

Reivindicaciones:

1. Un método para analizar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas de una muestra de sangre para proporcionar información de secuencia, comprendiendo dicho método el paso de:
 - a. analizar secuencias de ácidos nucleicos de ADN libre de células seleccionado por tamaño para detectar información de secuencia,

en donde el ADN libre de células seleccionado por tamaño se obtuvo de una muestra de sangre,

en donde la muestra de sangre se recolectó en un dispositivo de recolección de sangre que no comprendía un fijador,

en donde la muestra de sangre se almacenó sin un fijador a una temperatura mayor que -20 °C y menor que 35 °C antes de que el ADN libre de células se aislara del plasma,

en donde el plasma se separó de las células sanguíneas presentes en la muestra de sangre antes o después del almacenamiento,

en donde el ADN libre de células se aisló del plasma al menos 48 horas después de que se recolectó la muestra de sangre de un sujeto, y

en donde el ADN libre de células seleccionado por tamaño que se analiza se obtuvo separando por tamaño el ADN libre de células extraído y aislando el ADN libre de células del ADN libre de células extraído que es menor que 300 pb.
2. Un método para analizar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas de una muestra de sangre para proporcionar información de secuencia, comprendiendo dicho método el paso de:
 - a. analizar secuencias de ácidos nucleicos de ADN libre de células seleccionado por tamaño para detectar información de secuencia,

en donde el ADN libre de células seleccionado por tamaño se obtuvo de una muestra de sangre,

en donde la muestra de sangre se recolectó en un dispositivo de recolección de sangre que comprende un recipiente que tiene solo una o más composiciones en su interior, en donde la una o más composiciones consisten en uno o más anticoagulantes y un ion metálico seleccionado entre potasio, litio y sodio,

en donde la muestra de sangre se almacenó en el dispositivo de recolección de sangre a una temperatura mayor que -20°C y menor que 35°C antes de que se aislara el ADN libre de células del plasma,

en donde el plasma se separó de las células sanguíneas presentes en la muestra de sangre antes o después del almacenamiento,

en donde el ADN libre de células se aisló del plasma al menos 48 horas después de que se recolectó la muestra de sangre de un sujeto, y

en donde el ADN libre de células seleccionado por tamaño que se analiza se obtuvo separando por tamaño el ADN libre de células extraído y aislando el ADN libre de células del ADN libre de células extraído que es menor que 300 pb.

3. Un método para analizar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas de una muestra de sangre para proporcionar información de secuencia, comprendiendo dicho método el paso de:

- a. analizar secuencias de ácidos nucleicos de ADN libre de células seleccionado por tamaño para detectar información de secuencia,

en donde el ADN libre de células seleccionado por tamaño se obtuvo de una muestra de sangre,

en donde la muestra de sangre se recolectó en un dispositivo de recolección de sangre que comprende un recipiente que tiene solo una o más composiciones en su interior, en donde la una o más composiciones consisten en uno o más anticoagulantes y un ion metálico seleccionado entre potasio, litio y sodio; y un gel separador,

en donde la muestra de sangre se almacenó en el dispositivo de recolección de sangre a una temperatura mayor que -20°C y menor que 35°C antes de que se aislara el ADN libre de células del plasma,

en donde el plasma se separó de las células sanguíneas presentes en la muestra de sangre antes o después del almacenamiento,

en donde el ADN libre de células se aisló del plasma al menos 48 horas después de que se recolectó la muestra de sangre de un sujeto, y

en donde el ADN libre de células seleccionado por tamaño que se analiza se obtuvo separando por tamaño el ADN libre de células extraído y aislando el ADN libre de células del ADN libre de células extraído que es menor que 300 pb.

4. El método de la reivindicación 1 o 3, en el que el ADN se aisló del plasma al menos 3, 4, 5, 6, 7 u 8 días después de la recolección de sangre.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el plasma se separó de la sangre después de un almacenamiento de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 días después de la recolección de sangre.
6. El método de 5, en donde el plasma se separó de la sangre después de un almacenamiento de al menos 2, 3, 4, 5 o 6 días después de la recolección de sangre o después de un almacenamiento de 3 a 6 días o después de 3, 4 o 5 días.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra de sangre se almacenó en el dispositivo de recolección de sangre a una temperatura mayor que 0°C y menor que 35°C o menor que 30°C o menor que 25°C o menor que 20°C antes de que el ADN libre de células se aislara del plasma.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra de sangre se almacenó en el dispositivo de recolección de sangre a una temperatura mayor que 0°C y menor que 35°C o menor que 30°C o menor que 25°C o menor que 20°C antes de que el plasma se separara de la sangre.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra de sangre se almacenó en el dispositivo de recolección de sangre a una temperatura mayor que 0°C o mayor que 2°C y menor que 15°C o menor que 10°C o menor que 8°C o menor que 6°C antes de que el ADN libre de células se aislara del plasma.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra de sangre se almacenó en el dispositivo de recolección de sangre a una temperatura mayor que 0°C o mayor que 2°C y menor que 15°C o menor que 10°C o menor que 8°C o menor que 6°C antes de que el plasma se separara de la sangre.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra de sangre se almacenó en el dispositivo de recolección de sangre a temperatura ambiente antes de que el plasma se separara de la sangre.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se analizan las secuencias de ácidos nucleicos del ADN libre de células aislado para determinar la presencia de una anomalía genética en el ADN fetal.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la información de secuencia comprende la secuencia de una pluralidad de etiquetas de secuencia y el método comprende, además

analizar las secuencias de la pluralidad de etiquetas de secuencia para determinar la presencia de al menos una secuencia de interés en el ADN del feto, en donde al menos una porción de la pluralidad de etiquetas de secuencia se asigna a la al menos una secuencia de interés.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la información de secuencia comprende una mutación genética en un gen.

opcionalmente, en donde dicho gen se selecciona del grupo que consiste en: BRCA1, BRCA2, MSH6, MSH2, MLH1, RET, PTEN, ATM, H-RAS, p53, ELAC2, CDH1, APC, AR, PMS2, MLH3, CYP1A1, GSTP1, GSTM1, AXIN2, CYP19, MET, NAT1, CDKN2A, NQO1, trc8, RAD51, PMS1, TGFBR2, VHL, MC4R, POMC, NROB2, UCP2, PCSK1, PPARG, ADRB2, UCP3, glur1, cart, SORBS1, LEP, LEPR, SIM1, TNF, IL-6, IL-1, IL-2, IL-3, IL1A, TAP2, THPO, THRB, NBS1, RBM15, LIE, MPL, RUNX1, Her-2, receptor de glucocorticoides, receptor de estrógeno, receptor de tiroides, p21, p27, K-RAS, N-RAS, proteína de retinoblastoma, gen de Wiskott-Aldrich (WAS), factor V Leiden, factor II (protrombina), metilen tetrahidrofolato reductasa, fibrosis quística, receptor de LDL, receptor de HDL, gen de superóxido dismutasa y gen SHOX; o

dicho gen seleccionado entre genes implicados en la regulación del óxido nítrico, genes implicados en la regulación del ciclo celular, genes supresores de tumores, oncogenes y genes asociados con la neurodegeneración.

15. El método de la reivindicación 7, en el que la mutación genética es un marcador de un tipo de cáncer.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de separación se realizó utilizando electroforesis en gel.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la porción del ADNcf de la muestra de plasma es menor de 185 pb o menor de 180 pb o menor de 165 pb.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la porción del ADNcf de la muestra de plasma es menor de 155 pb o menor de 150 pb.
19. El método de la reivindicación 17 o 18, en el que la porción del ADNcf de la muestra de plasma es mayor de 50 pb o mayor de 80 pb o mayor de 90 pb o mayor de 100 pb.
20. El método de la reivindicación 1, en el que el fijador es un agente reticulante, un inhibidor metabólico o un estabilizador de membrana.
21. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo de recolección comprende EDTA y un ion metálico seleccionado de potasio.
22. El método de la reivindicación 21, en el que el dispositivo de recolección comprende además un gel separador.
23. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra se obtuvo de una fuente humana.
24. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto es una mujer embarazada o un paciente que necesita un diagnóstico de cáncer.

25. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se generó una biblioteca de secuencias que comprende el ADN libre de células antes o después de aislar el ADNcf y separarlo por tamaño.
26. El método de la reivindicación 18, en el que el ADN libre de células se amplificó antes o después de que se formara la biblioteca de secuencias.
27. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de separación se realizó utilizando una matriz de unión basada en perlas, cromatografía en columna o un filtro de membrana.
28. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo de recolección de sangre antes de extraer el ADN libre de células del plasma se almacenó a una temperatura no mayor que **8°C**.
29. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo de recolección de sangre antes de extraer el ADN libre de células del plasma se almacenó a una temperatura no mayor que **25°C**.
30. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo de recolección de sangre antes de extraer el ADN libre de células del plasma se almacenó a una temperatura no mayor que **30°C**.
31. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo de recolección de sangre antes de extraer el ADN libre de células del plasma se almacenó a una temperatura mayor que 0°C;
32. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el análisis de secuencias de ácidos nucleicos del ADN libre de células aislado para detectar información de secuencia comprende secuenciar el ADN libre de células aislado o secuenciar al menos una porción del ADN libre de células para determinar la secuencia de ácidos nucleicos de uno o más polinucleótidos en el ADN libre de células aislado.
33. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la información de secuencia comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una inserción, delección, cromatrisis o metilación en comparación con una secuencia de referencia.
34. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las secuencias de ácido nucleico del ADN libre de células aislado se analizan para detectar un número anormal de cromosomas o la presencia de un cromosoma XX o XY calculando proporciones cromosómicas.
34. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que crea un primer perfil de tamaño de fragmento normalizado a partir de la información de secuenciación asociada con la muestra, comparando uno o más valores dentro del perfil de tamaño de fragmento con uno o más de los rangos de valores correspondientes obtenidos a

partir de un conjunto de parámetros de referencia que comprende una pluralidad de perfiles de tamaño de fragmento válidos; y aceptando la información de secuencia y los resultados de análisis de la misma si uno de los uno o más valores dentro del perfil de tamaño de fragmento asociado con la muestra está dentro del rango de valores correspondiente o rechazando la información de secuencia si uno (o alternativamente, todos) de los uno o más valores dentro del perfil de tamaño de fragmento asociado con la muestra está fuera del rango de valores correspondiente.

35. El método de la reivindicación 34, en el que el primer perfil de tamaño de fragmento normalizado comprende o consiste en tamaños de fragmentos menores que 185 pb o menores que 180 pb o menores que 165 pb o menores que 155 pb o menores que 150 pb.
36. El método de la reivindicación 34 o 35, en el que el primer perfil de tamaño de fragmento normalizado comprende o consiste en tamaños de fragmentos mayores que 50 pb o mayores que 80 pb o mayores que 90 pb o mayores que 100 pb.
37. El método de cualquiera de las reivindicaciones 34 a 36, en el que a partir de una muestra con información de secuencia rechazada, se envía una solicitud para volver a recolectar sangre de un paciente.
38. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que calcula un primer valor de frecuencia de tamaño de fragmento relativo a partir de la información de secuenciación asociada con la muestra; comparando el primer valor de frecuencia de tamaño de fragmento relativo con un conjunto de frecuencias de tamaño de fragmento relativo de referencia que comprende una pluralidad de frecuencias de tamaño de fragmento relativo válidas, y aceptando la información de secuencia y los resultados de análisis de la misma si la primera frecuencia de tamaño de fragmento asociada con la muestra está dentro de un rango especificado de valores dentro del conjunto de referencia o rechazando la información de secuencia y los resultados de análisis de la misma si la primera frecuencia de tamaño de fragmento asociada con la muestra está fuera de un rango especificado de valores dentro del conjunto de referencia.
39. El método de la reivindicación 38, en el que el primer valor de frecuencia de tamaño de fragmento relativo es un tamaño de fragmento menor que 185 pb o menor que 180 pb o menor que 165 pb o menor que 155 pb o menor que 150 pb.
40. El método de la reivindicación 38 o 39, en el que el primer valor de frecuencia de tamaño de fragmento relativo es un tamaño de fragmento mayor que 50 pb o mayor que 80 pb o mayor que 90 pb o mayor que 100 pb.
41. El método de cualquiera de las reivindicaciones 38 a 40, en el que a partir de una muestra con información de secuencia rechazada, se envía una solicitud para volver a recolectar sangre de un paciente.
42. El método de cualquiera de las reivindicaciones 38 a 41, que comprende realizar los pasos de cálculo y comparación de la reivindicación 38 para un segundo valor de

frecuencia de tamaño de fragmento relativo de un valor de pb diferente que la primera frecuencia de tamaño de fragmento, en donde la información de secuencia y su análisis se aceptan si la totalidad (o uno) del segundo valor de frecuencia de tamaño de fragmento asociado con la muestra está dentro de un rango especificado de valores dentro del conjunto de referencia o se rechaza la información de secuencia si la totalidad (o uno, dos o tres) del segundo valor de frecuencia de tamaño de fragmento asociado con la muestra está fuera de un rango especificado de valores dentro del conjunto de referencia.