SEQ ID NO: 7): CGTGGACTGCTACATTGCC,
 GJB3-R (SEQ ID NO: 8): ATGTTGGGGCAGGGG;
 PDS3-F (SEQ ID NO: 10): CGTCATTTTCGGGAGT,
 PDS3-R (SEQ ID NO: 11): CTAAGCAGCCATTCC;
 PDS5-F (SEQ ID NO: 13): CCCTGACTCTGCTGG,
 PDS5-R (SEQ ID NO: 14): CACTGGCAATCAGGA;
 PDS7-F2 (SEQ ID NO: 16): TGGCAGTAGCAATTATCGTC,
 PDS7-R2 (SEQ ID NO: 17): TTTTCATATGGAGCCAACCTG;
 PDS10-F (SEQ ID NO: 19): CCACTGCTCTTTCCCGC,
 PDS10-R (SEQ ID NO: 20): CAAGAGAAGAATCCTGAGAAGATG;
 PDS17-F (SEQ ID NO: 22): TTCCTGGACGTTGTTGGAG,
 PDS17-R (SEQ ID NO: 23): GATATAGCTCCACAGTCAAGCAC; y
 PDS19-F (SEQ ID NO: 25): TCTTGAGATTTCACTTGGTT,
 PDS19-R (SEQ ID NO: 26): GTTCCATTTTAGAAACGGTA.

9. El método de la reivindicación 8, en el que al menos un par de cebadores elongados hacia atrás contiene una región de cebador universal adecuada para diferentes plataformas de secuenciación de alto rendimiento.

10. El método de la reivindicación 8, en el que hay al menos diferencias de dos bases entre los enlazadores.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9, en el que los enlazadores son enlazadores de tipo Y emparejados parcialmente.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que la ciclación de los productos preamplificados comprende una ciclación en tablilla, en el que se utilizan como tablillas los ADN de cadena única complementarios de ambos extremos del ADN preamplificado; y el cierre del anillo se completa mediante una Taq ligasa resistente al calor.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que la ciclación de los productos preamplificados comprende múltiples reacciones de una circulación de sistema único que consiste en desnaturalización de ADN, alineamiento de ADN de tablilla y conexión.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, que comprende adicionalmente la digestión del ADN lineal no ciclado.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en el que los genes patógenos de sordera comprenden al menos una mutación de inserción, delección, sustitución o de fusión de genes.

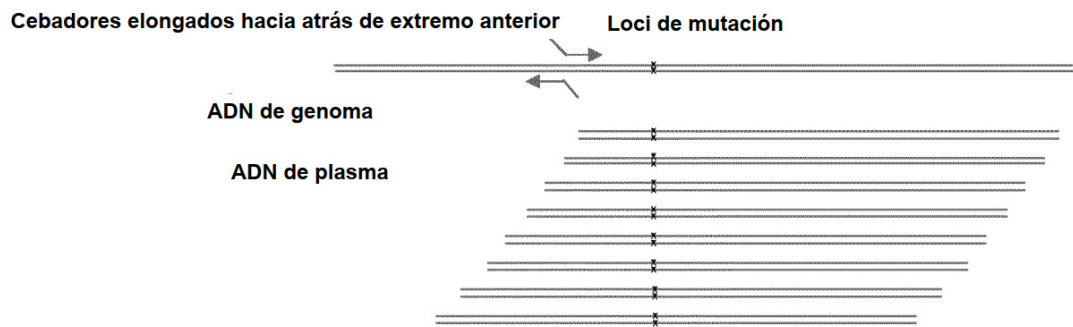


Fig. 1

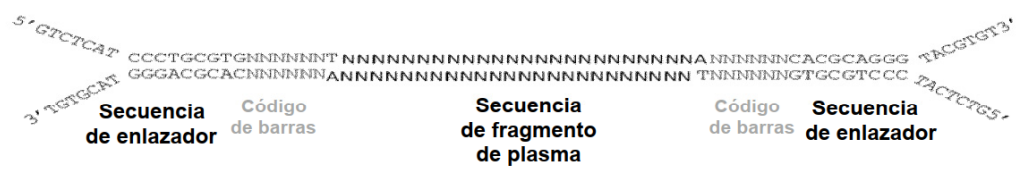


Fig. 2

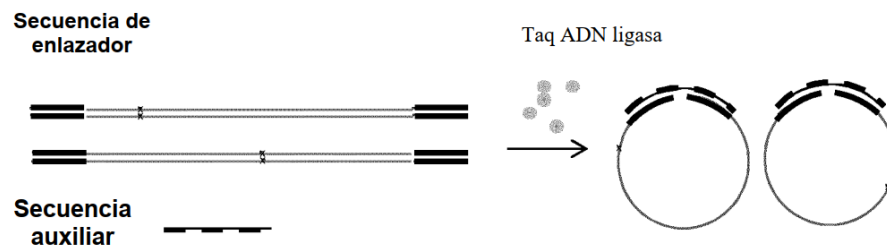


Fig. 3

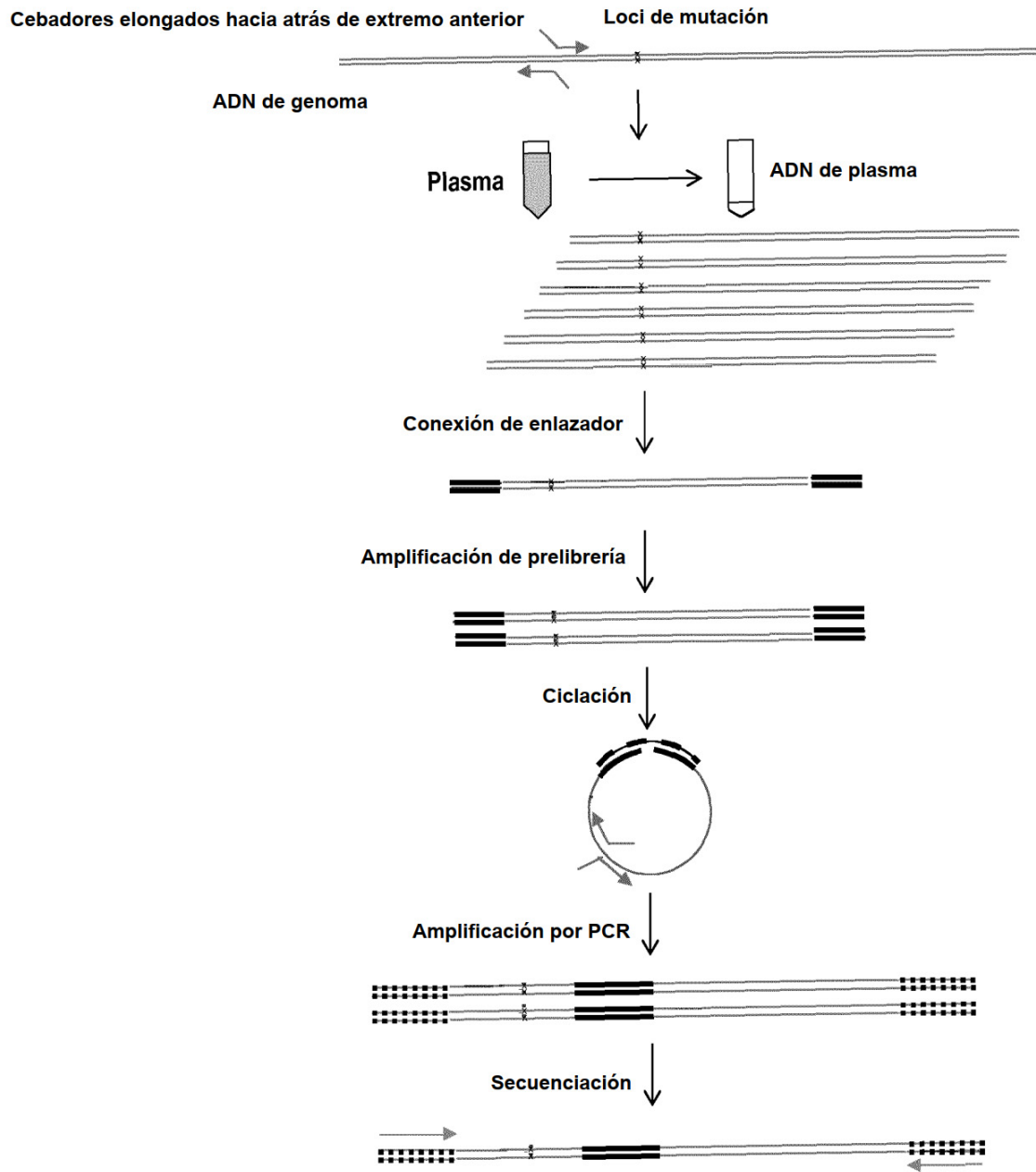


Fig. 4