

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 212**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07869055 .9**
- 96 Fecha de presentación: **07.12.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2140027**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.01.2010**

54 Título: **Cribado genético prenatal no-invasivo**

30 Prioridad:
07.12.2006 US 869090 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.11.2012

73 Titular/es:
NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:
BHATT, RAM;
FAN, WEN-HUA;
TIM, ROGER y
BISCHOFF, FARIDEH

74 Agente/Representante:
CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 391 212 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

Cribado genético prenatal no-invasivo

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere en general al aislamiento del ácido nucleico fetal y cribado prenatal o prueba de anomalías genéticas y cromosómicas.

Antecedentes de la invención

10 Por lo general, el cribado o prueba prenatal se realiza para determinar el género del feto o para detectar trastornos genéticos y/o anomalías cromosómicas en el feto durante el embarazo. Al día de hoy, se han reconocido más de 4000 trastornos genéticos, causados por uno o más genes defectuosos. Algunos ejemplos incluyen Fibrosis Quística, Enfermedad de Huntington, Talasemia Beta, Distrofia Miotónica, Anemia de Células Falciformes, Porfiria, y Síndrome del X Frágil. La anomalía cromosómica se causa por aberraciones en el número de cromosomas, duplicación o ausencia del material cromosómico, y por defectos en la estructura del cromosoma. Algunos ejemplos de anomalías cromosómicas son las trisomías, a saber la trisomía 16, una de las causas principales de aborto involuntario en el primer trimestre, la trisomía 21 (síndrome de Down), la trisomía 13 (síndrome de Patau), trisomía 18 (síndrome de Edwards), síndrome de Klinefelter (47, XXY), (47, XYY), y (47, XXX); la ausencia de cromosomas (monosomía), *por ejemplo*, síndrome de Turner (45, X0); translocaciones cromosómicas, deleciones y/o microdeleciones, *por ejemplo*, Translocación Robertsoniana, síndrome de Angelman, síndrome de DiGeorge y síndrome de Wolf-Hirschhorn.

20 Las pruebas genéticas prenatales disponibles actualmente suelen incluir procedimientos invasivos. Por ejemplo, muestreo de vellosidades coriónicas (CVS) realizado en una mujer embarazada en torno a las 10-12 semanas de embarazo y la amniocentesis realizada en torno a las 14-16 semanas, todas incluyen procedimientos invasivos para obtener la muestra para la prueba de anomalías cromosómicas en un feto. Las células fetales obtenidas a través de estos procedimientos de muestreo, generalmente se examinan para detectar anomalías cromosómicas utilizando análisis citogenéticos o de hibridación fluorescente in situ (FISH).

25 Mientras que estos procedimientos pueden ser útiles para la detección de aberraciones cromosómicas, se ha demostrado que se asocian con el riesgo de aborto involuntario. Por consiguiente, la amniocentesis o CVS solo se ofrece a las mujeres que se consideran en un riesgo mayor, incluyendo aquellas de edad materna avanzada (>35 años), aquellas con cribado de suero materno anormal o aquellas que han tenido una previa anomalía cromosómica fetal. Como resultado de estas pruebas, el porcentaje de mujeres mayores de 35 años que dieron luz a bebés con aberraciones cromosómicas tales como síndrome de Down ha disminuido drásticamente. Sin embargo, la falta del cribado o pruebas prenatales apropiadas o relativamente seguras, para la mayoría de mujeres embarazadas se ha traducido en cerca del 80% de bebés con síndrome de Down que nacen de mujeres por debajo de los 35 años de edad.

35 De esta manera, existe una necesidad de pruebas de cribado de diagnóstico para la población general de mujeres embarazadas, especialmente las pruebas dirigidas a identificar aberraciones cromosómicas fetales, así como otros defectos o variaciones genéticas.

Li et al (Clinical Chemistry (2004) 50(6):1002-1011) describe el análisis de ADN fetal en plasma materno.

40 Adinolfi and Sherlock (Human Reproduction Update (1997) 3(4):383-392) revelan que las células trofoblásticas humanas se pueden recuperar mediante procedimientos mínimamente invasivos a partir del canal endocervical entre 6 y 15 semanas de gestación, y que la incidencia con la que las células fetales se pueden detectar en muestras de células transcervicales (TCC) varía de acuerdo con el método de recolección y las técnicas moleculares empleadas para su identificación.

45 WO98/54364 describe métodos no-invasivos para detectar la presencia de secuencias de ácido nucleico específicas mediante el análisis de muestras de orina para la presencia de ácidos nucleicos que han cruzado la barrera del riñón, incluyendo los métodos para detectar secuencias de ácido nucleico fetal específicas mediante el análisis de orina materna para la presencia de ácidos nucleicos fetales.

Resumen de la invención

50 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la mucosa cervical es un buen depósito natural para células de la placenta que migraron, *por ejemplo*, células fetales así como para el aislamiento de ácidos nucleicos fetales. En consecuencia, la presente divulgación provee los métodos y kits útiles para la prueba o el cribado de anomalías genéticas en fetos, utilizando ácidos nucleicos fetales aislados a partir de muestras de moco

cervical. Además, la presente divulgación provee cebadores y sondas útiles para la amplificación del ácido nucleico de, *por ejemplo*, marcadores genéticos, especialmente utilizando amplicones de tamaño relativamente pequeño en el cribado genético fetal.

5 En una modalidad de la invención, se provee un método para conducir una prueba genética de un feto. El método comprende el aislamiento, mediante el fraccionamiento de tamaño, una muestra de ácido nucleico a partir de una muestra de moco cervical obtenida de un sujeto femenino que contiene el feto, en donde la muestra de ácido nucleico consiste esencialmente de polinucleótidos en un tamaño que varía de aproximadamente 50 pares de base a aproximadamente 300 pares de base y en donde el resultado de una prueba genética en la muestra de ácido nucleico es indicativo de una composición genética del feto.

10 En otra modalidad de la invención, se provee un método del aislamiento de una muestra de ácido nucleico fetal. El método comprende el aislamiento, mediante el fraccionamiento de tamaño, una muestra de ácido nucleico que consiste esencialmente de polinucleótidos de aproximadamente 50 pares de base a aproximadamente 300 pares de base en longitud de una muestra de moco cervical obtenida de un sujeto femenino que contiene el feto.

15 También se revela un kit de prueba genética apropiado, para la prueba de la composición genética de un feto. El kit comprende un par de cebadores apropiado, para amplificar un alelo deseado o marcador genético, en donde el fragmento amplificado del nucleótido es menos de aproximadamente 200 pares de base y en donde el alelo deseado no se asocia únicamente con el cromosoma Y. En otras modalidades, el kit comprende una muestra aislada de ADN a partir de una muestra de moco cervical obtenida de un sujeto femenino que contiene el feto. La muestra de ADN consiste esencialmente de polinucleótidos en un tamaño que varía de aproximadamente 50 pares de base a aproximadamente 200 pares de base.

También se revela una muestra aislada de ADN útil para pruebas genéticas de un feto. La muestra de ADN se puede obtener, mediante el aislamiento de fragmentos de ADN en un tamaño que varía de aproximadamente 50 pares de base a aproximadamente 200 pares de base a partir de una muestra de moco cervical obtenida de un sujeto femenino que contiene el feto.

25 Breve descripción de las figuras

FIG. 1 muestra el fraccionamiento de tamaño de ADN total obtenido de moco cervical en un gel de poliacrilamida al 10%. La "Banda A," correspondiente a una longitud de polinucleótido de aproximadamente 50-200 pares de base contiene ADN fetal.

30 FIG. 2 muestra un ejemplo de electroferograma de PCR demostrando que en un experimento las señales fetales corresponden entre el ADN de tejido fetal y el fragmento de 50-200 bp de ADN aislado de una muestra de moco cervical.

FIG. 3 muestra otro ejemplo de electroferograma de PCR demostrando que en otro experimento las señales fetales corresponden entre el ADN de tejido fetal y el fragmento de 50-200 bp de ADN aislado de una muestra de moco cervical.

35 Descripción detallada de la invención

El descubrimiento de la presente invención es que las muestras de moco cervical pueden ser una gran fuente de células fetales así como de ácidos nucleicos fetales. En consecuencia, la presente divulgación provee métodos, reactivos y kits útiles para la prueba o el cribado de anomalías genéticas del feto, utilizando ácidos nucleicos aislados a partir de muestras de moco cervical.

40 Además, la presente divulgación provee los cebadores y sondas útiles para la amplificación del ácido nucleico, *por ejemplo*, de marcadores genéticos, especialmente el uso de amplicones de tamaño relativamente pequeño en el cribado genético fetal.

45 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proveen los métodos para conducir pruebas genéticas de un feto mediante el aislamiento de una o más muestras de ácidos nucleicos a partir de una o más muestras de moco cervical obtenidas de un sujeto femenino que contiene el feto. En general, la muestra del ácido nucleico útil para los métodos de la presente invención puede ser una muestra de ADN, muestra de ARN, o una combinación de estas incluyendo cualquiera ADN, ADNc, o ARN derivado de una o más muestras de ácidos nucleicos aislados de una o más muestras de moco cervical.

50 En una modalidad, la muestra de ácido nucleico útil para los métodos de la presente invención es una muestra de ADN. En otra modalidad, la muestra de ácido nucleico útil para los métodos de la presente invención es sustancialmente libre de proteínas o polipéptidos. La muestra de ácido nucleico útil para los métodos de la presente

invención se aísla mediante cualquier método de fraccionamiento de tamaño conocido o descubierto más tarde incluyendo, pero no limitando a, electroforesis en gel, electroforesis capilar, matrices de exclusión por tamaño, y columnas de fraccionamiento por tamaño.

5 La muestra de ácido nucleico útil para los métodos de la presente invención está en un rango de tamaño representativo, o sustancialmente asociado, con ácido nucleico fetal. En otra modalidad, la muestra de ácido nucleico útil para los métodos de la presente invención está en un rango de tamaño sustancialmente libre de ácido nucleico a partir del huésped del feto. Por ejemplo, la muestra de ácido nucleico útil para los métodos de la presente invención puede estar en un rango de tamaño de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 pares de base, de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 pares de base, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200
10 pares de base, de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 pares de base, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 pares de base o una combinación de estos, y opcionalmente, no contiene una cantidad sustancial, *por ejemplo*, más de 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, o 5% de ácidos nucleicos de cualquier otro intervalo de tamaño o fuente.

15 De acuerdo con la presente invención, la muestra de ácido nucleico útil para los métodos de la presente invención ha sido aislada de una muestra de moco cervical a partir del huésped de un feto, *por ejemplo*, una mujer embarazada. La muestra de moco cervical de la presente invención podría haber sido obtenida a partir del huésped de un feto, en cualquier momento durante el embarazo, *por ejemplo*, durante el primer o segundo trimestre, por cualquier medio conocido hasta ahora o descubierto más tarde en la técnica. En general, una muestra de moco cervical, *por ejemplo* una muestra de moco endocervical, se puede obtener utilizando técnicas tales como hisopos transcervicales, lavado endocervical, raspado cervical, citocepillo, aspiración, lavado intrauterino, o una combinación de estos.
20

En una modalidad, la muestra de moco cervical de la presente invención es una muestra fresca, *por ejemplo*, sin procesamiento o conservación sustancial. En otra modalidad, la muestra de moco cervical es una muestra conservada de una muestra fresca, *por ejemplo*, conservada en un medio de transporte o conservación, acuoso apropiado, o alternativamente, una muestra de un medio que contiene ácidos nucleicos percolados de una o más muestras de moco cervical. Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que el ácido nucleico se difunde fuera del moco cervical en un fluido que está en contacto con el moco. El ácido nucleico fetal estará presente tanto en la muestra de moco cervical así como en el medio en el cual, la muestra se almacena y/o transporta. En consecuencia, la muestra de ácido nucleico útil para los métodos de la presente invención se puede obtener directamente a partir de la muestra de moco cervical, o del medio, *por ejemplo*, medio de conservación, medio de transporte, o cualquier medio acuoso, es decir en contacto con el moco cervical. Ejemplos de medio de transporte incluyen, pero no se limitan a, cualquier medio de cultivo de tejido conocido por un experto en la técnica, *por ejemplo*, medio RPMI-1640. En incluso otra modalidad, la muestra de moco cervical de la presente invención se mantiene o almacena entre aproximadamente 4°C y aproximadamente 20°C, *por ejemplo*, en un medio basal bajo en calcio.
25

30 En incluso otra modalidad, la muestra de moco cervical de la presente invención es una muestra tratada, *por ejemplo*, una muestra fresca o muestra conservada tratada con cualquier reactivo(s) apropiado(s) para facilitar la disolución mucosa, que a su vez, ayuda en el aislamiento de los componentes de ácido nucleico a partir de la muestra. Por ejemplo, la muestra de moco cervical puede ser una muestra tratada con agente(s) mucolítico(s) o mucinasa(s), *por ejemplo*, N-acetil-L-cisteína, L-cisteína, ditiotreitól (DTT), bromhexina clorhidrato, y cualquiera de las hialuronidasas, incluyendo hialuronato liasa, hialuronoglucosaminidasa, y hialuronglucuronidasa. En otro ejemplo, la muestra de moco cervical de la presente invención es una muestra tratada con enzima(s), *por ejemplo*, la(s) enzima(s) de hidrólisis del azúcar tales como β -galactosidasa o invertasa, o proteinasa, o pepsina o combinaciones de estas. La muestra de moco cervical también puede ser tratada con productos químicos conocidos en la técnica para inducir la apoptosis para liberar el ácido nucleico fetal.
35

40 En otra modalidad, la muestra de moco cervical de la presente invención es una muestra tratada para enriquecer el ácido nucleico fetal y/o reducir el contenido de ácido nucleico maternal. Por ejemplo, la muestra de moco cervical se puede tratar para reducir o degradar cualquier ácido nucleico, *por ejemplo*, ADN que es característico del ADN materno. Uno de dichos ácidos nucleicos es el ADN materno hipermetilado. Se puede utilizar cualquier medio para reducir, degradar, o remover selectivamente el ADN materno hipermetilado, incluyendo sin ninguna limitación, las enzimas de restricción específicas de metilación tales como McrBC (BioLabs), anticuerpos específicos para ADN materno hipermetilado tales como anticuerpos anti-5'-metil-citosina y/o anticuerpos anti-proteína -2 de enlace metilCpG (MeCP2), o ligandos o proteínas tales como MeCP2 que unen específicamente las islas CpG metiladas en ADN materno.
45

50 De manera alterna, el ácido nucleico fetal se puede enriquecer utilizando marcadores específicos de ácidos nucleicos fetales. Por ejemplo, se puede utilizar ADN hipometilado maspina como un marcador del ADN fetal. En un caso, se puede tratar el ADN de la mucosa cervical total con bisulfito de sodio, el cual puede inducir cambios químicos en el ADN fetal hipometilado mediante el cual una citosina no metilada de ADN fetal se convierte en uridina (U). Tal cambio se puede utilizar para aislar o enriquecer preferencialmente el ADN fetal, *por ejemplo*, para amplificar preferencialmente el ADN fetal que contiene uridina(s) convertida a partir de la citosina(s).
55

De acuerdo con la presente invención, la muestra de ácido nucleico de la presente invención se puede utilizar para realizar el cribado o las pruebas genéticas de un feto. En particular, la muestra de ácido nucleico de la presente invención se puede utilizar para el cribado o la prueba de la composición genética de un feto, *por ejemplo*, composición cromosómica, composición génica, o marcador genético o patrón de huella digital de un feto. En una modalid

5 modalidad, el cribado o la prueba de una composición genética de un feto incluye el sondeo de anomalías cromosómicas incluyendo, sin ninguna limitación, monosomía, monosomía parcial, trisomía, trisomía parcial, translocación cromosómica, duplicación cromosómica, delección cromosómica o microdelección, e inversión cromosómica.

En general, el término "monosomía" se refiere a la presencia de solo un cromosoma de un par de cromosomas. La monosomía es un tipo de aneuploidía. La monosomía parcial ocurre cuando el brazo largo o corto de un cromosoma se pierde. Los trastornos genéticos humanos comunes que surgen de la monosomía incluyen: X0, un solo cromosoma X en lugar de los dos (XX) habituales vistos en una mujer normal (también conocido como síndrome de Turner); síndrome del cri du chat, una monosomía parcial causada por una delección del final del brazo corto p (de la palabra petit, Francés para pequeño) del cromosoma 5; y Síndrome de Delección 1p36, una monosomía parcial causada por una delección en el final del brazo corto p del cromosoma 1.

10 En contraste, el término "trisomía" se refiere a la presencia de tres, en lugar de los dos cromosomas, normales de un tipo numerado particular en un organismo. En consecuencia, la presencia de un cromosoma 21 extra, se conoce como trisomía 21. La mayoría de las trisomías, como la mayoría de otras anomalías en el número de cromosomas, causa defectos distintivos en el nacimiento. Muchas trisomías causan aborto involuntario o muerte a una edad temprana. Una trisomía parcial ocurre cuando parte de un cromosoma extra se une a uno de los otros cromosomas, o si uno de los cromosomas tiene dos copias de parte de su cromosoma. Una trisomía en mosaico es una condición donde el material cromosómico extra, existe solo en algunas de las células del organismo. Mientras que una trisomía puede ocurrir con cualquier cromosoma, pocos bebés sobreviven al nacimiento con la mayoría de las trisomías. Los tipos más comunes que sobreviven sin aborto espontáneo en humanos incluyen: Trisomía 21 (síndrome de Down);

20 Trisomía 18 (síndrome de Edwards); Trisomía 13 (síndrome de Patau); Trisomía 9; Trisomía 8 (síndrome 2 de Warkany); Trisomía 16 (que es la más común de las trisomías en humanos, que ocurre en más del 1% de embarazos. Esta condición, sin embargo, usualmente resulta en aborto involuntario espontáneo en el primer trimestre). La trisomía que involucra los cromosomas sexuales incluyen: XXX (Síndrome del Triple X); XYY (síndrome de Klinefelter); y XYY (Síndrome XYY).

30 En otra modalidad, el cribado o la prueba de una composición genética de un feto incluyen sondeo de anomalías del gen o del alelo. Por ejemplo, una o más mutaciones tales como mutaciones puntuales, inserciones, delecciones en uno o más genes.

En incluso otra modalidad, el cribado o la prueba de una composición genética de un feto incluye el sondeo de uno o más patrones del polimorfismo o marcadores genéticos, *por ejemplo*, secuencias aleatorias cortas repetidas (STRs), polimorfismos de nucleótido único (SNPs), etc.

35 En incluso otra modalidad, el cribado o prueba de una composición genética de un feto incluye sondeo de cualquier anomalía genética correspondiente a o asociada con una condición o trastorno, *por ejemplo*, Fibrosis Quística, Anemia de Célula Falciforme, Fenilcetonuria, Enfermedad de Tay-Sachs, Hiperplasia Suprarrenal, Anemia Fanconi, Atrofia Muscular Espinal, Distrofia Muscular de Duchenne, Enfermedad de Huntington, Talasemia Beta, Distrofia Miotónica, Síndrome del X Frágil, Síndrome de Down, Síndrome de Edwards, Síndrome de Patau, Síndrome de Klinefelter. Síndrome del Triple X, Síndrome XYY, Trisomía 8, Trisomía 16, Síndrome de Turner, Translocación Robertsoniana, Síndrome de Angelman, Síndrome de DiGeorge, Síndrome de Wolf-Hirschhorn, Síndrome de RhD, Esclerosis Tuberosa, Ataxia Telangiectasia, y Síndrome de Prader-Willi..

40 En incluso otra modalidad, el cribado o la prueba de una composición genética de un feto incluye el sondeo de cualquier anomalía genética que no se asocia únicamente con el cromosoma Y.

En incluso otra modalidad, el cribado o la prueba de una composición genética de un feto incluye el sondeo de cualquier condición genética correspondiente a o asociada con el género o la paternidad del feto.

Por lo general, las pruebas genéticas proporcionadas por la presente invención utilizan la muestra de ácido nucleico de la presente invención ya sea directamente o como plantilla para ensayos de pruebas de la composición genética "basadas en la amplificación", incluyendo sin ninguna limitación, reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real ("RT-PCR"), reacción en cadena de la ligasa ("LCR"), replicación de secuencia autosostenida ("3SR") también conocida como amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico ("NASBA"). Amplificación por Q-B replicasa, amplificación por círculo rodante ("RCA"), amplificación mediada por la transcripción ("TMA"), amplificación de ADN ligador-asistido ("LADA"), amplificación por desplazamiento múltiple ("MDA"), tecnología invasora y amplificación por desplazamiento de hebra ("SDA"). La amplificación de un fragmento de nucleótido utilizando un par de cebadores específicos para un alelo indica la presencia del alelo.

50 55

En una modalidad, los ensayos de pruebas de la composición genética "basados en la amplificación" de la presente invención, incluyen el uso de cebadores para generar amplicones menores de aproximadamente 200 pares de base, menores de aproximadamente 150 pares de base, o entre aproximadamente 75 a aproximadamente 150 pares de base. Los cebadores de la invención ejemplares utilizados en los ensayos basados en la amplificación se proveen en estos documentos. En una modalidad, los cebadores de la invención incluyen, pero no se limitan a, los pares de cebadores de SEQ ID NOs: 1 y 2; SEQ ID NOs: 3 y 4; SEQ ID NOs: 5 y 6; SEQ ID NOs: 9 y 10; SEQ ID NOs: 11 y 12; y SEQ ID NOs: 13 y 14. En otra modalidad, los cebadores ejemplares de la invención incluyen, pero no se limitan a, los conjuntos de cebadores enumerados en las Tablas 2, 3, 4 y 5.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la invención provee un método de aislamiento de una muestra de ácido nucleico fetal. El método comprende el aislamiento, mediante el fraccionamiento de tamaño, una o más muestras de ácidos nucleicos a partir de una muestra de moco cervical obtenida de un huésped materno de un feto, en un rango de tamaño enriquecido con ácidos nucleicos fetales. Ejemplos de tal rango de tamaño incluyen sin ninguna limitación de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 pares de base, de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 pares de base, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 pares de base, de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 pares de base, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 pares de base o una combinación de estos. En una modalidad, la muestra de ácido nucleico no contiene una cantidad sustancial, *por ejemplo*, más de 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, o 5% de ácidos nucleicos a partir de cualquier otro rango de tamaño o fuente.

La divulgación también provee una muestra aislada de ácido nucleico, útil para pruebas genéticas de un feto. La muestra de ácido nucleico, *por ejemplo*, se puede obtener una muestra de ADN, mediante el aislamiento de fragmentos de ácido nucleico de aproximadamente 50 pares de base a aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500, o 1000 pares de base en longitud de una muestra de moco cervical obtenida de un sujeto femenino que contiene el feto. En una modalidad, estos fragmentos de ácido nucleico se obtienen a partir del ácido nucleico total aislado a partir de la muestra de moco cervical, mediante un método de fraccionamiento de tamaño. En otra modalidad, el ácido nucleico aislado es sustancialmente libre de componentes no-ácido nucleico.

La divulgación también provee kits útiles para pruebas o cribado genético de un feto. En una modalidad, el kit contiene uno o más pares de cebadores útiles para ensayos de pruebas de la composición genética y opcionalmente una o más sondas útiles para detectar producto(s) amplificado(s) por los cebadores. En otra modalidad, el kit contiene uno o más pares de cebadores útiles para la prueba de uno o más polimorfismos o marcadores genéticos de un feto. En incluso otra modalidad, el kit contiene uno o más pares de cebadores que son útiles para la generación de amplicones menores de aproximadamente 200 pares de base, menores de aproximadamente 150 pares de base, o entre aproximadamente 75 a aproximadamente 150 pares de base. En incluso otra modalidad, el kit contiene uno o más pares de cebadores para uno o más cromosomas designados y los cebadores se seleccionan de los conjuntos de cebadores enumerados en las Tablas 2, 3, 4 o 5. En otra modalidad, el kit contiene los pares de cebadores de SEQ ID NOs: 1 y 2; SEQ ID NOs: 3 y 4; SEQ ID NOs: 5 y 6; SEQ ID NOs: 9 y 10; SEQ ID NOs: 11 y 12; SEQ ID NOs: 13 y 14; o una combinación de estas. El kit también opcionalmente puede contener una o más sondas y/u otros reactivos apropiados útiles para detectar el o los productos amplificados, mediante los cebadores. Además, el kit puede comprender las instrucciones para el uso del par de cebadores para la prueba de la composición genética de un feto.

En incluso otra modalidad, el kit contiene una o más muestras de ácidos nucleicos de la presente divulgación. En otra modalidad, el kit contiene la muestra de moco cervical de la presente divulgación y una instrucción para el aislamiento de la muestra de ácido nucleico de la presente divulgación a partir de la muestra de moco cervical.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos tienen la intención de ilustrar, pero no limitar la invención de ninguna manera, estado, o forma, ya sea explícita o implícitamente. Mientras que son típicos de aquellos que se podrían utilizar, otros procedimientos, metodologías, o técnicas conocidas por los expertos en la técnica alternativamente se pueden utilizar.

Ejemplo 1

Este Ejemplo describe la recolección y el aislamiento del ADN fetal de mujeres embarazadas.

Las muestras de mucosa cervical se obtuvieron de los pacientes, después de la debida autorización, mediante el método de citocepillo. En el método de citocepillo, un citocepillo de frotis de Papanicolau (*por ejemplo*, MedScand-AB, Malmo, Sweden) se insertó a una profundidad máxima de 2 cm y se retira mientras que se rota una vuelta completa (i.e., 360°). Con el fin de retirar las células transcervicales atrapadas en el cepillo, el cepillo se agitó en un tubo de ensayo que contiene 2-3 ml de un medio de cultivo de tejido (*por ejemplo*, medio RPM1-1640, disponible de ATCC, Virginia) en la presencia de 1% de antibiótico Penicilina Estreptomina. Con el fin de concentrar las células

5 transcervicales sobre portaobjetos para microscopio, los portaobjetos con citospina se prepararon utilizando *por ejemplo*, una Cytofunnel Chamber Cytocentrifuge (Thermo-Shandon, England). Las condiciones utilizadas para la citocentrifugación dependen de la turbidez de la muestra transcervical; si la muestra contenía solo unas pocas células, las células primero se centrifugan durante cinco minutos y luego se suspenden con 1ml de medio fresco. Una vez preparada, los portaobjetos con citospina se pueden mantener en 95% de alcohol hasta su posterior uso.

10 Se extrajo el ADN de las muestras mucosas, tejidos fetales o el medio de transporte utilizando el kit Roche's Apoptotic DNALadder siguiendo el protocolo del fabricante con una ligera modificación. Las muestras mucosas se incubaron con un volumen igual de solución reguladora de lisis, durante 30 minutos a 2 horas o hasta que todas las mucosas se han disuelto. Algunas muestras necesitaron ser homogeneizadas con una aguja larga de 1,5 pulgadas de calibre 21, para facilitar la disolución completa de la mucosa. El ADN de la mucosa total luego fue fraccionado por tamaño en PAGE al 10%, también conocido como gel TEB al 10% (Invitrogen), bajo condiciones no-desnaturalizantes, y la banda pequeña, de ADN de longitud de 100-250 pares de base (ver Figura 1) se cortó, después de la tinción del gel con tinte SYBR Gold. El ADN fetal a partir del gel fue extraído remojando el gel triturado en acetato de sodio 0.3M (pH 5.5) a 37°C durante la noche, seguido por la desalación del ADN utilizando el kit de Purificación de ADN Genómico Promega Wizard SV.

Ejemplo 2

Este Ejemplo demuestra que el ADN obtenido a partir de las muestras de mucosa cervical después de la purificación PAGE es en efecto ADN fetal.

20 El ADN total obtenido a partir del hisopo cervical, se fraccionó por tamaño sobre PAGE al 10%, y la banda pequeña, de ADN de 50-250 pares de base (ver Figura 1) se cortó. El ADN fue extraído del PAGE utilizando solución reguladora de Enlace de Membrana Promega, y su concentración se determinó, con un Espectrofotómetro NanoDrop-1000.

10-20 ng de este ADN fraccionado por tamaño se amplificó, mediante PCR con los cebadores designados para amplificar las regiones STR cortas (*por ejemplo*, D22S1045, CSF1PO, D2S441 para detalles ver la Tabla 1).

25 Los componentes de reacción de PCR típicos fueron:

dNTP 10 mM	2.0 µl
MgCl ₂ 25 mM	1.5 µl
Cebadores 50 mM	0.5 µl
Plantilla 1 µg/µl	2.0 µl
Ampli Taq Gold	0.5 µl
10X Solución reguladora PCR	2.5 µl
Agua	16.0 µl

El ciclo de PCR típico consistió de: Temperatura de desnaturalización de 94 °C, durante 30 seg., la temperatura de hibridación varía de 56 a 62°C dependiendo de la longitud del cebador, la extensión de hizo a 72 °C. El número de ciclos utilizados osciló de 26 a 40.

30 Estos cebadores también fueron utilizados para la reacción de PCR con el ADN extraído a partir de tejidos fetales y el ADN total de la mucosa, sin fraccionar. En las FIG. 2 y FIG. 3 se muestran los electroferogramas de PCR que demuestran que la fracción de ADN de 50-200 pares de base resultó en los mismos alelos fetales como los vistos en PCR de tejido fetal.

Ejemplo 3

Este Ejemplo demuestra que los marcadores mini-STR detectan los alelos fetales.

5 Los marcadores de la invención mini-STR se utilizaron para detectar los alelos fetales a partir del ADN extraído de las muestras clínicas de mucosa cervical. La Tabla 1, a continuación, resume los resultados obtenidos. D1S1677-F y -R, D22S 1045-F y -R, D10S1248-F y -R, TPOX, Mini-LFG33-F y -R, y Mini-LFG34-F y -R son los cebadores ejemplares de la invención.

Tabla 1: Detección del Alelo Fetal a partir de Muestras de Moco Cervical Clínico

ID de Muestra	Tipo de Muestra	Gel Enriquecido	Análisis PCR						Alelo Fetal	Presencia de Alelo Fetal
			Conjunto Cebador Informativo	Secuencia	Sec. ID No.	Alelos Maternales	Alelo Fetal			
7601	Medio de Transporte		D1S1677-F	FAM- TTCTGTTGGTATAGAGCAGTGTTT	SEQ ID NO: 1	90.21, 94.91	99.91	Si		
			D1S1677-R	GTGACAGGAAGGACGAATG	SEQ ID NO: 2					
7602	Medio de Transporte		D22S1045-F	FAM- ATTTTCCCGATAGTAGTCT	SEQ ID NO: 3	95.11, 97.81	85.61	Si		
			D22S1045-R	GCGAATGTATGATTGGCAATATTTTT	SEQ ID NO: 4					
7604	Medio de Transporte		02SIO45-F	FAM- ATTTTCCCGATAGTAGTCT	SEQ ID NO: 3	98.15	92.44			
			D22S1045-R	GCGAATGTATGATTGGCAATATTTTT	SEQ ID NO: 4					
7843	Medio de Transporte	8% PAGE	D10S1248-F	FAM- TTAATGAATTGAACAAATGAGTGAG	SEQ ID NO: 5	104.21	10.6.55			
			D10S1248-R	GCAACTCTGGTTGATTGTCTTCAT	SEQ ID NO: 6					
7845	Medio de Transporte		D10S1240-F	TAMRA-TCACCTGTCCCAGCTACTG	SEQ ID NO: 7	101.33	104.66	Si		
			D10S1240-R	AAAATTACTGGTACACTTGATAGCT	SEQ ID NO: 8					
7846	Medio de Transporte		D1S1677-F	FAM- TTCTGTTGGTATAGAGCAGTGTTT	SEQ ID NO: 1	97.11	105.71	Si		
			D1S1677-R	GTGACAGGAAGGACGAATG	SEQ ID NO: 2					
8034	Medio		D1S1677-F	FAM- TTCTGTTGGTATAGAGCAGTGTTT	SEQ ID NO: 1	93.67	46.22	Si		
			D1S1677-R	GTGACAGGAAGGACGAATG	SEQ ID NO: 2					
8379	Moco	PAGE al 10%	TPOX-F	NED- CTTAGGGAACCCCTCACTGAATG	SEQ ID NO 9	148.55	160.32	Si		
			TPOX-R	GTCC TTGTCAGCGTTTATTGCG	SEQ ID NO: 10					
9558	Mucous Muccus	1.5% Agarosa	Profiler-F	comercialmente disponible de ABI		172.1, 176	125, 245	Si		
			Profiler-R	comercialmente disponible de ABI						
9560	Mucous	1.5 % Agarosa	Mini-LFG34-F	FAM-CACAAGGCAGATAAAGGGA	SEQ ID NO: 11	134, 150	142	Si		
			Mini-LFG34-R	TTCATAGTCTGTCTTGCTTGCTCA	SEQ ID NO: 12					
9561	Mucous Muccus	1.5% Agarosa	Mini-LFG33-F	TAMRA-CACCATACCCAGCCTTACTG	SEQ ID NO: 13	118, 122	116	Si		
			Mini-LFG33-R	CATGTTACTGTGCTGAATATTGTAG GC	SEQ ID NO: 14					
9561	Mucous Muccus	1.5% Agarosa	Mini-LFG34-F	FAM-CACAAGGCAGATAAAGGGA	SEQ ID NO: 13	135, 150	146	Si		
			Mini-LFG34-R	TTCATAGTCTGTCTTGCTTGCTCA	SEQ ID NO: 14					

Tabla 2: Cebadores Mini-STR para el Cromosoma 21

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID NO:	Longitud	Cromosoma
p21M-1	Mini LFG20-F	6-FAM	TTGAGAAGGCCCCACCTATG	15	20	21
p21M-2	Mini LFG20-R		AGAAGGCCCCCTGTGTATG	16	20	21
p21M-3	Mini LFG21-F	HEX	GCGAATCATGACACTAATTTTGG	17	23	21
p21M-4	Mini LFG21-R		TGGAGAAGAAAAAGAGCCCTGA	18	22	21
p21M-5	Mini LFG24-F	NED	GGTTCMGGAAAAATTGTTAGGC	19	24	21
p21M-6	Mini LFG24-R		TGCTCTGGACTTACAGCATCAA	20	22	21
p21M-7	Mini LFG26-F	6-FAM	CCCTTAAAAACCATATTTTTACACCTC	21	25	21
p21M-8	Mini LFG26-R		AGCCTGGGTGACAGAGCAAG	22	20	21
p21M-9	Mini LFG29-F	HEX	TTGCTTGAGAGGTAAAAAGAAAA	23	23	21
p21M-10	Mini LFG29-R		GAGCAACAGAGCGAGATTCTG	24	21	21
p21 M-11	Mini LFG33-F	NED	CACCATACCCAGCCCTACTG	25	20	21
p21M-12	Mini LFG33-R		CATGTTACTGTGCTGAATATTGTAGGC	26	27	21
p21M-13	Mini LFG34-F	6-FAM	GGCAGAATAAAGGGATTATTGC	27	22	21
p21M-14	Mini LFG34-R		TTCATAGTCTGTCTTGTCTTGTCTCA	28	26	21
p21M-15	Mini D21S2054-F	NED	GCAGTAAATGTCTATGAACAAGG	29	24	21
p21M-16	Mini D21S2054-R		TGATAAATAGTGAATATAGTTGACAGC	30	27	21
p21M-17	Mini D21S1904-F	*	CAACAATTCCTTCTAATTTTCCA	31	23	21
p21M-18	Mini D21S1904-R		TGCTCTGGTTTCCCCCATCTCT	32	20	21
p21M-19	Mini D21S1911-F	*	TGAGGAGACATCCCTTGACAAAA	33	22	21

Nota: * = 6-FAM, VIC, NED, JOE, ROX, PET, TAMRA o 5-FAM

(continuación)

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID NO: 34	Longitud	Cromosoma
p21M-20	Mini D21S1911-R	*	CATACACACAGCAAGTATGAGTGA	SEQ ID NO: 34	24	21
p21 M-21	Mini D21S1256-F	*	GCCTATGGTCCCATCATAACA	SEQ ID NO: 35	21	21
p21M-22	Mini D21S1256-R	*	TCCACAGTTCTTAGATGGCTTT	SEQ ID NO: 36	22	21
p21M-23	Mini D21S1899-F	*	TGAAAACGTGTGACAGATGAA	SEQ ID NO: 37	22	21
p21M-24	Mini D21S1899-R	*	AATGGCAGGATTTCTTTTT	SEQ ID NO: 38	20	21
p21M-25	Mini D21S1922-F	*	TGTCAAAATATGTGGATTAGACAAAA	SEQ ID NO: 39	26	21
p21M-26	Mini D21S1922-R	*	TCACTGGTATACTGTGATGTGTC	SEQ ID NO: 40	24	21
p21M-27	Mini D21S1884-F	*	AAAAATTATTGATAACGTTTCAGTAT	SEQ ID NO: 41	25	21
p21M-28	Mini D21S1884-R	*	TTTCTAACAAATATGTACCCACTGGA	SEQ ID NO: 42	25	21
p21 M-29 :	Mini D21S1914-F	*	CATTGGCCCTTCTGTCAAAT	SEQ ID NO: 43	20	21
p21M-30	Mini D21S1914-R	*	TCTGCAGAAATTCATTTGCTGT	SEQ ID NO: 44	22	21
p21M-31	Mini D21S263- F	*	CAAAC TTGAAATATGAAAAAGTCATCA	SEQ ID NO: 45	27	21
p21M-32	Mini D21S263- R	*	TTTCTGTATTTCTGAAACAACATTT	SEQ ID NO: 46	26	21
p21M-33	Mini D21S1252-F	*	TCTGTCTTTGTCTCACTATCTGTCTG	SEQ ID NO: 47	26	21
p21M-34	Mini D21S1252-R	*	TAGGGTGAGGACCCCTTTCT	SEQ ID NO: 48	20	21
p21M-35	Mini D21S1919-F	*	CCTGGATTATTTGTTCAAAGTCAG	SEQ ID NO: 49	24	21
p21M-36	Mini D21S1919-R	*	TCTCATGTTCCCTTGGCCTGT	SEQ ID NO: 50	20	21
p21M-37	Mini D21S1255-F	*	ATTTTGGCACATAGAGAAAAATA	SEQ ID NO: 51	23	21
p21M-38	Mini D21S1255-R	*	GCCTGGACATCCTCTTTCT	SEQ ID NO: 52	19	21

(continuación)

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID NO:	Longitud	Cromosoma
p21M-39	Mini D21S266-F	*	AGATGTAGCACAGTTAGATGCAGA	53	24	21
p21 M-40	Mini D21S266-R		AGCAGAAAAAGCCATTCTGG	54	20	21
p21M-41	Mini D21S2058-F	*	GTCATGACCCCTGGCTGTG	55	18	21
p21M-42	Mini D21S2058-R		AGGGCAGGCTGTGCTCAT	56	18	21
p21M-43	Mini D21S1431-F	*	GGGACCATTTTAGATATTCTGCT	57	23	21
p21M-44	Mini D21S1431-R		GCACTTAACAAGCACTGAATCAA	58	23	21
p21M-45	Mini D21S259-F	*	TCCTGAAAGGAAGAATGTGGTC	59	21	21
p21M-46	Mini D21S259-R		ATGCATGGTCGTGTGTGTG	60	19	21
p21M-47	Mini D21S270-F	*	TTTTTCAAAAATCAAAAAAGATAGTA	61	25	21
p21M-48	Mini D21S270-R		GGAGGGCATCTGGGTAATTT	62	20	21
p21M-49	Mini D21S1912-F	*	GCCATCAGCCCTCATAACAGA	63	20	21
p21M-50	Mini D21S1912-R		GAATTTGGGGGACGCAGT	64	18	21
p21M-51	Mini D21S260-F	*	CGAGAAGTTTCCCATGCATTT	65	21	21
p21M-52	Mini D21S260-R		AAATTCAGTGATGGGAAGAAGG	66	22	21
p21M-53	Mini D21S261-F	*	CCTAAAACAGCATCAACAGAAA	67	22	21
p21M-54	Mini D21S261-R		TTGGACCTTTTGATTTTTTCCT	68	21	21
p21 M-55	Mini D21S262-F	*	CAGCAACTCCCACCTTCTGAC	69	20	21
p21M-56	Mini D21S262-R		TTGTTGTTGAGTGAAGAAGATAGAGAAA	70	27	21
p21M-57	Mini D21S1892-F	*	AAATCTGAATTTATGTCCAATCAAAA	71	25	21

Nota: * = 6-FAM. VIC, NED, JOE, ROX, PET, TAMRA o 5-FAM

(continuación)

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID NO:	Longitud	Cromosoma
p21M-58	Mini D21S1892-R		TGAGTTTTGGAAAGAGAGAGAGAGAGA	72	25	21
p21M-59	Mini D21S272- F	*	AAAAGGGGATCCAATATGAAA	73	21	21
p21M-60	Mini D21S272- R		TGGAACAATTTTATCCTTAGTTTGTG	74	26	21
p21M-61	Mini D21S1893-F	*	TATGCACACCACACGGGACAC	75	20	21
p21M-62	Mini D21S1893-R		GTTCCGGGGAAGTTTATGTC	76	20	21
p21M-63	Mini D21S265- F	*	TGGCAAAGAGAAACAACAGCA	77	20	21
p21M-64	Mini D21S265- R		TTCTGTGAATATGGGTTCTGGA	78	22	21
p21 M-65	Mini D21S267- F	*	GGGGATTATTTATGTAGAAAATGAGA	79	26	21
p21M-66	Mini D21S267- R		GGTGACAGACCCTGTCTCTAAAA	80	23	21
p21M-67	Mini D21S268- F	*	TGGGCAACAGAGTGAGACAG	81	20	21
p21M-68	Mini D21S268- R		CACATCCTTGCCAAACACTTG	82	20	21
p21M-69	Mini D21S269- F	*	GATACTGAATCATCCCTTTCATTC	83	24	21
p21M-70	Mini D21S269- R		TTCCGTTATTAATTTTATTCTGAGG	84	25	21
p21M-71	Mini D21S1902-F	*	GAGTGAGAGACAGACAGAGAGACG	85	24	21
p21M-72	Mini D21S1902-R		CAGTAGDGCAGACTATTTTACTC	SEQ ID NO:86	24	21
p21M-73	Mini D21S1253-F	*	ATGGGTGACAGAGCGGAGACT	SEQ ID NO: 87	20	21
p21M-74	Mini D21S1253-R		TTCAGAGCCTGGGTTAAACA	SEQ ID NO: 88	20	21
p21M-75	Mini D21S1254-F	*	AATGACCATCCITAAAAACAATTT	SEQ ID NO: 89	24	21
p21M-76	Mini D21S1254-R	*	GTGGCTGAGCGGAGACTCTGT	SEQ ID NO: 90	20	21

(continuación)

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID NO:	Longitud	Cromosoma
p21M-77	Mirni D21S1907-F	*	TCACTCAATTTATGAGAGCGAAA	91	23	21
p21M-78	Mirni D21S1907-R		TCAGCCTTTGATATGTGCATT	92	21	21
p21M-79	Mirni D21S1909-F	*	GCATGAGTGGAAAAATGTGAAA	93	22	21
p21M-80	Mirni D21S1909-R		CTGAGTCAAGAGCAGGCAACT	94	21	21
p21M-81	Mirni D21S1910-F	*	CCAATGCTTTTGAATTTTAAGC	95	22	21
p21M-82	Mirni D21S1910-R		CGGCAAGTAGTATTTAATGTGCT	96	24	21
p21M-83	Mirni D21S1257-F	*	TTTCATTCACCGGTTTTTCCT	97	20	21
p21M-84	Mirni D21S1257-R		TTTTAGGTATATCTGCCATAATGC	98	25	21
p21M-85	Mirni D21S1258-F	*	GGGAAGGAAAAATAAAGCATTGA	99	22	21
p21 M-86	Mirni D21S1258-R		GCACAAAAACAAAAATCTGTCACT	100	23	21
p21 M-87	Mirni D21S1913-F	*	TTGCTGGGTTGTTAAACTTATTCA	101	24	21
p21 M-88	Mirni D21S1913-R		AAAGGTGAACGCTGGTATCG	102	20	21
p21 M-89	Mirni D21S1259-F	*	GACCCCAACACTGGACACA	103	19	21
p21 M-90	Mirni D21S1259-R		CTTGTAAGTGGCAGTGAG	104	20	21
p21M-91	Mirni D21S1915-F	*	CATGCTCATAGATATGCACACA	105	22	21
p21M-92	Mirni D21S1915-R		GATTGTCCAGGCTCAGGT	106	20	21
p21M-93	Mirni D21S1916-F	*	CCAAGGTGAATTCCCAATTT	107	20	21
p21M-94	Mirni D21S1916-R		GCGGCACATTTTCACAGACT	108	20	21
p21M-95	Mirni D21S1917-F	*	TGAACATTAACACTGGTAACTTTACAT	109	27	21

Nota: * = 6-FAM. VIC, NED, JOE, ROX, PET, TAMRA o 5-FAM

(continuación)

Nota: * = 6-FAM. VIC, NED, JOE, ROX, PET, TAMRA o 5-FAM

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID NO:	Longitud	Cromosoma
p21M-96	Mini D21S1917-R		TGTCCTCTCCATTTTGCTTG	110	20	21
p21M-97	Mini D21S1918-F		CTTCTCTCCAATTCCTCATGC	111	20	21
p21M-98	Mini D21S1918-R		GAAGGAAAAAATTTGGGATTTCCG	112	21	21
p21M-99	Mini D21S1920-F	*	CAGCCTGGGTGACAGAGAC	113	19	21
p21M-100	Mini D21S1920-R		TGTTGATGAAGCATTACTCATACAT	114	26	21
p21M-101	Mini D21S1921-F	*	TCCCCCTAAATGGACAACCTTT	115	21	21
p21M-102	Mini D21S1921-R		GCTTTGTTTTCCCTTAGCTTCC	116	22	21
p21M-103	Mini D21S1883-F	*	TCTGGAATGGTTAAGGCAGAA	117	21	21
p21M-104	Mini D21S1883-R		CACCATTCTCCCTAGCATGA	118	20	21
p21M-105	Mini D21S1885-F		CAAGGTGGAAGGCAGAAGG	119	19	21
p21M-106	Mini D21S1885-R		CGGGCTCTCTCTCTCTCTCT	120	20	21
p21M-107	Mini D21S1886-F		TGCAAGATTTCCCCCTTCTA	121	20	21
p21M-108	Mini D21S1886-R		CTTTGACTCCTCAGCCCGTGT	122	20	21
p21M-109	Mini D21S1887-F		CCTGGCATCTCTGTTTTA	123	19	21
p21M-110	Mini D21S1887-R		AAAGATGATGTCAGGAATGC	124	20	21
p21m-111	Mini D21S1260-F	*	CATCCAAGGGGAACACAAGT	SEQ ID NO:125	20	21
p21M-112	Mini D21S1260-R		GGAAGTAAAAGGCCACAGAGG	126	20	21
p21M-113	Mini D21S1888-F	*	AAAMGGATGTTTGTATGGTAAGA	SEQ ID NO:127	25	21
p21M-114	Mini D21S1888-R		GAACTGTGTGCCAGGAACTG	128	20	21

(continuación)

Nota: * = 6-FAM. VIC, NED, JOE, ROX, PET, TAMRA o 5-FAM

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ NO:	Longitud	Cromosoma
p21M-115	Mini	*	TGTGTGTTTGCATGTATGTGTAGA	129	24	21
p21M-116	Mini		ACAGAAACATGGCTGCCTCT	130	20	21
p21 M-117	Mini	*	GACCACAGATTTCCCAATCG	131	20	21
p21M-118	Mini		AAACCAACTGACTCCCAAACA	132	21	21
p21M-119	Mini	*	CAGAGCGAGACTCCCATCTCA	133	20	21
p21M-120	Mini		GGAACCCCTGGATGTTGCTA	134	20	21
p21M-121	Mini	*	GCTCAATGCTATTGGAGTGC	135	20	21
p21M-122	Mini		TTCACAAAAACAGAACCAACCA	136	21	21
p21M-123	Mini	*	TCTCCCTTGGCAGACTTCTC	137	20	21
p21M-124	Mini		GCCCAGGATGGACAAAGA	138	18	21
p21M-125	Mini		CACATGTGGCCACTGCAC	139	18	21
p21M-126	Mini		CCAGGGATTTGTCTAGAAAAGGA	140	22	21
p21M-127	Mini	*	GCCTAGGCAACCAGAGTGAG	141	20	21
p21M-128	Mini		TGTATTTCTTTTCTTTTAAATGGTGA	142	27	21
p21M-129	Mini	*	CTCTTCAGCAGCCGAGAAAA	143	20	21
p21M-130	Mini		CACCAGAAAAGCAAGGAAGGA	144	20	21
p21M-131	Mini	*	ACACCAGAGGGCAGAGTGAG	145	20	21
p21M-132	Mini		AAAGCACTGTATGTTTCTGTGAGA I	146	24	21
p21M-133	Mini	*	GGTTGTCCAGAGAAAACCAACCA	147	21	21

(continuación)

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID NO:	Longitud	Cromosoma
p21M-134	Mini D21S1901-R	*	CAATTGTGTGAGCCAAATCTCTC	148	22	21
p21M-135	Mini D21S1903-F	*	GGCAATTCCATTAMATAAATCACTC	149	25	21
p21M-136	Mini D21S1903-R	*	GCCCCGGCCCTATCTATCTAT	150	20	21
p21M-137	Mini D21S1905-F		GCATGCTCGCTCTCTCTCTT	151	20	21
p21M-138	Mini D21S1905-R		AACTGGCGGTGTCTACACCATC	152	21	21
p21M-139	Mini D21S1906-F	*	GAGCAAGACTCCATCTCAAAAA	153	22	21
p21M-140	Mini D21S1906-R		AAAGATTGCCCAACAATGG	154	20	21
p21M-141	Mini D21S1908-F	*	TGGGTTCCATAGTTCTAATGTGTG	155	24	21
p21 M-142	Mini D21S1908-R		TCTCTGGCTGGACATACTATTCA	156	23	21
p21M-143	Mini D21S1438-F	*	GGAGAAGGTAGCTAAAAGGATGAAA	157	24	21
p21M-144	Mini D21S1438-R		TGCACCCTAGGACCTAAAGAA	158	21	21
p21M-145	Mini D21S1439-F	*	CCTGATCTGGTCTGTAGCC	159	20	21
p21M-146	Mini D21S1439-R		TGAGMGAATAAAGTGTCTGTC	160	25 21	
p21M-147	Mini ATA42C09-F	*	CAAAGCGAGACCTTTTCTCAA	161	21	21
p21 M-148	Mini ATA42C09-R		CGAGTCATAGATCCATTACCCATT	162	24	21
p21 M-149	Mini D21S1441-F	*	ACAACCGAGCGAGACCTG	163	18	21
p21 M-150	Mini D21S1441-R		GGAAGTGGTGCACAAGATAGTC	164	24	21
p21 M-151	Mini D21S120-F	*	TTGTGGATTTTCCCAATTGAT	165	21	21
p21 M- 152	Mini D21S120-R		TTTGTATTTGCGCTAAAAACAGAGC	166	24	21

(continuación)

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID	Longitud	Cromosoma
p21 M-153	Mini D21S167-F	*	TACCAGCTTCAAACGTGCAG	NO:167	20	21
p21 M-154	Mini D21S167-R		CCTTGCCCTGAAGCACAT	SEQ ID NO:168	18	21
p21 M-155	Mini D21S168-F	*	TGTAGGCTGTTTAGTTGGTGA	SEQ ID NO:169	22	21
p21 M-156	Mini D21S168-R	*	CGGCATCACAGTCTGATAAAA	SEQ ID NO:170	21	21
p21 M-157	Mini D21S210-F	*	TGATAAGCCCTCCCTCACTACTATTTT	SEQ ID NO:171	26	21
p21 M-158	Mini D21S210-R		GCAGCGATAGCTAGTCATAGTGAA	SEQ ID NO:172	24	21
p21 M-159	Mini D21S214-F	*	CCTGCAAGGACACCCAAGTTA	SEQ ID NO:173	20	21
p21 M-160	Mini D21S214-R		TGTTACCTGATTTTCGGTTC	SEQ ID NO:174	21	21
p21M-161	MiniATA116E08-F	*	TGCAAGCCACATCATTTGT	SEQ ID NO:175	19	21
p21M-162	MiniGATA116E08-R		TCGAATCGATAGATAGATAGGTGA	SEQ ID NO:176	24	21
p21M-163	MiniATA148F04-F	*	TGAAACAAGGGAATCTATCATC	SEQ ID NO:177	22	21
p21M-164	MiniATA148F04-R		TGATAAA TAGTGAATA TAGTTGACAGC	SEQ ID NO:178	27	21
p21M-165	MiniATA163G03-F	*	TTGTGGGGCCTTGTAATTGT	SEQ ID NO:179	20	21
p21 M-166	MiniATA163G03-R		CAGGGTCCCTAGAGAGACAGA	SEQ ID NO:180	21	21
p21M-167	D21S2055-F	*	CAGAACCAATAGGCTATCTATCT	SEQ ID NO:181	23	21
p21M-168	D21S2055-R		ACAGTAAATCACTTGGTAGGAGA	SEQ ID NO:182	23	21
p21M-169	MiniD21S1442-F	*	GGGCACCCCTTTTACTTTGG	SEQ ID NO:183	20	21
p21M-170	MiniD21S1442-R		TCACATGAGCCCAATTCCTTATAATAG	SEQ ID NO:184	26	21
p21M-171	MiniGATA29C02-F	*	TCATACATATGTGTGTGTGCAT	SEQ ID NO:185	23	21

Nota: * = 6-FAM. VIC, NED, JOE, ROX, PET, TAMRA o 5-FAM

(continuación)

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID NO:	Longitud	Cromosoma
p21M-172	Mini GATA29C02-R		CACCTTTGTTGCCAAGAGTC	186	20	21
p21M-173	Mini GATA29D01-F	*	TTCTGTAAATGAGTAAGGAGATGACA	SEQ ID NO: 187	27	21
p21M-174	Mini GATA29D01-R		GCATGCGTGTGTGTGTAT	SEQ ID NO: 188	20	21
p21M-175	Mini D21S1433-F	*	GAGCTGAGATCACGACAGTCA	SEQ ID NO: 189	21	21
p21M-176	Mini D21S1433-R		TATTTTCAGGCCAAGCCTTT	SEQ ID NO: 190	20	21
p21M-177	Mini GATA45C03-F	*	GAAACAGAACTAATAGGATCTATCTGC	SEQ ID NO: 191	27	21
p21M-178	Mini GATA45C03-R		GGCAAACAAATAGTTGATAGATGAG	SEQ ID NO: 192	25	21
p21M-179	Mini D21S1446-F	*	TGACCATCTTACTGGTTTATGTATTT	SEQ ID NO: 193	26	21
p21M-180	Mini D21S1446-R		CGAGGCTATTTTACTGGTAACTAACTG	SEQ ID NO: 194	27	21
p21M-181	Mini D21S1270-F	*	GGGCTACATAGAGAAAACAGAACC	SEQ ID NO: 195	23	21
p21M-182	Mini D21S1270-R		ACACACACACACACACATGC	SEQ ID NO: 196	20	21
p21M-183	Mini D21S1436-F	*	GGAAAGAGAAAAGAAAGGAAGGAA	SEQ ID NO: 197	23	21
p21M-184	Mini D21S1436-R		CCATTTATGTCCTATTTCCCTACTCC	SEQ ID NO: 198	25	21
p21M-185	Mini D21S1265-F	*	GGACTCCTCCAGCTGAACTCT	SEQ ID NO: 199	21	21
p21M-186	Mini D21S1265-R		GCACAGTACAGCAAACTTGTCA	SEQ ID NO: 200	22	21
p21M-187	Mini D21S1249-F	*	TTTCCACACGGCTAATCTACTT	SEQ ID NO: 201	22	21
p21M-188	Mini D21S1249-R		TACCTCCCTCCCTCCATCC	SEQ ID NO: 202	19	21

Nota: * = 6-FAM. VIC, NED, JOE, ROX, PET, TAMRA o 5-FAM

(continuación)

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID NO:	Longitud	Cromosoma
p21M-189	Mini D21S1409-F	*	GGGGAATACATTTGTGTAGGTAGG	203	24	21
p21M-190	Mini D21S1409-R		CACTAATACCTGGTGAATGATTCTT	204	25	21
p21M-191	Mini D21S1410-F	*	AAATGAAGATATTTTCTTAGCTTAT	205	25	21
p21M-192	Mini D21S1410-R		GCATTCAATATTTTACTTTTAAGAATC	206	27	21
p21M-193	Mini D21S1250-F	*	GGGTAAAGAAAAATGTGCTCTCTC	207	23	21
p21M-194	Mini D21S1250-R		GGTTCTCCAAGTTCAATGGTG	208	21	21
p21M-195	Mini D21S1251-F	*	CAGCAGAAAAGGGAATAGTTGG	209	21	21
p21M-196	Mini D21S1251-R		CAAGTTAAAAACACAAAATGGAAA	210	24	21
p21M-197	Mini D21S1411-F	*	TGGATGGATGGATAGATACACAG	SEQ ID NO:211	23	21
p21M-198	Mini D21S1411-R		CCCCTCCCAAGCCCTTCTAA	212	19	21
p21M-199	Mini D21S1238-F	*	TCTCTGTGTCTATGTGTGCATGTT	213	24	21
p21M-200	Mini D21S1238-R		GGTTTTGCAAAAGGCAGGTTA	214	20	21
p21M-201	Mini D21S1239-F	*	CACTTTCACAATATGTATTGCTTATCA	215	27	21
p21M-202	Mini D21S1239-R		GGTAGCAATTTCACTCTCTCTTTTC	216	24	21
p21M-203	Mini D21S1408-F	*	GATGACAAGACAGATTAGATAGATTGG	217	27	21
p21M-204	Mini D21S1408-R		CATTGGGCTTATTTTCTTCTCTAT	218	24	21
p21M-205	Mini UT556-F	*	AAAGGCAGGAAGGCAGGA	219	18	21
p21M-206	Mini UT556-R		TTTTCTCTTTTTTGCTTCTCTTTTC	220	25	21
p21M-207	Mini D21S1240-F	*	TGATGTAGTTCACTAGGATGTAGGG	SEQ ID NO:221	25	21

(continuación)

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID	Longitud	Cromosoma
p21M-208	Mini D21S1240-R		CCTGAGACACAAGAGCGGAGA	NO:222	20	21
p21M-209	Mini D21S1412-F	*	CCTGGGTGACAAGAGTGAAA	SEQ ID NO: 223	20	21
p21M-210	Mini D21S1412-R		CACAGAAATTTGTAGAACCACACGC	SEQ ID NO: 224	24	21
p21M-211	Mini D21S1280-F	*	GGCATCAAAAMGGAAGAAA	SEQ ID NO: 225	21	21
p21M-212	Mini D21S1280-R		AAAGCTGAGCTGAATGGTGA	SEQ ID NO: 226	20	21
p21M-213	Mini D21S1413-F	*	GGGAAACCACAGTTATACATTCC	SEQ ID NO: 227	23	21
p21M-214	Mini D21S1413-R		TGTTTACAGTTCTTCACAGAGTTCTT	SEQ ID NO: 228	26	21
p21M-215	Mini D21S1244-F	*	ACCACAGAATTCAGTCCAAAAA	SEQ ID NO: 229	22	21
p21M-216	Mini D21S1244-R		TTATCCCCTGGAGGAACTTG	SEQ ID NO: 230	20	21
p21M-217	Mini D21S1245-F	*	CCAGAAAAATGACACATGAAGGA	SEQ ID NO: 231	22	21
p21M-218	Mini D21S1245-R		GAGATATTGGCCTGTAGTTTTCTTTT	SEQ ID NO: 232	26	21
p21M-219	Mini D21S1414-F	*	GATGTTGTATTAGTCAATGTTCTCCA	SEQ ID NO: 233	26	21
p21M-220	Mini D21S1414-R		TCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTG	SEQ ID NO: 234	24	21
p21M-221	Mini D21S1246-F	*	ATGGGCAAAACAGATGGGTAG	SEQ ID NO: 235	20	21
p21M-222	Mini D21S1246-R		CCATATTATCATCCATCCATCCA	SEQ ID NO: 236	23	21

Nota: * = 6-FAM. VIC, NED, JOE, ROX, PET, TAMRA o 5-FAM

Tabla 3: Cebadores Mini-STR para el Cromosoma 13

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID NO:	Longitud	Cromosoma
p13M-1	Mini D13S1236-F	*	GGGTAACAGCATAAGACCCTGT	237	22	
p13M-2	Mini D13S1236-R		TCACTTTGGTGGCTTTTG	238	20	13
p13M-3	Mini D13S175-F	*	GAATCTGCTGAGAGAGTAGATTTTA	239	27	13
p13M-4	Mini D13S175-R		TGCATCACCTCACATAGGTTACT	240	23	13
p13M-5	Mini D13S1243-F	*	TGCTGACAGGCTACAGAACTTT	241	22	13
p13M-6	Mini D13S1243-R		TCTGCATTRGTAGAAAATAATCTTATC	242	27	13
p13M-7	Mini D13S1304-F	*	ACCAATTATTCCTCCTGAGTCCTCTC	243	24	13
p13M-8	Mini D13S1304-R		ACATTCTAGTGCTACAGGGTATTC	244	24	13
p13M-9	Mini D13S289-F	*	GTCCCACATCTCAATAATCTGATG	245	25	13
p13M-10	Mini D13S289-R		ACTGGTCACCTTCATCACCA	246	20	13
p13M-11	Mini D13S171-F	*	GGAGAAAAGGGGAGGTGTAGA	247	20	13
p13M-12	Mini D13S171-R		CCATCCTCCTCCCTTCTTTTT	248	21	13
p13M-13	Mini D13S219-F	*	TTGCCATGTCAATTGCTACA	249	20	13
p13M-14	Mini D13S219-R		TGTTTTCTTGACTTAACATTTTCTTCT	250	26	13
p13M-15	Mini D13S218-F	*	GATTTGAAAATGAGCAGTCCA	251	21	13
p13M-16	Mini D13S218-R		GCATGTTTCAGGCTTTTATTGTC	252	23	13
p13M-17	Mini D13S263-F	*	GCCTGTTAGTTTTTTATTGTTATCTTA	253	27	13
p13M-18	Mini D13S263-R		TTTTTATCAGAAGCATGAAAACAG	254	24	13
p13M-19	Mini D13S153-F	*	CTGTTTCTCCTCCCTGCAAC	255	20	13

Nota: * = 6-FAM. VIC, NED, JOE, RON, PET, TAMBA o 5-FAM

(continuación)

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No.	Longitud	Cromosoma
				SEQ ID NO:		
p13M-20	Mini D13S153-R		GGAGCGTATCTGTCCGTGTA	256	20	13
p13M-21	Mini D13S1320-F	*	CACTTCTAGGTTTTTACCCAAAGTGA	SEQ ID NO:257	25	13
p13M-22	Mini D13S1320-R		TGAAAGTAACTCTGAACACTCAATACT	258	27	13
p13M-23	Mini D13S1296-F	*	GTTTAACCAGGAGCCCTTCC	SEQ ID NO:259	20	13
p13M-24	Mini D13S1296-R		GAGCAACTACCTACTACTATGGTTCCCTT	260	25	13
p13M-25	Mini D13S156-F	*	ACTCCAGCCTGGCGGATAG	SEQ ID NO:261	19	13
p13M-26	Mini D13S156-R		CTTGGATTATGTATCTCTCCTAGAG	262	27	13
p13M-27	Mini D13S1306-F	*	GCTGTTCTTCTAAGTGCCACA	SEQ ID NO:263	21	13
p13M-28	Mini D13S1306-R		GGGGTTGTTGCCGAAGATTAG	264	20	13
p13M-29	Mini D13S170-F	*	TGGAGATAAACACACATAGGCACA	SEQ ID NO:265	22	13
p13M-30	Mini D13S170-R		TAAGGCAGGAGTCATGTCCA	266	20	13
p13M-31	Mini D13S265-F	*	GCCAAATTACATTGCATATTGCAT	SEQ ID NO:267	23	13
p13M-32	Mini D13S265-R		CAACAAAAGCAATAAAGAGTTTTGC	268	24	13
p13M-33	Mini D13S1241-F	*	ATGGAGTGCCCACTGGAAGAA	SEQ ID NO:269	20	13
p13M-34	Mini D13S1241-R		CCAGTTGAGTTTGGACCTCAG	270	21	13
p13M-35	Mini D13S159-F	*	GGCCAAAAATTAGCGTGACA	SEQ ID NO:271	19	13
p13M-36	Mini D13S159-R		CAACTCCAGGCCAAATCATC	272	20	13
p13M-37	Mini D13S158-F	*	CGGAGTGAAGAAGATTGATTT	SEQ ID NO:273	22	13
p13M-38	Mini D13S158-R		TTGACAAATTTAGCAGCATGTATTT	274	24	13

Nota: * = 6-FAM. VIC, NED, JOE, RON, PET, TAMBA o 5-FAM

(continuación)

Nota: * = 6-FAM. VIC, NED, JOE, RON, PET, TAMBA o 5-FAM						
Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID NO:	Longitud	Cromosoma
p13M-39	Mini D13S173-F	*	AGCCTCATGCCTGGGGATA	275	19	13
p13M-40	Mini D13S173-R		ATTTTCTTCATTTGGTGTATTTGG	276	26	13
p13M-41	Mini D13S1265-F	*	CTTTTCAGATRAAATGAGACAAATATG	277	26	13
p13M-42	Mini D13S1265-R		TGCTAATGTGTGATTATATGTACGC	278	25	13

Tabla 4: Cebadores Mini-STR para el Cromosoma 18

Nota: * = 6-FAM. VIC, NED, JOE, RON, PET, TAMBA o 5-FAM						
Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID NO:	Longitud	Cromosoma
p18M-1	Mini D18S51-F	*	TGAGTGACAAAATTGAGACCTT	279	21	18
p18M-2	Mini D18S51-R		GTCTTACAATAACAGTTGCTACTAT T	280	26	18
p18M-3	Mini D18S59-F	*	AACAGGGGCACAAGACAGAT	281	20	18
p18M-4	Mini D18S59-R		CCCACTCCTGTGCACTCTCT	282	20	18
p18M-5	Mini D18S476-F	*	GTTGACAATAGCACACATACAGTC C	283	25	18
p18M-6	Mini D18S476-R		ACCACCACCCACACCCATC	SEQ ID NO:284	18	18
p18M-7	Mini D18S63-F	*	TCTCCATTCCCATCATTTCA	285	21	18
p18M-8	Mini D18S63-R		TCTCCAGGAACATTGTTTACTTT	286	24	18
p18M-9	Mini D18S1132-F	*	CAGCCTTTTCCAAAATTTTACATC	287	23	18
p18M-10	Mini D18S1132-R		TGCCCTACCAGACCAATTTT	288	20	18
p18M-11	Mini D18S452-F	*	TGGGGCATACATAGTGCAAA	289	20	18

(continuación)

Nota: * = 6-FAM. VIC, NED, JOE, RON, PET, TAMBA o 5-FAM						
Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID NO:	Longitud	Cromosoma
p18M-12	Mini D18S452-R		AAATAACCGCTGGCTCTGTG	290	20	18
p18M-13	Mini D18S464-F	*	GACTTTGTGCCATTTCTCCA	291	20	18
p18M-14	Mini D18S464-R		AATCTTCAGGCTGCTTGCAC	292	20	18
p18M-15	Mini D18S1150-F	*	GGCACAGGAAACGTGAATTT	293	20	18
p18M-16	Mini D18S1150-R		GCTGTTTTCTTCTGTTGTCTGG	294	22	18
p18M-17	Mini D18S53-F	*	TTTGGATGCTTTCTTTCTTCTATC A	295	26	18
p18M-18	Mini D18S53-R		CAGTGGAACCAAACTACAACG	296	22	18
p18M-19	Mini D18S453-F	*	CAATAAAGACCTGACTTGGAAAA	297	24	18
P18M-20	Mini D18S453-R		CTCAACACAGCAACAAAAATATAA A	298	25	18
p18M-21	Mini D18S478-F	*	AAGAGAAGAACATCACTAAGAACC A	299	25	18
p18M-22	Mini D18S478-R		AACTCAGTGTCCACAGTAACTCA	300	24	18
p18M-23	Mini D18S56-F	*	CTGAAGGACCTGCCTGAGAT	301	20	18
p18M-24	Mini D18S56-R		TACTTTTTATTGTTAGGGTGTGCTC	302	25	18
p18M-25	Mini D18S468-F	*	CCCCTGCATAAACTCACTCA	303	20	18
p18M-26	Mini D18S468-R		TTCCAAAGGACATAATCCATATTT	304	24	18
p18M-27	Mini D18S450-F	*	GGACCTAGGTTCCAATTTCTCC	305	22	18
P18M-28	Mini D18S450-R		TGTATGGTGCATGAACCTGTG	306	21	18
p18M-29	Mini D18S474-F	*	CTGGCCTCCACCCACTAGAT	307	20	18
p18M-30	Mini D18S474-R		CTTTC AATGTCAGAAGGCATTT	308	22	18

(continuación)

Nota: * = 6-FAM. VIC, NED, JOE, RON, PET, TAMBA o 5-FAM					
Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No.	Cromosoma
p18M-31	Mini D18S1127-F	*	ACCCTGGAGAGTGACTGCAT	SEQ ID NO: 309	18
p18M-32	Mini D18S1127-R		CGCCTGTACTGCCTGAGTTT	SEQ ID NO: 310	18
p18M-33	Min D18S1129-F	*	GGCTGCACAGGCATTC	SEQ ID NO: 311	18
p18M-34	Mini D18S1129-R		GGGAATGCAGTGAATGGAC	SEQ ID NO: 312	18
p18M-35	Mini D18S64-F		TTTTGCCACAAAAATTACCAA	SEQ ID NO: 313	18
p18M-36	Mini D18564-R	*	AAATCAGGAAATCGGCACTG	SEQ ID NO: 314	18
p18M-37	Min D18S1147-F	*	TCAGCACAAATGCTACTGGTA	SEQ ID NO: 315	18
p18M-38	Mini D18S1147-R		GACTGGGAACATGGCTCTTC	SEQ ID NO: 316	18
p18M-39	Mini D18S68-F	*	TGTGAAAAGTTGTAGATAGGATGA A	SEQ ID NO: 317	18
p18M-40	Mini D18S68-R		TGAGGATCACACTTTGAGTAGTAA GTC	SEQ ID NO: 318	18
p18M-41	Mini D18S61-F	*	CCAAAACATCTTCTTCTCCTGA	SEQ ID NO: 319	18
p18M-42	Mini D18S61-R		GAGGAATTTATGCTAAGATTTGAA GG	SEQ ID NO: 320	18
p18M-43	Mini D185469-F	*	AACACGCTTGTCAAATGCTT	SEQ ID NO: 321	18
p18M-44	Mini D18S469-R		TTAAGTTATTGTTGTTTCTTGT GG	SEQ ID NO: 322 ;	18
p18M-45	Mini D18S462-F	*	CAGAAGCAGATTTGAACATTGG	SEQ ID NO: 323	18
p18M-46	Mini D18S462-R		GCTATAAACATTCACCGTTAGGG	SEQ ID NO: 324	18
p18M-47	Mini D18S70-F	*	GGCCTCTCTCCCAGAAAAGAT	SEQ ID NO: 325	18
p18M-48	Mini D18S70-R		TGTCAAGAAGTACCTACCATATTTT GA	SEQ ID NO: 326	18

Tabla 5: Cebadores Mini-STR para el Cromosoma X

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No.	Longitud	Cromosoma
pXM-1	Mini DXS1060-F	*	CTCCCTCTTAATGTTGCCTGT	SEQ ID NO: 327	21	X
pXM-2	Mini DXS1060-R		TGAGAGTCTTTGGTGGGAGA	SEQ ID NO: 328	20	X
pXM-3	Mini DXS1223-F	*	TGCTTTTGGTGTCTTCAATCTG	SEQ ID NO: 329	22	X
pXM-4	Mini DXS1223-R		TGGTCATGTAACAGTGCTTGG	SEQ ID NO: 330	21	X
pXM-5	Mini DXS8051-F	*	TGACATTTAATCAACCAAGAAAAT	SEQ ID NO: 331	23	X
pXM-6	Mini DXS8051-R		TTTTTGAAC TAAGAACCTGGAG	SEQ ID NO: 332	22	X
pXM-7	Mini DXS7108-F	*	TTGTTAGTGTGGCAAAAGTGATGA	SEQ ID NO: 333	24	X
pXM-8	Mini DXS7108-R		GGATTTATAGATATGGAGGGTTTC	SEQ ID NO: 334	24	X
pXM-9	Mini DXS1224-F	*	CCCTTGATGTAGGCACAGG	SEQ ID NO: 335	19	X
pXM-10	Mini DXS1224-R		CGTGGGGGAGTAGTAGTGGT	SEQ ID NO: 336	20	X
pXM-11	Mini DXS8019-F	*	CTTCTTGCATTCCTCCCATGC	SEQ ID NO: 337	19	X
pXM-12	Mini DXS8019-R		TTTCCTCACAGCAAAAAGAGG	SEQ ID NO: 338	20	X
pXM-13	Mini DXS7593-F	*	CCTGGGCAACAAGAGTGAA	SEQ ID NO: 339	19	X
pXM-14	Mini DXS7593-R		GGAAAGAGAGTTATATTTAAGAGCA GA	SEQ ID NO: 340	27	X
pXM-15	Mini DXS1226-F	*	CCCATCTGTCTCCTCCTGGATA	SEQ ID NO: 341	20	X
pXM-16	Mini DXS1226-R		GGTCCCTATTTGCTCTTGTC	SEQ ID NO: 342	21	X
pXM-17	Mini DXS1061-F	*	TCCCTTTCTCTCTCTCTCTCTCTC	SEQ ID NO: 343	24	X
pXM-18	Mini DXS1061-R		TGATGTGTTATGAATTGGCAAAA	SEQ ID NO: 344	23	X
pXM-19	Mini DXS1214-F	*	GGTTGGAATGACTGAAGGCTTA	SEQ ID NO: 345	22	X

(continuación)

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No.	Longitud	Cromosoma
pXM-20	Mini DXS1214-R		AAGATAGCAGGCAACAATAAGAT	SEQ ID NO: 346	23	X
pXM-21	Mini DXS1068-F	*	GTTCTAGGGACACTCCCTTC	SEQ ID NO: 347	21	X
pXM-22	Mini DXS1068-R		AGACCATGGCCTGCTTTTA	SEQ ID NO: 348	19	X
pXM-23	Mini DXS8015-F	*	GCCTTACACACAAGCACACC	SEQ ID NO: 349	20	X
pXM-24	Mini DXS8015-R		GCACCAATATCAAAGCAGCA	SEQ ID NO: 350	20	X
pXM-25	Mini DXS993-F	*	ACCACTCAGCCAGTTTGCTT	SEQ ID NO: 351	20	X
pXM-26	Mini DXS993-R		GAACTGGCCTTGCCCTTCAC	SEQ ID NO: 352	19	X
pXM-27	Mini DXS8080-F	*	GGGCAACAAGAGCAAAAACCTC	SEQ ID NO: 353	20	X
pXM-28	Mini DXS8080-R		CCCTGTTGGTAAATCCCTTGG	SEQ ID NO: 354	20	X
pXM-29	Mini DXS8083-F	*	CAAGGAACTCAAACAACAGTTTACA	SEQ ID NO: 355	25	X
pXM-30	Mini DXS8083-R		TCTTTGCCCACTTTTTAATGG	SEQ ID NO: 356	21	X
pXM-31	Mini DXS991-F	*	GGTTCTCCAGAGGGACAGAA	SEQ ID NO: 357	20	X
pXM-32	Mini DXS991-R		TCTCCCTGATAAACTCCTTTTCAT	SEQ ID NO: 358	24	X
pXM-33	Mini DXS1216-F	*	TCTCTTTTCAGTGACCCCTCCT	SEQ ID NO: 359	21	X
pXM-34	Mini DXS1216-R		GGGAAAAGAGAGAGAGAGAA	SEQ ID NO: 360	21	X
pXM-35	Mini DXS986-F	*	CCACAAGCAGATAAAGAAAAATGTG	SEQ ID NO: 361	24	X
pXM-36	Mini DXS986-R		TCATTTTTATGGCCATGGTATGT	SEQ ID NO: 362	23	X
pXM-37	Mini DXS1196-F	*	TATTTCCCCAGCACCCCTTT	SEQ ID NO: 363	20	X
pXM-38	Mini DXS1196-R		TTTCAGTAAAAATCATACACCTTTAACA	SEQ ID NO: 364	27	X

(continuación)

Nota: * = 6-FAM, NED, JOE, ROX, PET, TAMRA o 5-FAM						
Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No.	Longitud	Cromosoma
pXM-39	Mini DXS1217-F	*	ATCTTTGGAGGGGAAGGAGT	SEQ ID NO: 365	20	X
pXM-40	Mini DXS1217-R		GAAGTATCGTATCTGAATCCCGTA	SEQ ID NO: 366	24	X
pXM-41	Mini DXS8020-F	*	TTCAAAGAGCCCTCTGCTGT	SEQ ID NO: 367	20	X
pXM-42	Mini DXS8020-R		ACAATTCTGTATAGACTTTGTGTGT	SEQ ID NO: 368	25	X
pXM-43	Mini DXS1106-F	*	TGAGAACTCCCTAAACAAAATGT	SEQ ID NO: 369	23	X
pXM-44	Mini DXS1106-R		TTCCCTTGAATGTAAGGATTAGGG	SEQ ID NO: 370	23	X
pXM-45	Mini DXS1059-F	*	TTTGCCCTACCACGGTTGTCT	SEQ ID NO: 371	20	X
pXM-46	Mini DXS1059-R		ACCCGTCGTGGTTGTGAT	SEQ ID NO: 372	18	X
pXM-47	Mini DXS8088-F	*	TCCTGTTTTCCAGTACCAGAAGT	SEQ ID NO: 373	23	X
pXM-48	Mini DXS8088-R		GAGTCTATTAGGAGCACAAAAAGG	SEQ ID NO: 374	24	X
pXM-49	Mini DXS8055-F	*	TTGACTAGAAATGCTCCCTCAA	SEQ ID NO: 375	22	X
pXM-50	Mini DXS8055-R		CAGGTTTCTGTGTGGACATTG	SEQ ID NO: 376	21	X
pXM-51	Mini DXS8064-F	*	ACTCCAGCCTGAGCAACAG	SEQ ID NO: 377	19	X
pXM-52	Mini DXS8064-R		CATTGCTCCCCCAACAAC	SEQ ID NO: 378	19	X
pXM-53	Mini DXS8067-F	*	GAGGGCAACAGAGTGGAGAC	SEQ ID NO: 379	20	X
pXM-54	Mini DXS8067-R		TGATTTGTACACATTTATGGGGTAT	SEQ ID NO: 380	26	X
pXM-55	Mini DXS1001-F	*	CC TTCACATGTATCCCCAAA	SEQ ID NO: 381	20	X
pXM-56	Mini DXS1001-R		TGAATGGATAAAGAAAATGTGGT	SEQ ID NO: 382	23	X
pXM-57	Mini DXS8009-F	*	AAACTGTGAAATTCCTCCAT	SEQ ID NO: 383	22	X

(continuación)

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No.	Longitud	Cromosoma
pXM-58	Mini DXS8009-R		TCAACAAAATCCAGGTTATGTCA	SEQ ID NO: 384	23	X
pXM-59	Mini DXS1047-F	*	TTTTAAAAAATCTACAATGAGCA	SEQ ID NO: 385	24	X
pXM-60	Mini DXS1047-R		CCTAGGTAACATAGTGAGACCCTTGT C	SEQ ID NO: 386	26	X
pXM-61	Mini DXS1062-F	*	ATGATGCCTGGCACACAGTA	SEQ ID NO: 387	20	X
pXM-62	Mini DXS1062-R		AAGCACTTTGAATCATTACGG	SEQ ID NO: 388	22	X
pXM-63	Mini DXS984-F *		ACCCCCACCTCCCTGAAATA	SEQ ID NO: 389	20	X
pXM-64	Mini DXS984-R		TGCCCTACTCCATTCCACAC	SEQ ID NO: 390	20	X
pXM-65	Mini DXS1205-F	*	CCACTTGTCCCTCTTGCTACACA	SEQ ID NO: 391	22	X
pXM-66	Mini DXS1205-R		TGGCTTAGAGTACTTTTTTCACTGC	SEQ ID NO: 392	24	X
pXM-67	Mini DXS1227-F	*	TCCAAAAAATAACACTGAAACACG	SEQ ID NO: 393	22	X
pXM-68	Mini DXS1227-R		AAGGGTTTACTCCCCCAAAA	SEQ ID NO: 394	20	X
pXM-69	Mini DXS8106-F	*	GGTATAAAAACTGAACTCATCAGCA	SEQ ID NO: 395	24	X
pXM-70	Mini DXS8106-R		AGCTGTAGAGTTGAGGAATGTTTTG	SEQ ID NO: 396	25	X
pXM-71	Mini DXS8043-F	*	AAACATTTGGTTAGGCTAATTTCTAT	SEQ ID NO: 397	26	X
pXM-72	Mini DXS8043-R		AAACAAAATCGAAATTTAAAAAGA	SEQ ID NO: 398	23	X
pXM-73	Mini DXS8045-F	*	GGAGATTTCTTCCCTTGTGGCAC	SEQ ID NO: 399	22	X
pXM-74	Mini DXS8045-R		GCTAGGCTGTGTGTGTCTGTG	SEQ ID NO: 400	21	X
pXM-75	Mini DXS998-F	*	AAAGGCAAAAGAAAAAAGTTTGC	SEQ ID NO: 401	22	X
pXM-76	Mini DXS998-R		GATCATTGATATAACCTCAAAAAGAAC T	SEQ ID NO: 402	27	X

Nota: * = 6-FAM, NED, JOE, ROX, PET, TAMRA o 5-FAM

(continuación)

Nota: * = 6-FAM, NED, JOE, ROX, PET, TAMRA o 5-FAM

Número	Nombre/Loci	Etiqueta 5'	Secuencia	Sec. ID No. SEQ ID NO:	Longitud	Cromosoma
pXM-77	Mini DXS8069-F	*	GGCATCGTATTCATTGTTCCA	403	21	X
pXM-78	Mini DXS8069-R		AGGTTCTTCCAAATTAATTTTGTG	404	24	X
pXM-79	Mini DXS1073-F	*	TGAAACACTGCTCCCTTG	405	19	X
pXM-80	Mini DXS1073-R		CCGAGTTATTACAAAGAAGCACA	406	23	X

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para realizar una prueba genética de un feto que comprende el aislamiento, mediante el fraccionamiento de tamaño, una muestra de ácido nucleico a partir de una muestra de moco cervical obtenida a partir de un sujeto femenino que contiene el feto, la muestra de ácido nucleico que consiste esencialmente de polinucleótidos en un tamaño que varía de aproximadamente 50 pares de base a aproximadamente 300 pares de base, y en donde el resultado de una prueba genética en la muestra de ácido nucleico, es indicativo de una composición genética del feto.
- 10 **2.** El método de la reivindicación 1, en donde la muestra de moco cervical se obtiene mediante hisopos transcervicales, un lavado endocervical, un citocepillo, una aspiración, un lavado intrauterino, o una combinación de estos.
- 3.** El método de la reivindicación 1, en donde la muestra de ácido nucleico es una muestra de ADN o una muestra de ARN.
- 15 **4.** El método de la reivindicación 1, que además comprende el uso de la muestra aislada de ácido nucleico para la prueba de una composición genética que no se asocia únicamente con el cromosoma Y, en donde la composición genética de la muestra aislada de ácido nucleico es indicativa de la composición genética del feto.
- 5.** El método de la reivindicación 4, en donde la composición genética se selecciona del grupo que consiste de trisomía, trisomía parcial, duplicación cromosómica, monosomía, monosomía parcial, deleción cromosómica, translocación cromosómica, e inversión cromosómica.
- 20 **6.** El método de la reivindicación 4, en donde la composición genética es indicativa de un condición patológica seleccionada del grupo que consiste de Síndrome de Down, Síndrome de Edwards, Síndrome de Patau, Síndrome del X Frágil, Síndrome de Turner, Síndrome de Klinefelter, Síndrome de Triple X, Síndrome XYY, Trisomía 8, Trisomía 16, Síndrome de Wolf-Hirschhorn, y Síndrome de RhD.
- 25 **7.** El método de la reivindicación 1, que además comprende el uso de la muestra aislada de ácido nucleico como una plantilla para una prueba genética utilizando una tecnología de ensayo seleccionada del grupo que consiste de PCR, PCR en tiempo real, LCR, Q-B-replicasa, SDA, RCA, TMA, LADA, MDA, y la tecnología invasora.
- 8.** El método de la reivindicación 1, que además comprende el uso de la muestra aislada de ácido nucleico para la prueba de la presencia de un marcador genético o un alelo en el feto, en donde la presencia del marcador genético o alelo se basa en la amplificación de un fragmento de nucleótido utilizando un par de cebadores específicos para el marcador genético o alelo.
- 30 **9.** El método de la reivindicación 8, en donde el alelo corresponde a una condición genética seleccionada del grupo que consiste de anemia de célula falciforme, Fenilcetonuria, enfermedad de Tay-Sachs, Fibrosis Quística, beta-Talasemia, Hiperplasia Suprarrenal, Anemia de Fanconi, Atrofia Muscular Espinal, Distrofia Muscular de Duchenne, Enfermedad de Huntington, Distrofia Miotónica, Translocación Robertsoniana, Síndrome de Angelman, Síndrome de DiGeorge, Esclerosis Tuberosa, Ataxia Telangiectasia, y Síndrome de Prader-Willi.
- 35 **10.** El método de la reivindicación 8, en donde el par de cebadores se selecciona del grupo que consiste de cebadores de SEQ ID NOs:17 y 18, SEQ ID NOs: 15 y 16, SEQ ID NOs: 19 y 20, SEQ ID NOs: 21 y 22, SEQ ID NOs: 1 y 2; SEQ ID NOs: 3 y 4; SEQ ID NOs: 5 y 6; SEQ ID NOs: 9 y 10; SEQ ID NOs: 11 y 12; SEQ ID NOs: y 14, y un conjunto de cebadores enumerado en las Tablas 2, 3, 4 o 5.
- 40 **11.** Un método del aislamiento de una muestra de ácido nucleico fetal que comprende: el aislamiento, mediante el fraccionamiento de tamaño, una muestra de ácido nucleico que consiste esencialmente de polinucleótidos de aproximadamente 50 pares de base a aproximadamente 300 pares de base en longitud a partir de una muestra de moco cervical obtenida de un sujeto femenino que contiene el feto.

Fraccionamiento de Tamaño de ADN Total del Medio de transporte en PAGE al 10%

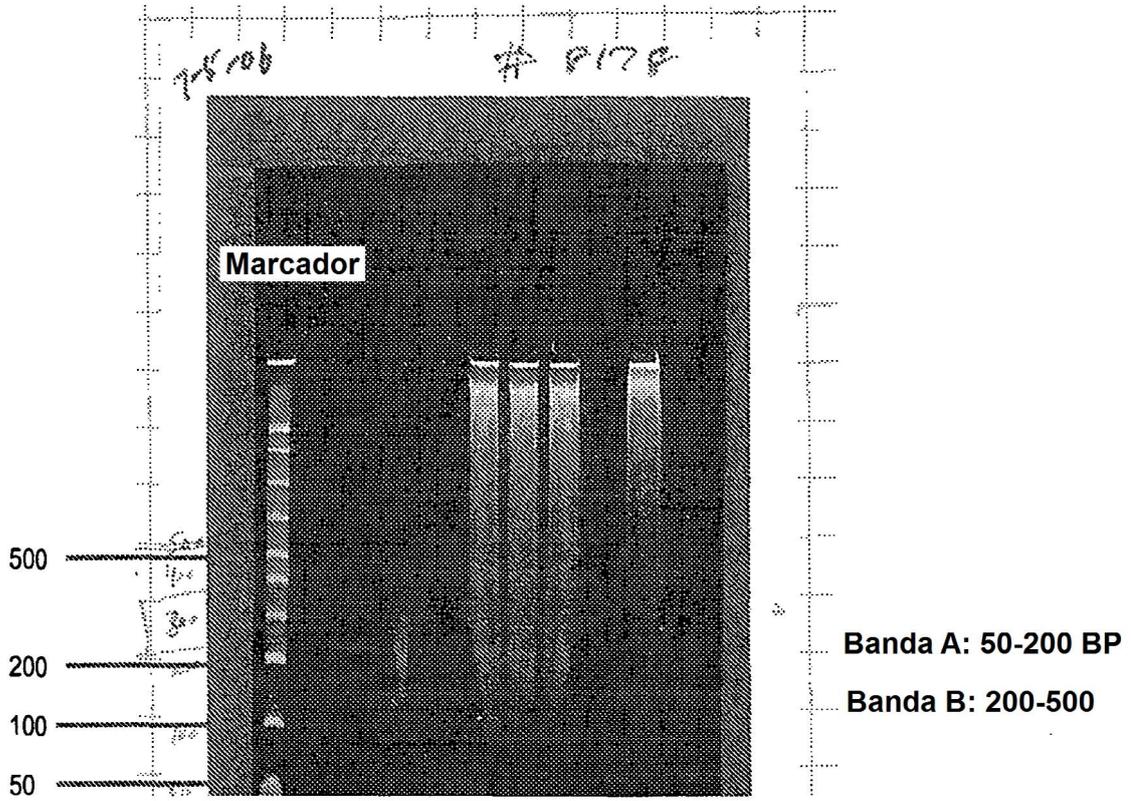


FIGURA 1

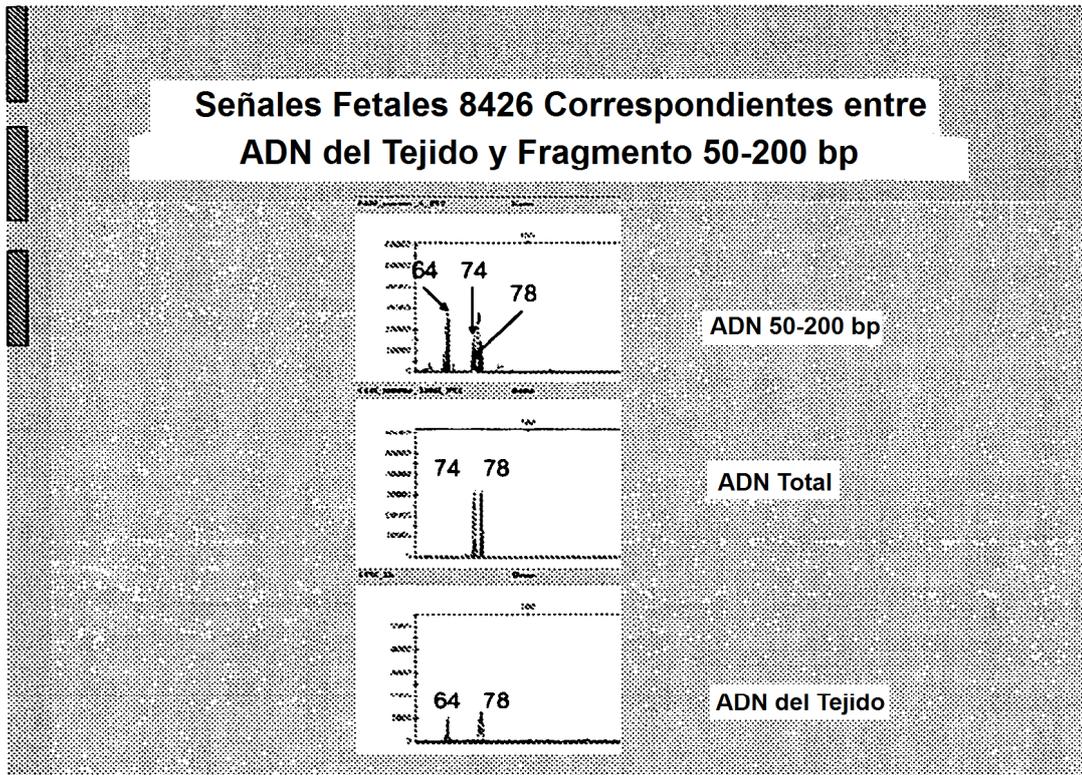


FIGURA 2

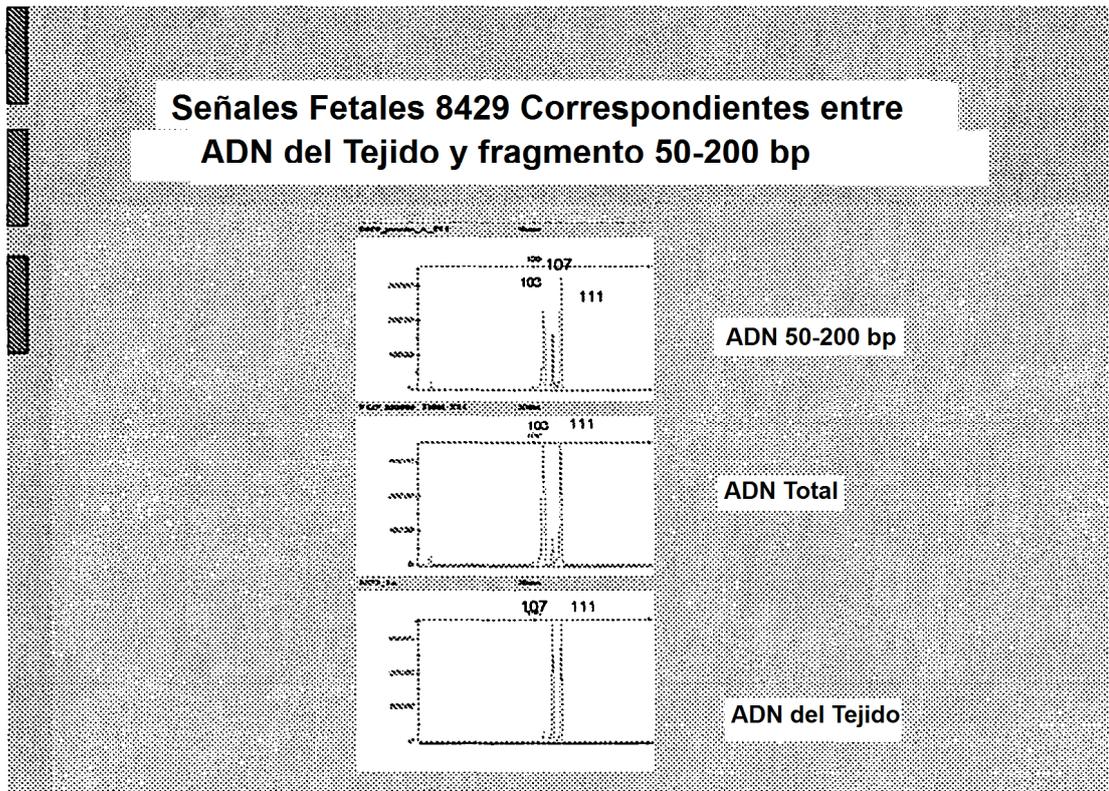


FIGURA 3