ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE
---

(19)

المملكة المغربية
المكتب المغربي للملكية الصناعية و التجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication :
MA 33040 B1

(51) Cl. internationale :
C12Q 1/68

(43) Date de publication :
01.02.2012

(21) N° Dépôt :
34083

(22) Date de Dépôt :
11.08.2011

(30) Données de Priorité :
13.02.2009 IN 00314/CHE/2009

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT :
PCT/IN2010/000048 27.01.2010

(71) Demandeur(s) :
BIGTEC PRIVATE LIMITED, II FLOOR, SID ENTREPRENEURSHIP BUILDING INDIAN INSTITUTE OF SCIENCE [IISC] CAMPUS MALLESHWARAM BANGALORE 560 012 KARNATAKA (IN)

(72) Inventeur(s) :
JAGANNATH, Manjula ; NAIR, Chandrasekhar, Bhaskaran ; SUBBARAO, Pillarisetti, Venkata

(74) Mandataire :
SABA & CO

(54) Titre : **SONDES D'OLIGONUCLEOTIDES ET AMORCES UTILES DANS LA DETECTION DU VIRUS DE L'HEPATITE B**

(57) Abrégé : La présente invention concerne une méthode de détection et de quantification du virus de l'hépatite B. L'invention porte en outre sur des sondes d'oligonucléotide présentées dans les SEQ ID numéros 1 et 2 pour la détection du virus de l'hépatite B, avec des amorces respectives [sens et antisens] présentées dans les SEQ ID numéros 3, 4, 5 et 6. L'invention concerne en outre un mélange de réaction PCR destiné à la détection du virus de l'hépatite B et un kit de détection du VHB comprenant ledit mélange, ainsi qu'un ensemble d'instructions.

الملخص

يتعلق الاختراع بتوفير الاختراع الحالي طريقة لتحديد وكمية فيرس التهاب الكبد ب. يكشف الاختراع عن مسبارات أوليجونيوكليتيد المذكورة في هوية متوالية أرقام 1 و2 لتحديد فيرس التهاب الكبد ب سوياً مع بوادئ ذات الصلة [إحساس ومضاد إحساس] المذكورة في هوية متوالية أرقام 3، 4، 5 و6. يتم أيضاً توفير خليط تفاعل PCR لتحديد فيرس التهاب الكبد ب وطقم لتحديد HBV تتضمن الخليط المذكور سوياً مع عبوة تعليمات.

(VINGT DEUX PAGES)

BIGTEC PRIVATE LIMITED
P. P. SABA & CO., Casablanca

MA 33040B1

PV|34083

33040

01 FEV 2012

الوصف الكامل

المجال التقني

يتعلق الاختراع الحالي بطريقة لتحديد وجود كمية أحماض نووية لـ HBV (فيرس التهاب الكبد ب) في عينات.

الخلفية والفن السابق

يُحدث HBV التهابات كبدية حادة ومزمنة (التهابات كبدية من النوع ب)، وفي الحالات الشديدة، تليف كبدي وسرطان الكبد. توضح الدراسات الحالية أنه في جميع أنحاء العالم عدد الأشخاص المصابون بفيرس الالتهاب الكبدي ب (HBV) يبلغ تقريباً 300 مليون شخص.

يمكن أن توفر تجارب على أساس PCR لتحديد كشف اتجاه الأحماض النووية لـ HBV في دم/ مصل أو بلازما من حالة مرضية مصابة ميزة في تحديد الحمل الفيروسي الفعلي بمريض مصاب حيث سوف تكون مفيدة للطبيب لمعرفة المرحلة الفعلية للإصابة. يمكن أن يساعد ذلك الطبيب في تقديم علاج ملائم للمريض. يمكن أن يساعد قياس الحمل الفيروسي بدقة أيضاً في مراقبة تقدم العلاج المضاد للفيروسات. تعتمد الطرق المستخدمة حالياً في تشخيص HBV على ELISA (تجربة امتصاص المناعة المرتبطة بالإنزيم) التي تعتمد على وجود مرمّز مصلي مثل، HbeAg، HbsAg، أو مضاد HBc IgM، مضاد HBe، مضاد HBs، أو مضاد HBc IgGs. بما أن الطرق المعتمدة على ELISA لا تعطي نظرة جيدة للحمل الفيروسي الدقيق توجد حاجة للبحث عن طريقة يمكن أن تعطي قياس كمي للحمل الفيروسي. توجد حاجه لطريقة فعّالة من وجهة نظر المشاكل المذكورة أنفاً المرتبطة بالطرق المعروفة للتحديد، لذلك يمكن استخدام ذلك للكشف عن HBV حيث يمكن أن تعطي كلاً من القياس النوعي والكمي للحمل الفيروسي.

الأهداف

يتمثل هدف أول للاختراع الحالي في توفير طريقة لتحديد وجود الأحماض النووية لـ HBV في العينات.

يتمثل هدف ثاني للاختراع الحالي في توفير مسبارات وبوادئ لتحديد HBV.

يتمثل هدف ثالث للاختراع الحالي في توفير خليط تفاعل PCR لتحديد HBV.

يتمثل هدف رابع للاختراع الحالي في توفير يشتمل الطقم على مسبارات وبوادئ لتحديد HBV.

الوصف التفصيلي للرسومات المرفقة

الشكل 1 رسم بياني للزمن الفعلي لعينات HBV موجبة باستخدام طقم تجاري

الشكل 2 رسم بياني للزمن الفعلي لعينات HBV موجبة باستخدام متوالية رقم 1

الشكل 3 رسم بياني للزمن الفعلي لعينات HBV موجبة باستخدام متوالية رقم 2

الشكل 4 رسم بياني للزمن الفعلي لعينات HBV سالبة باستخدام متوالية رقم 1

الشكل 5 رسم بياني للزمن الفعلي لعينات HBV سالبة باستخدام متوالية رقم 2

الشكل 6 منحنى HBV العياري

الكشف عن الاختراع

وفقاً لذلك، يتعلق الاختراع الحالي بمسبارات أوليجونيوكليتيد بمتوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2؛ بوادئ بهوية متوالية أرقام 3، 4، 5 و6؛ خليط تفاعل PCR لتحديد فيرس التهاب الكبد ب، يشتمل الخليط المذكور على كواشف تضخيم الحمض النووي، مسبار مزدوج الترميز المذكورة في متوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2، بوادئ بهوية متوالية أرقام 3، 4، 5، 6 وعينة الاختبار؛ طريقة كشف فيرس التهاب الكبد ب، تشتمل الطريقة على خطوات: تكوين خليط تفاعل يتضمن كواشف تضخيم الحمض النووي، أوليجونيوكليتيد مسبار بمتوالية رقم 1 أو متوالية رقم 2 مع بوادئ مناظرة بهوية متوالية أرقام 3 و4 أو هوية متوالية أرقام 5 و6 على التوالي، عينة اختبار؛ وتقديم خليط التفاعل إلى PCR للحصول على نسخ من المتوالية المستهدفة يلي ذلك قياس الزيادة في إشارة التألق لكشف فيرس التهاب الكبد ب؛ وطقم لتحديد فيرس التهاب الكبد ب، يشتمل الطقم على مسبار مزدوج الترميز بمتوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2، على نحو مستقل أو في توليفة؛ زوج مناظر من بوادئ بهوية متوالية أرقام 3، 4، و5، 6، على نحو مستقل أو في توليفة وكواشف تضخيم.

الوصف التفصيلي

يتعلق الاختراع الحالي بمسبارات أوليجونيوكليتيد بمتوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2.

في أحد نماذج الاختراع تكون المسبارات المذكورة عبارة عن مسبار مزدوج الترميز.

في أحد نماذج الاختراع تكشف المسبارات المذكورة فيرس التهاب الكبد ب.

في أحد نماذج الاختراع تكون المسبارات المذكورة مترافقة مع مرمزات قابلة للكشف بها حاملة تألق عند النهاية '5 ومخمّد في منطقة داخلية أو عند النهاية '3.

في أحد نماذج الاختراع يتم تحديد متوالية رقم 1 لجين سطح فيرس التهاب الكبد ب ويتم تحديد متوالية رقم 2 لمنطقة جين X لفيرس التهاب الكبد ب.

يتعلق الاختراع الحالي ببوادئ بهوية متوالية أرقام 3، 4، 5 و6.

في أحد نماذج الاختراع البوادئ المذكورة لمتوالية رقم 3 ومتوالية رقم 5 تكون عبارة عن إحساس وتكون متوالية رقم 4 ومتوالية رقم 6 عبارة عن بوادئ مضادة للإحساس على التوالي.

في أحد نماذج الاختراع تكون البوادئ المذكورة لمتوالية رقم 3 ومتوالية رقم 4 لمسبار مزدوج الترميز بمتوالية رقم 1 وتكون البوادئ بمتوالية رقم 5 ومتوالية رقم 6 لمسبار مزدوج الترميز بمتوالية رقم 2.

يتعلق الاختراع الحالي بخليط تفاعل PCR لتحديد فيرس التهاب الكبد ب، يشتمل الخليط المذكور على كواشف تضخيم الحمض النووي، مسبار مزدوج الترميز المذكورة في متوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2، بوادئ بهوية متوالية أرقام 3، 4، 5، 6 وعينة الاختبار.

في أحد نماذج الاختراع يتم اختيار العينة المذكورة من مجموعة تتضمن دم، مصل وبلازما.

في أحد نماذج الاختراع يكون PCR المذكور عبارة عن PCR في الزمن الفعلي.

يتعلق الاختراع الحالي بطريقة كشف فيرس التهاب الكبد ب، تشتمل الطريقة على خطوات:

(أ) تكوين خليط تفاعل يتضمن كواشف تضخيم الحمض النووي، أوليجونيوكليتيد مسبار بمتوالية رقم 1 أو متوالية رقم 2 مع بوادئ مناظرة بهوية متوالية أرقام 3 و4 أو هوية متوالية أرقام 5 و6 على التوالي، عينة اختبار؛ و

(ب) تقديم خليط التفاعل إلى PCR للحصول على نسخ من المتوالية المستهدفة يلي ذلك قياس الزيادة في إشارة التألق لكشف فيرس التهاب الكبد ب.

في أحد نماذج الاختراع تكون المسبارات المذكورة مترافقة مع مرمزات قابلة للكشف بها حاملة تألق عند النهاية '5 ومخمّد في منطقة داخلية أو عند النهاية '3.

في أحد نماذج الاختراع البوادئ المذكورة لمتوالية رقم 3 ومتوالية رقم 5 تكون عبارة عن إحساس وتكون متوالية رقم 4 ومتوالية رقم 6 عبارة عن بوادئ مضادة للإحساس على التوالي.

في أحد نماذج الاختراع يتم اختيار عينة الاختبار المذكورة من مجموعة تتضمن دم، مصل وبلازما.

في أحد نماذج الاختراع تشتمل كواشف التضخيم المذكورة على كلوريد ماغنسيوم، بوليمراز Taq ومنظّم للتضخيم.

في أحد نماذج الاختراع يكون الكشف المذكور عبارة عن نوعي أو كمي بطبيعته.

في أحد نماذج الاختراع يتم اختيار حامل التألق المذكور من مجموعة تتضمن فلوريسين ومشتقات فلوريسين FAM، VIC، JOE، 5-(2'- أمينو إيثيل) أمينو نافثيالين -1- سلفونيك حمض، كومارين وكومارين مشتقات، لوسيفير أصفر، تكساس أحمر، تترا ميثيل روداميين، 6- كربوكسي فلوريسين، تترا كلورو -6- كربوكسي فلوروسين، 5- كربوكسي رودامين وصبغات سيانين.

في أحد نماذج الاختراع يتم اختيار المخمّد المذكور من مجموعة تتضمن تترا ميثيل روداميين [TAMRA]، 4'-(4 - داي ميثيل أمينو فينيل آزو) بنزويك حمض، 4 - داي ميثيل أمينو فينيل آزو فينيل -4'- مالي إيميد، تترا ميثيل روداميين، كربوكسي تترا ميثيل رودامين وصبغات BHQ.

في أحد نماذج الاختراع يكون حامل التألق على نحو مفضّل عبارة عن 6- كربوكسي فلوريسين عند النهاية '5 ويكون المخمّد المذكور على نحو مفضّل عبارة عن تترا ميثيل روداميين عند النهاية '3 أو مخمّد ذو الثقب الأسود 1 [BHQ1] في المنطقة الداخلية أو عند النهاية '3.

يتعلق الاختراع الحالي بطقم لتحديد فيرس التهاب الكبد ب، يشتمل الطقم على مسبار مزدوج الترميز بمتوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2، على نحو مستقل أو في توليفة؛ زوج مناظر من بوادئ بهوية متوالية أرقام 3، 4، و5، 6، على نحو مستقل أو في توليفة وكواشف تضخيم.

في أحد نماذج الاختراع تشتمل كواشف التضخيم المذكورة على كلوريد ماغنسيوم، بوليمراز Taq ومنظّم للتضخيم.

<u>قائمة المتوالية الحيوية الخاصة بالاختراع</u>

يكون لمتوالية رقم 1 والبوادئ المناظرة 3 و4 أرقام تعريف المتوالية كما هي موضحة في الجدول 1 التالي:

رقم هوية المتوالية	متوالية النيوكليوتيد
متوالية رقم 1	**5'– FAM – CCTCAGTCCGTTTCTCCTGGCTCAGTT – TAMRA – 3'** أو **5'–FAM - CCTCAGTCCGTT/iBHQ1T/CTCCTGGCTCAGTT-Phos– 3'**
متوالية رقم 3	**5' – TGCACCTGTATTCCCATCCC – 3'**
متوالية رقم 4	**5' – CCACATCATCCATATAACTGAAAGCC – 3'**

الجدول - 1

يكون لهوية المتوالية رقم 2 والبوادئ المناظرة 5 و6 لها أرقام تعريف المتوالية كما هي موضحة في الجدول 2.

الجدول - 2

رقم هوية المتوالية	متوالية النيوكليوتيد
متوالية رقم 2	**5' – FAM – CCCCTTCTTCGTCTGCCGT – TAMRA – 3'** أو **5' – FAM – CCCCTTCTTCG/iBHQ1T/CTGCCGT – Phos- 3'**
متوالية رقم 5	**5' – CGTCGGCGCTGAATCC – 3'**
متوالية رقم 6	**5' – GAAGCGAAGTGCACACGG – 3'**

يمكن استخدام التمييز مسبارات "أوليجونيوكليتيد " لتحديد HBV أحماض نووية في عينة مصابة باستخدام PCR في الزمن الفعلي. يكون نظام التحديد عن طريق قياس الزيادة في التألق أثناء PCR.

تم بحث قاعدة بيانات HBV بالكامل لتحديد معظم المناطق المحفوظة المحددة لجينوم HBV. تم اختيار المناطق المرجوة أكثر مع المناطق المحفوظة لتمييز مجموعات البادئ والمسبار. تم الحصول على المناطق المحفوظة داخل السطح وجينات X وتحليلها لتميز مسبارات وبوادئ.

وفقاً للاختراع الحالي تكون تم تمييز هوية المتوالية رقم 1 سوياً مع بوادئ إحساسها ومضادة إحساسها بمتوالية رقم 3 ومتوالية رقم 4 لجينوم جين سطح HBV. على نحو مماثل، تم تمييز متوالية رقم 2 سوياً مع بوادئ إحساسها ومضادة لإحساسها المناظرة بمتوالية رقم 5 ومتوالية رقم 6 لجين X من جينوم HBV.

وفقاً للاختراع الحالي يكون لـ "أوليجونيوكليتيد " المذكور بمتوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2 ترميز قابل للكشف باستخدام حامل التألق عند النهاية '5 والمخمّد في المنطقة الداخلية أو عند النهاية '3. يتم اختيار حامل التألق من مجموعة تتضمن فلوريسين ومشتقات فلوريسين FAM، VIC، JOE، 5-(2'- أمينو إيثيل) أمينو نافثياليين -1- سلفونيك حمض، كومارين وكومارين مشتقات، لوسيفير أصفر، تكساس أحمر، تترا ميثيل رودامين، 6- كربوكسي فلوريسين، تترا كلورو -6- كربوكسي فلوروسين، 5- كربوكسي رودامين وصبغات سيانين.

في نموذج آخر أيضاً من الاختراع الحالي يتم اختيار المخمّد المذكور من مجموعة تتضمن تترا ميثيل رودامين، 4'-(4 - داي ميثيل أمينو فينيل آزو) بنزويك حمض، 4 - داي ميثيل أمينو فينيل آزو فينيل -4'- مالي إيميد، تترا ميثيل رودامين، كربوكسي تترا ميثيل رودامين وصبغات BHQ. يكون حامل التألق على نحو مفضّل عبارة عن 6- كربوكسي فلوريسين [FAM] ويكون المخمّد عبارة عن مخمّد ذو الثقب الأسود 1 [BHQ1] عندما يوجد على نحو طبيعي وتترا ميثيل رودامين [TAMRA] أو مخمّد ذو الثقب الأسود 1 [BHQ1] عندما يوجد عند النهاية '3.

يتعلق الاختراع الحالي بطريقة لكشف فيرس التهاب الكبد ب، حيث يشتمل خليط PCR المذكور على كواشف تضخيم الحمض النووي، مسبارات "أوليجونيوكليتيد" المميزة على هيئة متوالية رقم 1 أو متوالية رقم 2، سوياً مع بوادئها المناظرة بهوية متوالية أرقام 3، 4، 5 و6 ويتم تقديم عينة الاختبار للتضخيم باستخدام PCR في الزمن الفعلي للحصول على نسخ من المتوالية المستهدفة. يتم قياس التضخّم فيما يتعلق بالزيادة في إشارة التألق.

يكون لمسبار "أوليجونيوكليتيد " حجم يتراوح من 19-27 نيوكليوتيد. يكون بالمسبارات المميزة حامل تألق عند النهاية '5 ومخمّد في المنطقة الداخلية أو عند النهاية '3.

يكون حامل التألق على نحو مفضّل عبارة عن 6- كربوكسي فلوريسين [FAM] ويكون المخمّد عبارة عن مخمّد ذو الثقب الأسود 1 [BHQ1] عندما يوجد على نحو طبيعي وترا ميثيل رودامين [TAMRA] أو مخمّد ذو الثقب الأسود 1 [BHQ1] عندما يوجد عند النهاية '3. يتم استخدام الاختراع الحالي لتحديد فيرس التهاب الكبد ب الموجود في دم /مصل/بلازما العينات. تكون الطريقة المستخدمة للكشف عن طريق مراقبة الزيادة في التألق أثناء PCR.

وفقاً للاختراع الحالي يشير التعبير مسبار "أوليجونيوكليتيد " إلى متوالية قصيرة من حمض ريبونيوكليك (RNA) أو حمض ديوكسي ريبونيوكليك (DNA). يمكن أن تكون مسبارات "أوليجونيوكليتيد" مهجّن بشكل خاص لأحماض نووية من كل الأنماط الجينية لفيرس الالتهاب الكبدي ب (HBV). تكون مسبارات "أوليجونيوكليتيد" وفقاً للاختراع الحالي بصفة عامة بين حوالي 19-27 نيوكليوتيد في الطول. يتم تهجين مسبارات "أوليجونيوكليتيد" المذكورة في هذه الوثيقة بشكل خاص بسلسلة الحمض النووي لـ HBV بدون عرض تهجين غير محدد للأحماض النووية لغير HBV.

تتبع مسبارات متوالية "أوليجونيوكليتيد" المستخدمة في هذه الوثيقة المباديء الكيميائية لـ Taqman. يتم تسمية مسبارات TaqMan أيضاً بأوليجونيوكليتيد Double-Dye أو مسبار مزدوج الترميز، وتكون من النوع الأكثر استخداماً من المسبارات. تم تطويرها بواسطة Roche [Basel, Switzerland] وABI [Foster City, USA] من التجربة التي تستخدم مسبار مرمّزة إشعاعياً وتتكون

من متوالية مسبار أحادية السلسلة التي تتكامل مع أحد سلاسل الأمبليكون. حامل التألق عندما يمرر طاقته بشكل مثار، عبر FRET (نقل طاقة رنين التألق)، إلى المخمّد. أثناء PCR في الزمن الفعلي يرتبط المسبار بالأمبليكون أثناء كل خطوة تلدين PCR. عندما يمتد البوليمراز Taq من الرابطة الرئيسية إلى أمبليكون فإنها تزيح النهاية 5′ من المسبار، حيث يتم بعد ذلك حلها بواسطة نشاط 5′ -3′ نيوكلياز خارجي من بوليمراز Taq. يستمر الإنقسام حتى يتم إذابة المسبار المتبقي بالانصهار من أمبليكون. تطلق تلك العملية حامل التألق والمخمّد داخل المحلول، بصف خاصة تفصلها بالمقارنة بالحالة التي يتم فيها حفظها سوياً بواسطة المسبار. يؤدي ذلك إلى زيادة في التألق غير قابلة للرجعة من حامل التألق.

يتم توفير مسبارات "أوليجونيوكليتيد" بهوية متوالية أرقام 1 و2 وفقاً للاختراع الحالي، لذلك، أيضاً في توليفة مع بوادئ إحساسها ومضادة إحساسها المناظرة بهوية متوالية أرقام 3، 4، 5 و6 على التوالي، حيث يمكن استخدامها لتضخيم بشكل خاص وكشف متواليات الحمض النووي لـ HBV في عينة اختبار بواسطة PCR في الزمن الفعلي.

تم تفصيل تقنية التطبيق الفوري مرة أخرى بمساعدة الأمثلة التالية. ومع ذلك، لا يجب تفسير الأمثلة كمقيدة لمجال الاختراع.

تم تحليل كفاءة وحساسية مسبارات أوليجونيوكليتيد بمتوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2 ومقارنتها بالطقم العياري التجاري. تم استخدام بعض تركيزات كواشف PCR في الزمن الفعلي، القالب وأوليجات في كل حالة وأيضاً حفظ ظروف تدوير ثابتة لكل التفاعلات. بناءً على النتيجة الناتجة من الطقم العياري التجاري، تم تحليل مسبارات أوليجونيوكليتيد بهوية متوالية أرقام 1 و2 لتحديد الحساسية والخصوصية.

المثال رقم: 1

تم عزل DNA من 10 عينات من مصل HBV موجب و10 عينات من مصل HBV سالب باستخدام طقم تجاري. تم تنفيذ تفاعلات PCR في الزمن الفعلي لكل العينات باستخدام مسبارات أوليجونيوكليتيد المميزة على هيئة متوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2 سوياً مع بوادئها المناظرة بهوية متوالية أرقام 3، 4، 5 و6 على التوالي. تمت مقارنة حساسية مسبارات الأوليجونيوكليتيد هذه في التقاط العينات المصابة باستخدام طقم عياري تجاري. تم استخدام بعض تركيزات كواشف PCR في الزمن الفعلي، والقالب والبواديء في كل

حالة وتم حفظ ظروف المعالجة أيضاً ثابتة لكل التفاعلات. تكون تركيبة خلط PCR في الزمن الفعلي وظروف PCR كما هي معطاة في الجدول 3 و4.

الجدول 3: PCR في الزمن الفعلي مع الخليط المسبق لـ Takara

PCR في الزمن الفعلي لتركيبة خليط رئيسية	
الخليط المسبق	5.0 ميكرو لتر
بادئ أمامي	0.2 ميكرو لتر (2بيكو مول)
بادئ عكسي	0.2 ميكرو لتر (2بيكو مول)
مسبار	0.2 ميكرو لتر (2بيكو مول)
العينة	2.0 ميكرو لتر
الإجمالي	2.4 ميكرو لتر

الجدول 4: ظروف دورة PCR في الفعلي

برنـامج PCR	
الخطوة 1	95 درجة مئوية لمدة 60 ثانية
الخطوة 2	95 درجة مئوية لمدة 5 ثانية
الخطوة 3	60 درجة مئوية لمدة 34 ثانية

سوف يتم إعادة الخطوة 2 و3 عدد 40 مرة

توضّح النتائج الناتجة أن مسبارات أوليجونيوكليتيد المميزة على هيئة متوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2 تلتقط فقط عينات HBV الموجبة ولا تعرض أي تضخيم زائف للعينات السالبة.

توضّح أوليجونيوكليتيد متوالية رقم 1 التي تلتقط كل العينات الـ 10 الموجبة خلال 40 دورة (قطع العينة الموجبة) 100% تخصيص. بخلاف الـ 10 عينات الموجبة المكتشفة، تم كشف 9 عينات مبكراً بالمقارنة بالطقم العياري التجاري.

على نحو مماثل، توضح أوليجونيوكليتيد بمتوالية رقم 2 التي تلتقط كل الـ 10 عينات الموجبة خلال 40 دورة (قطع العينة الموجبة) 100% تخصيص. بخلاف الـ 10 عينات الموجبة المكتشفة، تم اكتشاف عينتين مبكراً بالمقارنة بالطقم العياري التجاري.

بما أن متوالية رقم 1 تلتقط عدة عينات مبكراً عن الطقم العياري التجاري. لذلك، تكون متوالية رقم 1 عبارة عن مسبار أفضل لفحص إصابات HBV فيما يتعلق بالتخصيص والحساسية. ومع ذلك يمكن استخدام كلاً من مسبارات أوليجونيوكليتيد، متوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2 لتحديد إصابات HBV.

الجدول: 5 يوفر كفاءة ضغط متوالية رقم 1 باستخدام طقم تجاري Ct. على نحو مماثل، الجدول: 6 يوفر كفاءة ضغط متوالية رقم 2 باستخدام طقم تجاري Ct. تم توفير رسم بياني لـ PCR في الزمن الفعلي لطقم تجاري، متوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2 في الشكل 1، 2، 3، 4 و5.

الجدول 5: الضغط باستخدام طقم عياري تجاري

هوية العينة	طقم تجاري Ct	هوية متوالية Ct رقم 1
موجب 1	20.27	19.42
موجب 2	17.48	17.22
موجب 3	19.44	19.06
موجب 4	32.03	26.04
موجب 5	28.56	29.69
موجب 6	27.37	23.73
موجب 7	29.1	27.34
موجب 8	30.12	27.99
موجب 9	26.92	24.17
موجب 10	37.46	35.11

الجدول 6: الضغط باستخدام طقم عياري تجارية

هوية العينة	طقم تجاري Ct	هوية متوالية Ct رقم 2
موجب 1	20.27	22.26
موجب 2	17.48	20.18

موجب 3	19.44	22
موجب 4	32.03	30.46
موجب 5	28.56	31.19
موجب 6	27.37	29.65
موجب 7	29.1	30.28
موجب 8	30.12	28.64
موجب 9	26.92	27.02
موجب 10	37.46	39.20

المثال رقم: 2

يمكن لأحد الأشخاص تحديد كمية الحمل الفيروسي عن طريق رسم منحنى عياري. بالنسبة للمنحنى العياري تم تقديم نسل 25 ميكرو لتر من DNA HBV إلى PCR تقليدية باستخدام خلط PCR يحتوي على dNTPS، بوليميراز Taq DNA، محلول منظم للإنزيم، $Mgcl_2$ وبوادئ محددة لسطح ومناطق جين X. وكانت ظروف PCR كما يلي:

الخطوة 1: 95^0 درجة مئوية لمدة 120 ثانية

الخطوة 2: 95^0 درجة مئوية لمدة 20 ثانية

الخطوة 3: 60^0 درجة مئوية لمدة 40 ثانية

تمت إعادة الخطوات 2 و3 لـ 40 دورة

بعد PCR تم تقديم العينة المضخمة إلى استشراد كهربائي على 3 % من جيل أجاروز والتلبيد باستخدام بروميد إيثيديوم. تم استئصال مجموعة الأمبليكون التي تكون بطول حوالي 1.2 زوج كيلو باز وتقابل السطح ومناطق جين C لجينوم HBV بعد ذلك من الجل وتنقيتها باستخدام طقم استخراج جل Qiaquick. تم تقدير امتصاص DNA الأمبليكون المنقى (2 ميكرو لتر) عند 260 نانو متر بالتقطير بحجم النانو. تم احتساب معامل إخماد DNA من المعامل الأساسي المستقل بالتجميع.

تم احتساب النانو مول للأمبليكون باستخدام المعادلة التالية:

نانو مول / مل = 1000 × قطر خارجي 260 (1 سم) × 1 مل (حجم)

معامل إخماد الأمبليكون

تم احتساب عدد النسخ باستخدام المعادلة:

عدد النسخ / مل = (مول/ مل) × عدد أفوكادرو.

الاستنتاجات:

القطر الخارجي 260 = 0.522

معامل الإخماد = 33675.1

نانو مول / مل = 0.015501068

نسخ/ مل = 9.34×10^{12}

من عدد نسخ الأمبليكون النقي يمكن رسم منحنى عياري عن طريق إدخال 10^8 إلى 10^3 كميات مخفف من الأمبليكون باستخدام PCR في الزمن الفعلي. تم إعطاء تركيبة الخليط السابق من PCR في الزمن الفعلي وبرنامج PCRme في الجدول 3 و4.

من Ct الناتج من المنحنى العياري، الشكل 6، يمكن احتساب عدد النسخ لعينات غير معروفة في الشكل 6 والجدول 7.

الجدول 7: قيم المنحنى العياري بالنسبة لـ Ct

التسلسل	Ct	نسخ/ مل
1	20.6	1×10^8
2	23.7	1×10^7
3	28.3	1×10^6
4	31.3	1×10^5
5	34.2	1×10^4
6	37.1	1×10^3

الاستنتاج

(أ) لم تظهر أي من العينات السالبة إشارة موجبة زائفة عن طريق تمييز مسبارات أوليجونيوكليتيد المميزة على هيئة متوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2.

(ب) أوضح أوليجونيوكليتيد بمتوالية رقم 1، المصمم لجين سطح HBV، تخصيص وحساسية جيدة (100%). بخلاف الـ 10 عينات الموجبة تم التقاط 9 مبكراً عن الطقم العياري التجاري، الجدول 5.

(ج) يلتقط أوليجونيوكليتيد متوالية رقم 2، المصمم لجين X من HBV، أيضاً كل الـ 10 عينات الموجبة موضحة 100% تخصيص. بخلاف الـ 10 عينات الموجبة تم التقاط 2 مبكراً عن الطقم العياري التجاري، الجدول 6.

(د) بناءً على دراسات التقييم الشامل، تم اعتبار متوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2 الأفضل لتحديد HBV مقابل الأطقم التجارية.

(ه) في النهاية يمكن استخدام مسبارات أوليجونيوكليتيد المميزة على هيئة متوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2 لتحديد كمية الحمل الفيروسي في عينة مصابة.

قائمة المتواليات

<110> Bigtec Private Limited

<120> مسبارات أوليجونيوكليتيد وبوادئ لتحديد فيروس التهاب الكبد ب

<130> PCT0940

<150> 314/CHE/2009

<151> 2009-02-13

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 27

<212> DNA (د ن أ) الحمض النووي

<213> فيروس الالتهاب الكبدي ب

<400> 1

cctcagtccg tttctcctgg ctcagtt 27

<210> 2

<211> 19

<212> DNA (د ن أ) الحمض النووي

<213> فيروس الالتهاب الكبدي ب

<400> 2

ccccttcttc gtctgccgt 19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA (د ن أ) الحمض النووي

<213> فيروس الالتهاب الكبدي ب

<220>

<221> رابط بادئة

<222> (1)..(20)

<400> 3

tgcacctgta ttcccatccc 20

<210> 4

<211> 26

<212> DNA (د ن أ) الحمض النووي

<213> فيروس الالتهاب الكبدي ب

<220>

<221> رابط بادئة

<222> (1)..(26)

<400> 4

ccacatcatc catataactg aaagcc 26

<210> 5

<211> 16

<212> DNA (د ن أ) الحمض النووي

<213> فيروس الالتهاب الكبدي ب

<220>

<221> رابط بادئة

<222> (1)..(16)

<400> 5

cgtcggcgct gaatcc 16

<210> 6

<211> 18

<212> DNA (د ن أ) الحمض النووي

<213> فيروس الالتهاب الكبدي ب

<220>

<221> رابط بادئة

<222> (1)..(18)

<400> 6

gaagcgaagt gcacacgg 18

العناصر الجديدة المطلوب حمايتها

1- مسبارات أوليجونيوكليتيد كما هو مذكور في متوالية رقم 1 أو متوالية رقم 2.

2- المسبارات وفقاً لعنصر الحماية 1، حيث تكون المسبارات المذكورة عبارة عن مسبارات مزدوجة الترميز وتترافق مع مرمزات قابلة للكشف بها حاملة تألق عند النهاية '5 ومخمّد في منطقة داخلية أو عند النهاية '3.

3- المسبارات وفقاً لعنصر الحماية 1، حيث تكشف المسبارات المذكورة فيرس التهاب الكبد ب؛ وتم تحديد هوية المتوالية رقم 1 لجين سطح فيرس التهاب الكبد ب وتم تحديد متوالية رقم 2 لمنطقة جين X لفيرس التهاب الكبد ب.

4- بوادئ كما هي مذكورة في هوية متوالية أرقام 3، 4، 5 أو 6.

5- البوادئ وفقاً لعنصر الحماية 4، حيث تكون البوادئ المذكورة من متوالية رقم 3 ومتوالية رقم 5 عبارة عن إحساس وتكون متوالية رقم 4 ومتوالية رقم 6 عبارة عن بوادئ مضادة للإحساس على التوالي.

6- البوادئ وفقاً لعنصر الحماية 4، حيث تكون البوادئ المذكورة من متوالية رقم 3 ومتوالية رقم 4 لمسبار مزدوج الترميز بمتوالية رقم 1 وتكون بوادئ بمتوالية رقم 5 ومتوالية رقم 6 لمسبار مزدوج الترميز بمتوالية رقم 2.

7- خليط تفاعل PCR لتحديد فيرس التهاب الكبد ب، يشتمل الخليط المذكور على كواشف تضخيم الحمض النووي، مسبارات مزدوجة الترميز كما هي مذكورة في متوالية رقم 1 أو متوالية رقم 2، بوادئ مناظرة كما هي مذكورة في هوية متوالية أرقام 3 و4 أو هوية متوالية أرقام 5 و6 على التوالي، وعينة الاختبار.

8- خليط تفاعل PCR وفقاً لعنصر الحماية 7، حيث يتم اختيار العينة المذكورة من مجموعة تتضمن دم، مصل وبلازما؛ ويتم استخدام الخليط المذكور في زمن PCR الفعلي.

9- طريقة كشف فيرس التهاب الكبد ب، تشتمل الطريقة على خطوات:

(أ) تكوين خليط تفاعل يتضمن كواشف تضخيم الحمض النووي، أوليجونيوكليتيد مسبار كما هو مذكور في متوالية رقم 1 أو متوالية رقم 2 مع بوادئ مناظرة كما هي مذكورة في هوية متوالية أرقام 3 و4 أو هوية متوالية أرقام 5 و6 على التوالي، عينة اختبار؛ و

(ب) تقديم خليط التفاعل إلى PCR للحصول على نسخ من المتوالية المستهدفة يلي ذلك قياس الزيادة في إشارة التألق لكشف فيرس التهاب الكبد ب.

10- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 9، حيث تكون المسبارات المذكورة مترافقة مع مرمزات قابلة للكشف بها حاملة تألق عند النهاية '5 ومخمّد في منطقة داخلية أو عند النهاية '3.

11- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 9، حيث البوادئ المذكورة من متوالية رقم 3 ومتوالية رقم 5 تكون عبارة عن إحساس وتكون متوالية رقم 4 ومتوالية رقم 6 عبارة عن بوادئ مضادة للإحساس على التوالي.

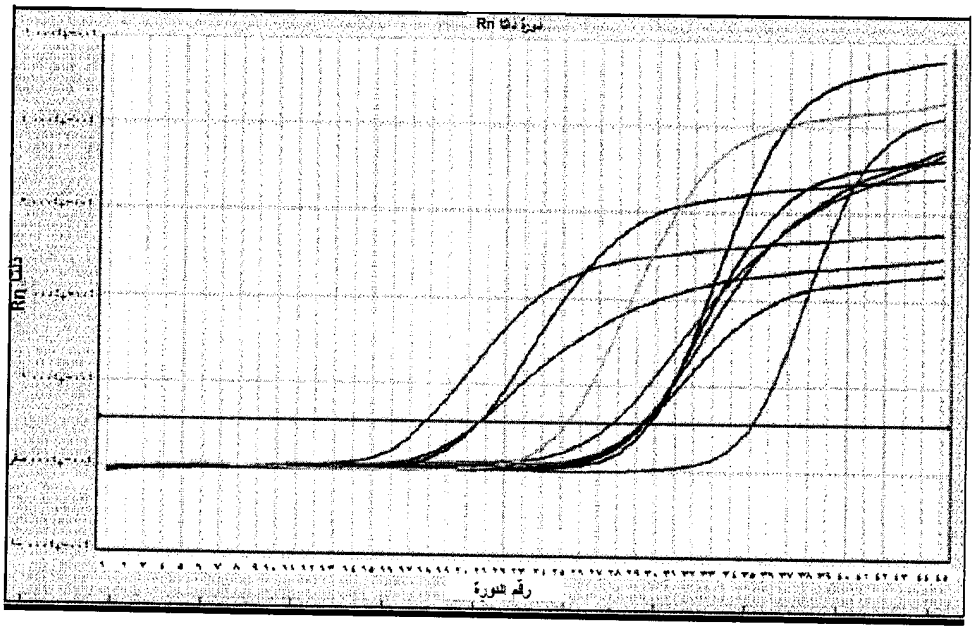
12- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 9، حيثيتم اختيار عينة الاختبار المذكورة من مجموعة تتضمن دم، مصل وبلازما؛ وتشتمل كواشف التضخيم المذكورة على كلوريد ماغنسيوم، بوليمراز Taq ومنظّم للتضخيم.

13- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 9، حيث يكون الكشف المذكور عبارة عن نوعي أو كمي بطبيعته.

14- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 10، حيث يتم اختيار حامل التأقل المذكور من مجموعة تتضمن فلوريسين ومشتقات فلوريسين FAM، VIC، JOE، حمض 5-(2'- أمينو إيثيل) أمينو نافثيالين -1- سلفونيك، كومارين ومشتقات كومارين، لوسيفير أصفر، تكساس أحمر، تترا ميثيل رودامين، 6- كربوكسي فلوريسين، تترا كلورو -6- كربوكسي فلوروسين، 5- كربوكسي رودامين وصبغات سيانين، على نحو مفضّل 6- كربوكسي فلوريسين؛ ويتم اختيار المخمّد المذكور من مجموعة تتضمن تترا ميثيل رودامين [TAMRA]، حمض 4'-(4 - داي ميثيل أمينو فينيل آزو) بنزويك، 4 - داي ميثيل أمينو فينيل آزو فينيل -4'- مالي إيميد، تترا ميثيل رودامين، كربوكسي تترا ميثيل رودامين وصبغات BHQ، على نحو مفضّل تترا ميثيل رودامين عند النهاية '3 أو مخمّد ذو الثقب الأسود 1 [BHQ1] في المنطقة الداخلية أو عند النهاية '3.

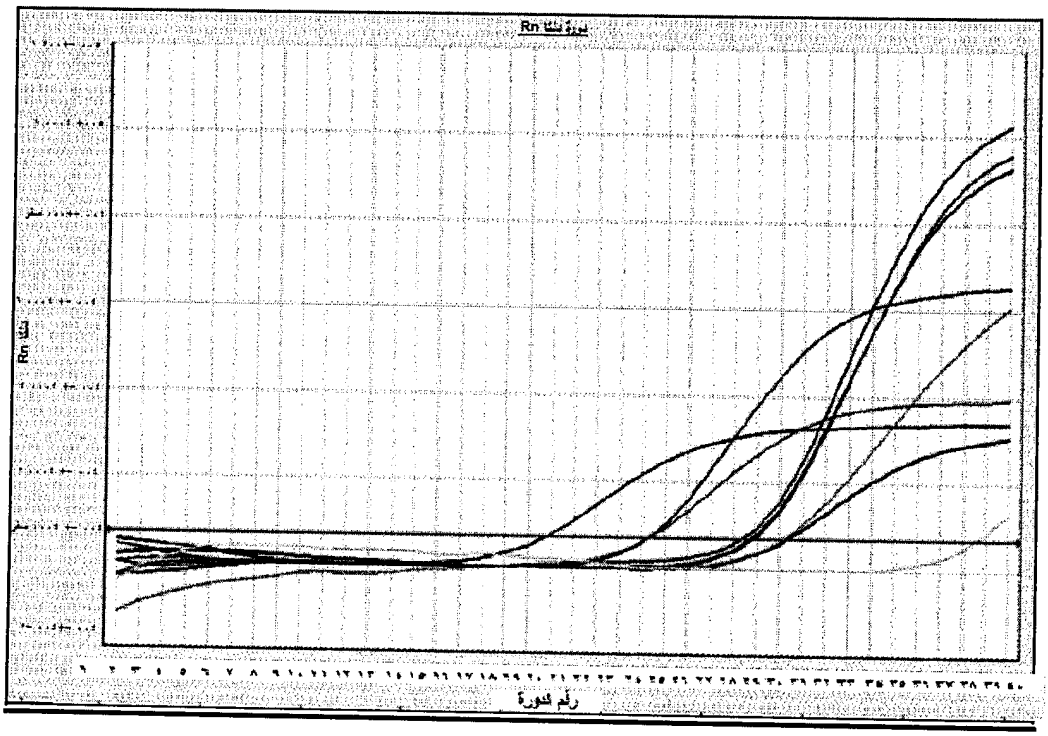
15- طقم لتحديد فيرس التهاب الكبد ب، يشتمل الطقم على مسبارات مزدوجة الترميز كما هي مذكورة في متوالية رقم 1 ومتوالية رقم 2، على نحو مستقل أو في توليفة؛ زوج مناظر من بوادئ كما هي مذكورة في هوية متوالية أرقام 3، 4، و5، 6، على نحو مستقل أو في توليفة وكواشف تضخيم.

16- الطقم وفقاً لعنصر الحماية 15، حيث تشتمل كواشف التضخيم المذكورة على كلوريد ماغنسيوم، بوليمراز Taq ومنظّم للتضخيم.

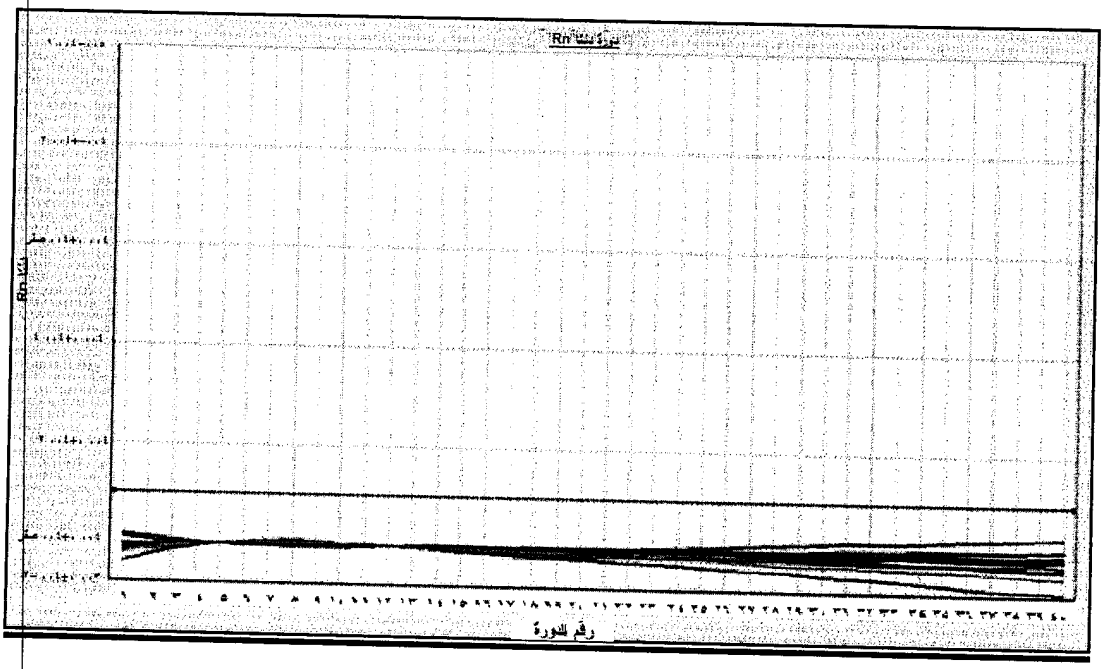


شكل (١)

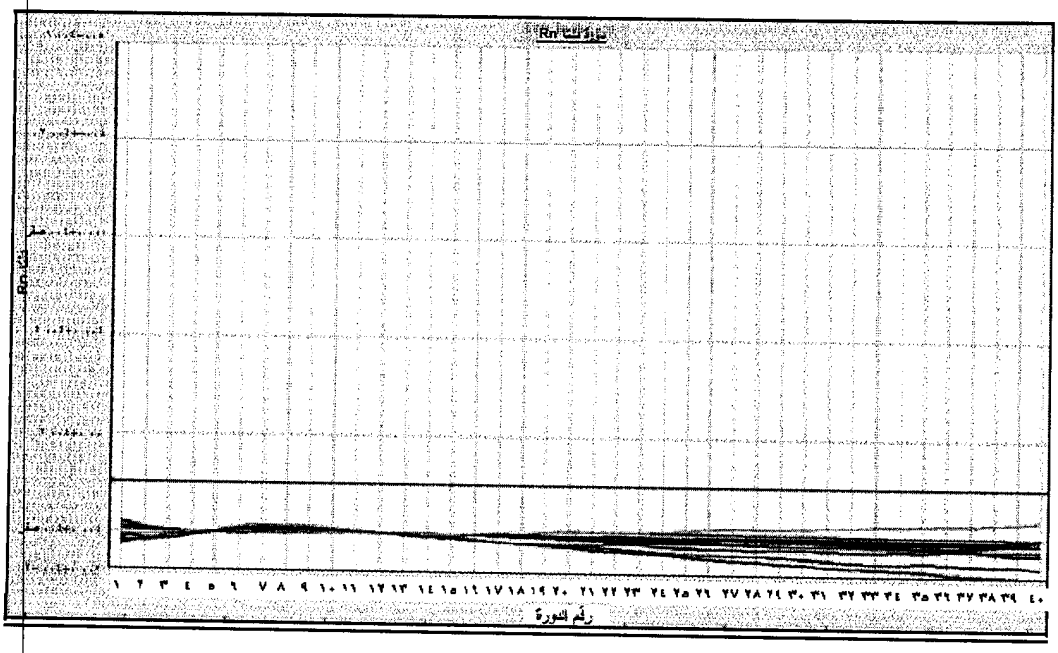
شكل (٢)



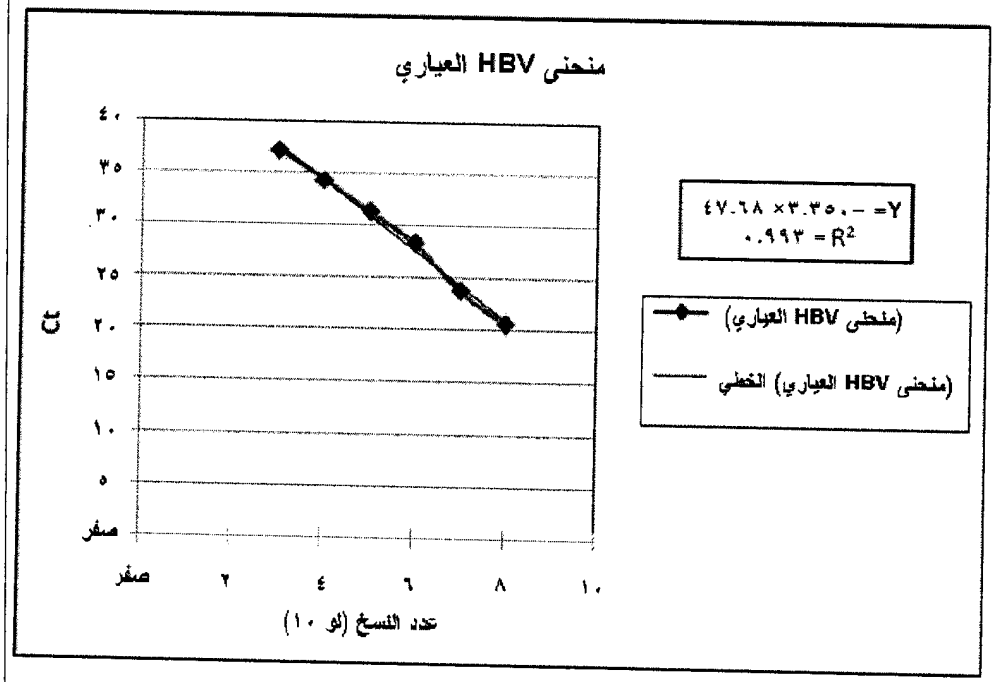
شكل (٣)



شكل (٤)


Rn
رقم الدورة

شكل (٥)


منحنى HBV العياري
Ct
عدد النسخ (لو ١٠)
Y= -٣.٣٥٠ × ٤٧.٦٨
R² = ٠.٩٩٣
(منحنى HBV العياري)
(منحنى HBV العياري) الخطي