



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2017104653, 14.02.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
14.02.2017Дата регистрации:  
24.11.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.02.2017

(45) Опубликовано: 24.11.2017 Бюл. № 33

Адрес для переписки:

117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4,  
ФГБУ "Национальный медицинский  
исследовательский центр акушерства,  
гинекологии и перинатологии имени академика  
В.И. Кулакова" Министерства здравоохранения  
Российской Федерации

(72) Автор(ы):

Шубина Екатерина Сергеевна (RU),  
Трофимов Дмитрий Юрьевич (RU),  
Тетруашвили Нана Картлосовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение "Национальный медицинский  
исследовательский центр акушерства,  
гинекологии и перинатологии имени  
академика В.И. Кулакова" Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
(RU),  
Общество с ограниченной ответственностью  
"Научно-производственная фирма  
ДНК-Технология" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: СУХИХ Г.Т. и др. Неинвазивный  
пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий  
плода по крови матери методом  
высокопроизводительного секвенирования.  
Клинические рекомендации. Акушерство и  
гинекология. 29.04.2016; 6: 1-28. US  
2012264121 A1, 18.10.2012. HumanCytoSNP-  
12 v2.0 Gene Annotation File. Illumina, Inc.  
30.05.2013 [Найдено 20.10.2017] [он-лайн].  
(см. прод.)

(54) Способ и тест-система для определения доли плодовой ДНК в плазме крови беременной женщины с помощью методов высокопроизводительного секвенирования

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к акушерству, и предназначено для определения доли плодовой ДНК в плазме крови беременной женщины с помощью методов высокопроизводительного секвенирования. Используют 53 однонуклеотидных полиморфизма (ОНП), расположенных на 1-12 хромосомах с частотой встречаемости гетерозиготы 40-50%, и

специфические праймеры к ним. Долю плодовой ДНК определяют как медиану значений доли плодовой ДНК для всех информативных ОНП. Изобретение обеспечивает эффективное определение доли плодовой ДНК в плазме крови беременной женщины вне зависимости от пола плода. 4 табл., 2 пр.

(56) (продолжение):

Найдено из Интернет: URL:

[https://support.illumina.com/array/array\\_kits/humancyto-snp-12-v2-1-dna\\_analysis\\_kit/downloads.html](https://support.illumina.com/array/array_kits/humancyto-snp-12-v2-1-dna_analysis_kit/downloads.html).



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/50* (2006.01)  
*C12Q 1/68* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2017104653, 14.02.2017**(24) Effective date for property rights:  
**14.02.2017**Registration date:  
**24.11.2017**

Priority:

(22) Date of filing: **14.02.2017**(45) Date of publication: **24.11.2017** Bull. № 33

Mail address:

117997, Moskva, ul. Akademika Oparina, 4, FGBU  
"Natsionalnyj meditsinskij issledovatel'skij tsentr  
akusherstva, ginekologii i perinatologii imeni  
akademika V.I. Kulakova" Ministerstva  
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii

(72) Inventor(s):

**Shubina Ekaterina Sergeevna (RU),  
Trofimov Dmitrij Yurevich (RU),  
Tetruashvili Nana Kartlosovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe  
uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij  
issledovatel'skij tsentr akusherstva, ginekologii  
i perinatologii imeni akademika V.I. Kulakova"  
Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj  
Federatsii (RU),  
Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu  
"Nauchno-proizvodstvennaya firma  
DNK-Tekhnologiya" (RU)**

(54) **METHOD AND TEST SYSTEM FOR DETERMINATION OF SHARE OF FETAL DNA IN PLASMA OF PREGNANT WOMAN USING HIGH-PRODUCTIVE SEQUENCING METHODS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention is intended to determine the share of fetal DNA in the plasma of a pregnant woman using high-productive sequencing methods. 53 single nucleotide polymorphisms (SNP) located on 1-12 chromosomes with a heterozygote frequency of 40-50%, and specific primers to them are used. The share

of fetal DNA is determined as a median of the fetal DNA share value for all informative SNPs.

EFFECT: effective determination of the share of fetal DNA in the blood plasma of a pregnant woman, regardless of the sex of the fetus.

4 tbl, 2 ex

Настоящий способ относится к области молекулярной генетики, акушерства. Предложенный способ позволяет определить долю плодовой ДНК в плазме крови беременной женщины вне зависимости от пола плода.

Уровень техники.

5 В плазме крови беременной женщины помимо свободноциркулирующей ДНК (сцДНК) самой женщины есть еще и ДНК, принадлежащая плоду. Это используется для скрининга наличия ряда генетических нарушений, таких как изменения числа хромосом (анеуплоидии). При проведении таких исследований важным параметром, влияющим на чувствительность метода, является доля плодовой ДНК среди всей сцДНК.  
10 В случае беременности с плодом мужского пола для определения доли плодовой ДНК может быть использована представленность фрагментов Y хромосомы, что не представляет технической сложности. В случае беременности плодом женского пола определение доли плодовой ДНК требует проведения дополнительных исследований.

На данный момент в мире применяется несколько способов определения доли 15 фетальной ДНК в общем пуле сцДНК. Все они основаны на пределении подсчете фрагментов, для которых можно определить их происхождение. Например, использование фрагментов специфичных для Y хромосомы, что возможно только для плода мужского пола или вне зависимости от пола: по-разному метилированных фрагментов сцДНК, однонуклеотидные полиморфизмы, различия плодовой и 20 материнской ДНК по длине.

Существует патент (Methods for non-invasive prenatal ploidy calling US 2011/0288780 A1), описывающий процедуру определения наличия анеуплоидий плода с использованием около 20000 полиморфных локусов, включающий в том числе этап определения доли плодовой ДНК. Однако точность оценки доли плодовой ДНК достигается 25 использованием значительного количества исследуемых локусов.

Существует патент (Resolving genome fractions using polymorphism counts US 21012/0264121 A1), описывающий процедуру определения доли ДНК примеси, в том числе доли плодовой ДНК, на основании подсчета частоты встречаемости полиморфных аллелей, в том числе ОНП. Метод также предполагает использования большого числа 30 локусов.

При использовании однонуклеотидных полиморфизмов для определения доли плодовой ДНК, информативными (пригодными для определения доли плодовой ДНК) будут точки, в которых мать имеет гомозиготный генотип AA, а плод гетерозиготный АВ. В этом случая доля плодовой ДНК может быть определена, как удвоенное 35 отношение количества прочтений аллеля В ко всем прочтениям: Доля плодовой ДНК =  $2 \cdot B / (A + B)$ .

Наибольшая вероятность получить информативный вариант ОНП при одинаковом соотношении частот встречаемости обоих аллелей. Для выбора ОНП с подходящей частотой встречаемости можно использовать данные широкомасштабных 40 популяционных исследований HarMap (International, T. & Consortium, H. The International HarMap Project Nature 426, 789-796 (2003)).

Задача изобретения - определение доли плодовой ДНК в плазме крови беременной женщины вне зависимости от пола плода.

Данное изобретение отличается от перечисленных выше использованием небольшого 45 числа ОНП с высокой частотой встречаемости гетерозиготы для определения доли плодовой ДНК и набором праймеров.

Описание изобретения

Для определения доли плодовой ДНК используется 53 однонуклеотидных

полиморфизма (ОМП) расположенных на 1-12 хромосомах с частотой встречаемости гетерозиготы 40-50%. Список ОМП их позиций в геноме и частоты встречаемости в российской популяции приведен в таблице 1. Список праймеров приведен в таблице 2.

**Таблица 1.Список ОМП, их позиции и частота встречаемости гетерозиготного варианта в российской популяции.**

номер rs	номер хромосомы	позиция на хромосоме	теоретическая частота встречаемости гетерозиготы
rs4846002	1	11407297	0,47
rs4926658	1	54817403	0,49
rs9434166	1	101279521	0,49
rs10753750	1	167152577	0,49
rs1973943	1	230136316	0,50
rs7597744	2	10262637	0,50
rs2121304	2	53035978	0,49
rs1726025	2	73902347	0,50
rs11164111	2	94869799	0,50
rs981841	2	162564551	0,50
rs1978346	2	216696744	0,45
rs9843942	3	30688144	0,49
rs6777416	3	73297815	0,48
rs957303	3	94549313	0,48

	rs1553212	3	115503458	0,50
	rs751834	3	158844952	0,49
5	rs6771838	3	184788918	0,46
	rs7696439	4	11975525	0,47
	rs4864809	4	53645746	0,50
	rs17002804	4	77787542	0,50
	rs978373	4	101233187	0,50
10	rs4621390	4	165365019	0,48
	rs7703985	5	10635835	0,50
	rs2962799	5	31299147	0,49
	rs902987	5	116665014	0,50
15	rs6859147	5	137643854	0,49
	rs4921132	5	160339947	0,50
	rs1265758	6	32355752	0,48
	rs2143829	6	52553330	0,49
20	rs591356	6	93452580	0,49
	rs9373116	6	134903231	0,49
	rs7770051	6	155181982	0,50
	rs16	7	11563272	0,50
25	rs12333726	7	52413065	0,49
	rs6958027	7	78057521	0,48
	rs314320	7	100834358	0,40
	rs625218	8	10056332	0,48
	rs7005848	8	34993164	0,50
30	rs952559	8	80376399	0,50
	rs827584	8	103346084	0,40
	rs9987271	8	124062675	0,49
	rs6559467	9	69318241	0,49
35	rs4132699	9	89421512	0,44
	rs10980011	9	109714732	0,48
	rs2583839	9	130718552	0,48
	rs7904536	10	80664371	0,33
40	rs4917915	10	100866821	0,50
	rs845085	10	123458380	0,43
	rs4333997	11	33632234	0,50
	rs602991	11	57029614	0,42
	rs2289300	12	30632251	0,41
45	rs7973612	12	52164088	0,42
	rs7971962	12	72319273	0,47

Таблица 2. Последовательности праймеров для амплификации фрагментов, содержащих ОНП.

номер rs	последовательность праймеров	
	pr1	pr2
rs4846002	GCATGTTTATTTATATGCA	AAAACAGCAACTGCAAACCA
rs4926658	CAAAAGAGCAGATGTTTGAG	CAGATTTAAGGTTGATTGAG
rs9434166	CTGCCTTAGGAACTCCTGTA	CATTCAGCAAACATTTAGGA
rs10753750	GGCTTGGCCAGGGTTTTGGT	GCCTGGCAGCCAGAAGGACG
rs1973943	CTGATCATTGCTTCTGGTC	GGCAGGGTTATCAGAGGATG
rs7597744	TCTCCCTTGCAAGCACTAGA	TTCTAAGCCAGCCCCATAAA
rs2121304	AGGTTGTGCTCTTACCAGAA	GTAGTAGCTGGGGATTTAGG
rs1726025	TCCCCACATAGCTGTCTTT	CCCTCAGCCATTCAATTTCTC
rs11164111	AGGCCTTCTCGTTGGCTCAG	GCAGAGCAGAGCAGAGCTGC
rs981841	AACCTGTATAAATGTCTCTA	TACTAACCCTGAAAATTGC
rs1978346	GGGCAGTGACATTGGTCATT	TAGCTTTTCTGAAATTGAC
rs9843942	CCGTGACCCTCTATCTTG	ATTGTTGAGTACTTAAAATG
rs6777416	ATATCAGACTTCAAATAAGT	TTTCTGGAGAAATAGACAG
rs957303	CATGCCTGAGGGAACCTGT	GCTTAGAGGAGCTCTCTCA
rs1553212	GTGCCTCCCAAAGCTTCTGG	AGAACCCTGCCTATTGATG
rs751834	ACATTTTCTCTTCCCTCTC	AGCCACACCTGCCCTCCAC
rs6771838	CCCTCTTTTCTGCCCCATCC	CCAATGCCAGATCCCAGCGT
rs7696439	CGAATCTACAAGATATTGAA	AACAGAGTAAGCCAGTTTGC
rs4864809	TCTTGGCCTCTCATGACC	TACAGATGCCAACATGCCTG
rs17002804	GCCATCATAAAAGCAAATA	GTGATTATAATTGTGTATGC
rs978373	AATTTGAAAATGTACAGATA	GCCACTCTAATGTCAAGCTG
rs4621390	GTGTGGAGCCCTGAGGAAAT	AATGCTTCTTCTTCTTGA
rs7703985	AGGGTGTGGCTGGGGAGACA	CTCTGCTCCCCTAGCCCCTT
rs2962799	ATACCTTTATACCACAAGCC	ATAATTACATTATGGATGTA
rs902987	ACTTGCAGTATTGTTGAACC	TCAAGTTCATTCTCTTAC
rs6859147	CCAGAAGGTATTCCTCTCT	GAGGCTGGGGAAGGGAGGAG
rs4921132	CAATTCAAGGTCCCGCTAAT	TCCATCCACCAGGTGCTCG
rs1265758	GTCTCCAGTTTCTTGCCTAA	GTAGTTTTGGTATCACTACA
rs2143829	CAACAAATGTATTGGTAGA	TTTCTTACTGTTTCTTTAT
rs591356	TTCTTACTTGTTTGACAATC	AAGAAGAATGTTTGCCCTGA
rs9373116	GATTTCTGCGGGACAGGCT	AAAGCCCTGGGCTGGGAGCA
rs7770051	ACAGTTGGGTATTTCCACC	CTTAAGAAATATAAAACAT
rs16	TTGAAGCGCATTAATACCA	ATTTATTCCTCAATCAATTT
rs12333726	GGTGAGAAAGGAGGAATAAT	AAATCCCTCATATGGCTGC
rs6958027	AATTCCTGACCTCAGGTGAT	CTCACACCAGTGGATGGCAA
rs314320	CCATGCAATGTTGCTTCTTG	GGCCAGCCTCAGGTCATTAC
rs625218	CAAAATTTACTTTGGCTTTA	TTGGCTCATTTCTGAAATGT
rs7005848	CTGGGAAACCAAACATTTAG	GAACTTTTAAATACAGGCAT

rs952559	TGCACAAATCTTCAGTGTAT	ATATCTCCACTGGAAGGTTG
rs827584	GGGAAATTAGTCCCAGGAGC	CTAAAATAATTCTTAATCCC
rs9987271	TACTATTACTCGCTGCATCT	CAGGGATATTCATTGCAGCA
rs6559467	AGTGCCTGGGGAAATGTGT	TTAAACTTACTGTTTCATCT
rs4132699	ATCCAACAGTCCTTACCAA	CTTCTGGGTGTCTTTGGAGT
rs10980011	AGGATGAGGTTCTCATTCCC	GGTGAGGGCAATTCCTAGAG
rs2583839	AAACTTTTTAATCTCAGGCC	TACACAAACTAAGCCTCTTA
rs7904536	CACAAAGGTTGTCACCATAT	TCTTTAAGCTGTGGTACTT
rs4917915	ATAGATATAAACAAGTAAA	AATCTGCCATGCAAATAAA
rs845085	GAAGGAAGGGAGGAGAGATG	GTGTGTCAAGCAGTGAGCTT
rs4333997	CCTCTGCATTATACACAGGT	GGATGTAGATATGAGGCCTG
rs602991	GGACTTACAACCTGAATCTA	GGAAGTTTAACACGAGAGTC
rs2289300	GGAAATCAAAGGAAGGTTAG	ATTTTAGAGAACATCCATAG
rs7973612	CCTAGGGGAGAGCCAGCAGG	CCTGCACCACAGCAACCTCT
rs7971962	TCTCATAGAGGGGCCAGCTG	AGTCAAGGAAGGACCCGAGG

Способ осуществляется следующим образом.

1. Проводят забор периферической крови из вены у беременной женщины
2. С помощью последовательного центрифугирования или любым другим адаптированным для данного исследования способом отделяют плазму.
3. Из плазмы выделяется внеклеточная ДНК, содержащая материнскую и плодую фракции.
4. Проводят амплификацию фрагментов ДНК, включающих ОНП.
5. Определяют последовательности (проводят секвенирование) полученных фрагментов ДНК с помощью методов высокопроизводительного секвенирования.
6. Для каждого из ОНП подсчитывают представленность обоих аллелей. ОНП с долей менее представленного аллеля от 0.0075 до 0.20 и суммарным покрытием не менее 1000 фрагментов считают информативными. И для каждого ОНП рассчитывают долю плодовой ДНК по формуле:  $2*B/(A+B)$ , где А доля более представленного аллеля, а В - доля менее представленного аллеля.
7. Доля плодовой ДНК определяется как медиана значений доли плодовой ДНК для всех информативных аллелей.

Реализация изобретения (пример)

Результаты определения доли плодовой ДНК с помощью ОНП сравнивали с результатами определения доли плодовой ДНК по Y хромосоме.

Образец 1: доля плодовой ДНК по Y хромосоме - 14%.

В таблице 3 приведены результаты подсчета частоты встречаемости аллелей для каждого ОНП. Всего 13 информативных ОНП. Доля плодовой ДНК, определенная на основании секвенирования последовательностей ОНП, 13%.

Таблица 3 Частота встречаемости аллелей для образца 1.

номер rs	аллель 1	аллель 2	доля аллеля 1	доля аллеля 2	доля плодовой ДНК
rs4846002	55521	44793	0,5535	0,4465	-
rs4926658	13568	1	0,9999	0,0001	-
rs9434166	42643	3156	0,9310	0,0689	0,1378
rs10753750	15203	28	0,9981	0,0018	-
rs1973943	64262	70	0,9989	0,0011	-
rs7597744	26808	190	0,9924	0,0070	-
rs2121304	16532	14	0,9990	0,0008	-
rs1726025	4070	3255	0,5556	0,4444	-
rs11164111	4364	3220	0,5754	0,4246	-
rs981841	12349	11218	0,5240	0,4760	-
rs1978346	9436	7375	0,5613	0,4387	-
rs9843942	21488	1508	0,9343	0,0656	0,1312
rs6777416	5847	3764	0,6083	0,3916	-
rs957303	34452	17995	0,6569	0,3431	-
rs1553212	2155	1610	0,5724	0,4276	-
rs751834	10979	314	0,9719	0,0278	0,0556
rs6771838	84304	29	0,9993	0,0003	-
rs7696439	340	0	1,0000	0,0000	-
rs4864809	25840	1837	0,9336	0,0664	0,1328
rs17002804	19850	99	0,9944	0,0050	-
rs978373	6652	9	0,9983	0,0014	-



	rs4621390	1391	1	0,9993	0,0007	-
	rs7703985	42342	2945	0,9349	0,0650	0,1300
	rs2962799	4918	5	0,9988	0,0010	-
5	rs902987	2462	88	0,9655	0,0345	0,0690
	rs6859147	4101	3993	0,5065	0,4932	-
	rs4921132	2661	147	0,9476	0,0524	0,1048
	rs1265758	9395	7927	0,5422	0,4574	-
	rs2143829	19725	14390	0,5782	0,4218	-
10	rs591356	10605	10551	0,5012	0,4987	-
	rs9373116	8043	839	0,9055	0,0945	0,1890
	rs7770051	11947	111	0,9908	0,0092	0,0184
	rs16	973	718	0,5754	0,4246	-
	rs12333726	10429	48	0,9953	0,0046	-
15	rs6958027	13440	12140	0,5254	0,4746	-
	rs314320	21711	1272	0,9447	0,0553	0,1106
	rs625218	15522	11839	0,5673	0,4327	-
	rs7005848	9290	9026	0,5071	0,4927	-
	rs952559	6082	5536	0,5234	0,4764	-
20	rs827584	10505	9124	0,5351	0,4648	-
	rs9987271	9453	8050	0,5401	0,4599	-
	rs6559467	24341	1811	0,9303	0,0692	0,1384
	rs4132699	1729	1629	0,5149	0,4851	-
	rs10980011	34598	203	0,9940	0,0058	-
25	rs2583839	75339	2053	0,9735	0,0265	0,0530
	rs7904536	18407	47	0,9974	0,0025	-
	rs4917915	13009	8	0,9994	0,0006	-
	rs845085	57813	5204	0,9172	0,0826	0,1652
	rs4333997	5891	4180	0,5848	0,4149	-
30	rs602991	40333	8	0,9997	0,0002	-
	rs2289300	30756	29415	0,5111	0,4888	-
	rs7973612	98142	91	0,9991	0,0009	-
	rs7971962	27153	26275	0,5081	0,4916	-

35 Образец 2: доля плодовой ДНК по Y хромосоме - 11%.

В таблице 4 приведены результаты подсчета частоты встречаемости аллелей для каждого ОНП. Всего 17 информативных ОНП. rs7696439 исключен из рассмотрения из-за низкого покрытия - 204 фрагмента. Доля плодовой ДНК, определенная на основании секвенирования последовательностей ОНП, 11,4%.

40

45

Таблица 4 Частота встречаемости аллелей для образца 2.

номер rs	аллель 1	аллель 2	доля аллеля 1	доля аллеля 2	доля плодовой ДНК
rs4846002	56197	53630	0,5117	0,4883	-
rs4926658	8046	6608	0,5490	0,4509	-
rs9434166	38010	13	0,9996	0,0003	-
rs10753750	14527	160	0,9890	0,0109	0,0218
rs1973943	65660	4546	0,9352	0,0648	0,1296
rs7597744	31827	2086	0,9383	0,0615	0,1230
rs2121304	10227	6296	0,6189	0,3810	-
rs1726025	7059	97	0,9864	0,0136	0,0272
rs11164111	5246	292	0,9473	0,0527	0,1054
rs981841	10985	9518	0,5357	0,4642	-
rs1978346	10462	5543	0,6536	0,3463	-
rs9843942	9065	8858	0,5057	0,4942	-
rs6777416	8502	5003	0,6295	0,3704	-
rs957303	37607	1963	0,9504	0,0496	0,0992
rs1553212	1756	1678	0,5099	0,4872	-
rs751834	4024	4010	0,5006	0,4988	-
rs6771838	45324	34694	0,5663	0,4335	-
rs7696439	201	3	0,9853	0,0147	-
rs4864809	26824	3304	0,8903	0,1097	0,2194
rs17002804	13983	599	0,9583	0,0411	0,0822
rs978373	4227	44	0,9895	0,0103	0,0206
rs4621390	1040	4	0,9962	0,0038	-
rs7703985	23500	17861	0,5681	0,4318	-
rs2962799	5718	4	0,9993	0,0007	-
rs902987	1916	116	0,9429	0,0571	0,1142
rs6859147	15488	14388	0,5178	0,4810	-
rs4921132	1504	66	0,9580	0,0420	0,0840
rs1265758	5761	4881	0,5411	0,4584	-
rs2143829	21736	14964	0,5922	0,4077	-
rs591356	11406	97	0,9916	0,0084	-
rs9373116	4617	4204	0,5233	0,4765	-
rs7770051	12267	791	0,9394	0,0606	0,1212
rs16	914	88	0,9122	0,0878	0,1756
rs12333726	6949	884	0,8871	0,1129	0,2258
rs6958027	12716	10015	0,5594	0,4406	-
rs314320	20044	130	0,9936	0,0064	-
rs625218	10775	10096	0,5163	0,4837	-

rs7005848	16221	127	0,9920	0,0078	-
rs952559	8522	5435	0,6105	0,3893	-
rs827584	16976	683	0,9600	0,0386	0,0772
rs9987271	13109	1143	0,9198	0,0802	0,1604
rs6559467	15048	9572	0,6110	0,3886	-
rs4132699	3479	273	0,9272	0,0728	0,1456
rs10980011	18787	14381	0,5664	0,4336	-
rs2583839	36515	33015	0,5251	0,4747	-
rs7904536	1223	534	0,6961	0,3039	-
rs4917915	5267	5148	0,5057	0,4943	-
rs845085	56710	413	0,9925	0,0072	-
rs4333997	4738	3703	0,5612	0,4386	-
rs602991	28806	59	0,9978	0,0020	-
rs2289300	30061	29099	0,5081	0,4918	-
rs7973612	91720	90	0,9990	0,0010	-
rs7971962	36991	34576	0,5167	0,4830	-

## (57) Формула изобретения

Способ определения доли плодовой ДНК в плазме крови беременной женщины с помощью методов высокопроизводительного секвенирования отличается тем, что используют 53 однонуклеотидных полиморфизма (ОНП), расположенных на 1-12 хромосомах с частотой встречаемости гетерозиготы 40-50%, и специфические праймеры к ним:

номер rs	последовательность праймеров	
	pr1	pr2
rs4846002	GCATGTTTATTTTATATGCA	AAAACAGCAACTGCAAACCA
rs4926658	CAAAAGAGCAGATGTTTGAG	CAGATTTAAGGTTGATTGAG
rs9434166	CTGCCTTAGGAACTCCTGTA	CATTCAGCAAACATTTAGGA
rs10753750	GGCTTGGCCAGGGTTTTGGT	GCCTGGCAGCCAGAAGGACG
rs1973943	CTGATCATTTGCTTCTGGTC	GGCAGGGTTATCAGAGGATG
rs7597744	TCTCCCTGCAGCCACTAGA	TTCTAAGCCAGCCCCATAAA
rs2121304	AGGTTGTGCTCTTACCAGAA	GTAGTAGCTGGGGATTTAGG
rs1726025	TCCCCACATAGCTGTCTTT	CCCTCAGCCATTCATTTCTC
rs11164111	AGGCCTTCTCGTTGGCTCAG	GCAGAGCAGAGCAGAGCTGC
rs981841	AACCTGTATAAATGTCTCTA	TACTAACCCGTAAAATTGC
rs1978346	GGGCAGTGACATTGGTCATT	TAGCTTTTTCTGAAATTGAC
rs9843942	CCGTGACCCTCTCTATCTTG	ATTGTTGAGTACTTAAAATG
rs6777416	ATATCAGACTTCAAATAAGT	TTTCTGGAGAAATAGACAG
rs957303	CATGCCTGAGGGAACCCTGT	GCTTAGAGGAGCTCTCTTCA
rs1553212	GTGCCTCCCAAAGCTTCTGG	AGAACCCTGCCTATTGATG
rs751834	ACATTTTCTCTTCCCTCTC	AGCCACACCTGCCCTCCAC
rs6771838	CCCTCTTTTCTGCCCCATCC	CCAATGCCAGATCCCAGCGT
rs7696439	CGAATCTACAAGATATTGAA	AACAGAGTAAGCCAGTTTGC
rs4864809	TCTTGGCCTCTCACATGACC	TACAGATGCCAACATGCCTG
rs17002804	GCCATCATAAAAGCAAATA	GTGATTATAATTGTGTATGC
rs978373	AATTTGAAAATGTACAGATA	GCCACTCTAATGTCAAGCTG
rs4621390	GTGTGGAGCCCTGAGGAAAT	AATGCTTCTTCTTCTTGA
rs7703985	AGGGTGTGGCTGGGGAGACA	CTCTGCTCCCCTAGCCCCTT
rs2962799	ATACCTTTATACCACAAGCC	ATAATTACATTATGGATGTA
rs902987	ACTTGCAGTATTGTTGAACC	TCAAGTTCCATTCTCTTAC
rs6859147	CCAGAAGGTATTCCTCTCT	GAGGCTGGGGAAGGGAGGAG
rs4921132	CAATTCAAGGTCCCGCTAAT	TCCATCCACCCAGGTGCTCG
rs1265758	GTCTCCAGTTTCTTGCCTAA	GTAGTTTTGGTATCACTACA
rs2143829	CAACAAATGTATTTGGTAGA	TTTCTTACTGTTTCTTTAT
rs591356	TTCTTACTTGTTTGACAATC	AAGAAGAATGTTTGCCTGA
rs9373116	GATTTCTGCGGGGACAGGCT	AAAGCCCTGGGCTGGGAGCA

rs7770051	ACAGTTGGGTTATTTCCACC	CTTAAGAAATATAAAAACAT
rs16	TTGAAGCGCATTAATACCA	ATTTATTCCTCAATCAATTT
rs12333726	GGTGAGAAAGGAGGAATAAT	AAATTCCTCACATGGCTGC
rs6958027	AATTCCTGACCTCAGGTGAT	CTCACACCAGTGGATGGCAA
rs314320	CCATGCAATGTTGCTTCTTG	GGCCAGCCTCAGGTCATTAC
rs625218	CAAAATTTACTTTGGCTTTA	TTGGCTCATTTCTGAAATGT
rs7005848	CTGGGAAACCAAACATTTAG	GAACTTTTAAATACAGGCAT
rs952559	TGCACAAATCTTCAGTGTAT	ATATCTCCACTGGAAGGTTG
rs827584	GGGAAATTAGCCCAGGAGC	CTAAAATAATTCTTAATCCC
rs9987271	TACTATTACTCGCTGCATCT	CAGGGATATTCATTGCAGCA
rs6559467	AGTGCCCTGGGGAAATGTGT	TTAAACTTACTGTTTCATCT
rs4132699	ATCCAACAGTCCTCTACCAA	CTTCTGGGTGTCTTTGGAGT
rs10980011	AGGATGAGGTTCTCATTCCC	GGTGAGGGCAATTCCTAGAG
rs2583839	AAACTTTTTAATCTCAGGCC	TACACAAACTAAGCCTCTTA
rs7904536	CACAAAGGTTGTCACCATAT	TCTTTTAAGCTGTGGTACTT
rs4917915	ATTAGATATAACAAGTAAA	AATCTGCCATGCAAATTA
rs845085	GAAGGAAGGGAGGAGAGATG	GTGTGTCAAGCAGTGAGCTT
rs4333997	CCTCTGCATTATACACAGGT	GGATGTAGATATGAGGCCTG
rs602991	GGACTTACAACCTGAATCTA	GGAAGTTTAACACGAGAGTC
rs2289300	GGAAATCAAAGGAAGGTTAG	ATTTTAGAGAACATCCATAG
rs7973612	CCTAGGGGAGAGCCAGCAGG	CCTGCACCACAGCAACCTCT
rs7971962	TTCATAGAGGGGCCAGCTG	AGTCAAGGAAGGACCCGAGG

при этом для каждого из ОНП подсчитывают представленность обоих аллелей, ОНП с долей менее представленного аллеля от 0.0075 до 0.20 и суммарным покрытием не менее 1000 фрагментов считают информативными; для каждого информативного ОНП рассчитывают долю плодовой ДНК по формуле:  $2 \cdot B / (A + B)$ , где А доля более представленного аллеля, а В - доля менее представленного аллеля; долю плодовой ДНК определяют как медиану значений доли плодовой ДНК для всех информативных ОНП.