مدينة الملك عبدالعزيز
للعلوم والتقنية KACST

[19] المملكة العربية السعودية SA
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[11] رقم البراءة: ٣٥٦٢
[45] تاريخ المنح: ١٤٣٥/١٠/٢٢ هـ
الموافـــق: ٢٠١٤/٠٨/١٨ م

[12] براءة اختراع

[72] اسم المخترع: اندريو جينكينز، آني - جري الوم، ليندا ستراند

[73] مالك البراءة: يونيلابس تيليلابس آيه اس
عنوانه: سترومد السجورديت ٤ إن - ٣٧٢٧ سكيين، النرويج
جنسيته: نرويجية

[74] الوكيل: سليمان ابراهيم العمار

[21] رقم الطلب: ١١٠٣١٠٣٣١

[22] تاريخ الإيداع: ١٤٣١/٠٥/١٤ هـ
الموافق: ٢٠١٠/٠٤/٢٨ م

[30] بيانات الأسبقية:

NO	٢٠٠٩١٧٣٣	٢٠٠٩/٠٤/٣٠ م

[51] التصنيف الدولي (IPC[8]):
C12N 15/11

[56] المراجع:

WO	١٩٩٩١٤٣٧٧	١٩٩٩/٠٣/٢٥ م
DE	١٩٩٠٣٠٥٦	٢٠٠٠/٠٣/٠٨ م
WO	٢٠٠٦٠٧٧١٠٢	٢٠٠٦/٠٧/٢٧ م

اسم الفاحص: ماجد بن غرم الله الغامدي

[54] اسم الاختراع: طريقة لاكتشاف فيروس من نوع الورم الحليمي البشري (HPV)

A method for detection of human papillomavirus (HPV) type

[57] الملخص: يتعلق الاختراع الحالي بطريقة لاكتشاف فيروس من أنواع الورم الحليمي البشري human papillomavirus (HPV) و طقم لاكتشاف أنواع الورم الحليمي البشري المذكورة .

عدد عناصر الحماية (٥)، عدد الأشكال (٢٠)

طريقة لاكتشاف فيروس من نوع الورم الحليمي البشري (HPV)

A method for detection of human papillomavirus (HPV) type

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع الحالي بالكشف عن، انتساخ والحساب الكمي typing and quantitation للفيروسات الحليمية البشرية human papillomavirus (HPV) في عينات إكلينيكية. وبشكل أكثر تحديداً ، يتعلق بمتواليات أوليجيونيوكليوتيد oligonucleotide يمكن استخدامها في تفاعلات التضخيم ويتم استخدامها للاكتشاف المتزامن ، الانتساخ و الحساب الكمي لمجموعة من genomes HPV و طقم تشخيص لها.

تم تسجيل عدوى الفيروس الحليمي البشري (HPV) كسبب لسرطان الرقبة في الثمانينات. تم اعتبار العلاقة بين السرطانات الخبيثة والنمط الظاهري لـ HPV بأنها هامة. تم تحديد أكثر من ١٢٠ نوع منHPV . تم تحديد ثلاثة عشر نوعاً منها على أنها ورمية في الأنسجة المخاطية الظهارية . تشتمل تلك الأنواع على الورم الحليمي البشري (HPV) ١٦ ، ١٨، ٣١، ٣٣، ٣٥، ٣٩، ٤٥، ٥١، ٥٢، ٥٦، ٥٨، ٥٩ و ٦٦.

تقتصر العدوى infections بالفيروسات الحليمية البشرية على النسيج البطاني والذي يعمل على تقليل اتصالها بالجهاز المناعي immune apparatus وبالتالي لا يتم توليد المناعة بشكل كبير. وبالتالي لا يكون علم الأمصال مفيداً في اختبار HPV . وبشكل مشابه، لا تكون المزرعة مفيدة كتقنية تشخيص. وعلى الرغم من أنه من الممكن عمل دورة حياة الفيروس virus life cycle في المعمل فإن تقنية زراعة النسيج tissue culture تقنية عالية الدقة وتتطلب تمييز الخلية البطانية

epithelial cell في المعمل. بالإضافة إلى ذلك، فإن تكوين الورم في الرقبة عال الدرجة والسرطانات high grade cervical neoplasias and cancers الأخرى لا تنتج أي فيروس. وبالتالي يعتمد اختبار HPV على الكشف عن الأحماض النووية الفيروسية viral nucleic acids .

أوضح اختبار HPV أن له حساسية عالية بالمقارنة باختبارPAP (اختبار Papanicolaou) المتعلق بخلل التنسج في الرقبة عال الدرجة، على الرغم من الخاصية المنخفضة نتيجة التكافؤ العالي الخاص بالعدوى الحميدة أو عدوى HPV الانتقالية transient HPV infections.

اعتمدت العديد من البلدان على اختبار HPV كاختبار تصفية ثانوي (إصابة) فيما يتعلق بتكوين الورم الملتبس واستخدامه في الفحص الأوليّ الذي يمكن اقتراحه.

يكون اختبار HPV السائد هو اختبار Digene HCII الحالي والذي يتم دعم الاستخدام الخاص به عن طريق العدد الكبير للمراجع العلمية المختصة به. وفي هذا الاختبار، يتم تهجين hybridised HPV DNA في العينة بـ RNA المتمم وينتج عن ذلك نواتج تهجين DNA-RNA والتي يتم مسكها من خلال الأجسام المضادة antibodies على السطح الصلب solid surface حيث ترتبط بعد ذلك بمترافقات الجسم المضاد–الإنزيم والتي يتم اكتشافها عن طريق الوميض الكيميائي الحفزي الإنزيمي enzyme-catalysed chemiluminescence . لا يقوم اختبار LCII بالتمييز بين الأنواع المختلفة من HPV المكونة للورم.

من الممكن أيضاً أن يتم اكتشاف HPV في خلايا مثبتة باستخدام التهجين في الموضع باستخدام مسبارات يتم ترقيمها إما بأجزاء fluorescence (التهجين باستخدام fluorescence في الموضع، FISH) أو باستخدام مركبات haptens التي يمكن أن ترتبط بمترافق إنزيمى يعمل على توليد أجزاء مترسبة ملونة غير قابلة للذوبان في الموضع. يمكن أن يوفر التهجين في الموضع معلومات قيمة

عن موضع والحالة الفيزيائية لـHPV ، ولكن الأنواع الخاصة بالكشف عن العديد من أنواع HPV في نفس العينة هي أنواع غير تجريبية.

يعبر العديد من اخصائيين الفحص عن تفضيل الاختبارات الخاصة بالنمط الظاهري في الفحص الثانوي الذي يسمح بالعدوى الانتقالية والتي تكون حميدة والتي يتم تمييزها العدوى الخاصة بنوع معين والتي لا تكون حميدة. وبالإضافة، إلى ذلك، فإن بعض أنواع HPV ، وعلى نحو محدد HPV16 ، والذي يعتبر أكثر تكويناً للورم.

وفي النهاية، فإن استخدام اختبار النمط الظاهري يوفر معلومات عن الوبائيات والتي سوف تكون ذات قيمة خاصة عند مراقبة تأثير المعلومات الخاصة باللقاح في مقابل HPV16 و HPV18.

تعتمد اختبارات النمط الظاهري لـHPV المتاحة بشكل كبير على PCR ويلي ذلك التهجين العكسي في بعض الأشكال. تستهدف خطوة PCR جينات L1 أو E1 . يتم ترقيم PCR amplicons تحت ظروف تضخيم ويتم تهجينها لكي يتم تثبيت المسبارات على النسق الدقيق، أو شريحة غشاء أو في العيون الخاصة بطبق دقيق معياري microtiter plate. يتم بعد ذلك اكتشاف amplicon المرتبط المرقم سواء أكان ذلك بشكل مباشر أو غير عن طريق التدفق الفلوري إذا تم ترقيم amplicon بأجزاء من fluorescent باستخدام مترافقات إنزيمية يتم ارتباطها بمرقم ويتم اكتشافها عن طريق استخدام تقنيات قياس اللون أو قياس التألق colorimetric or luminometric techniques. تشتمل تلك الاختبارات على معالجة amplicon PCR في معمل مفتوح يتطلب احتياطات صحية قاسية. ويرتبط ذلك مع تكلفة عالية لمثل تلك الاختبارات مما يجعل الاختبارات المتاحة في غير متناول الوصول إلى برامج فحص جماعي شائعة.

يكون اختبار الانتساخ الجيني الذي يكتشف mRNA من مكون الورم الفيروسي E6 و E7 باستخدام تضخيم معتمد على المتوالية sequence dependent amplification SDA متاحاً أيضاً.

وبالرغم من ذلك، فإن تلك الطريقة تكتشف فقط عن خمسة من ثلاثة عشر نوعاً من الأنواع المكونة للورم وذلك فقط عندما يتم التعبير عن تكوين الورم بشكل فعال.

يصف الطلب الدولي رقم ٢٠٠٧/١١٥٥٨٢-١أ بادئات PCR primers ومسبارات probes لاكتشاف أنواع HPV المتعددة عن طريق PCR في الزمن الفعلي. تشتمل تلك المجموعات على توليفة معقدة من البادئات. وفي الطريقة الخاصة بالاختراع الحالي، يكون من المطلوب فقط بادئ أمامي وأربعة بادئات عكسية. يختصر ذلك تكلفة إجراءات التحكم والصيانة. وبالإضافة إلى ذلك، فإن الجينات التي تم استهدافها في الطلب الدولي رقم ٢٠٠٧/١١٥٥٨٢-١أ تكون بمثابة تغييرات في متوالية مستهدفة. ولم يتم أخذ تلك التغييرات في الاعتبار. وبالتالي فإن النتائج السلبية الخاطئة يمكن أن تحدث في العينات الإكلينيكية clinical samples التي تشتمل على الصور المختلفة من متوالية HPV بخلاف متواليات النموذج الأصلي. وطبقاً للاختراع الحالي فإن تغييرات المتوالية التي تكون في المنطقة المستهدفة لجين L1 قد تم أخذها في الاعتبار قبل أن يتم تصميم البادئ والمسبار probe وكل الأوضاع من الصور المتغيرة والتي يتم تجنبها أو وضعها في الاعتبار عن طريق تعديلات خاصة بمتواليات البادئ.

وبالإضافة إلى ذلك، وفي الطلب الدولي رقم ٢٠٠٧/١١٥٥٨٢-١أ تم توضيح أن الحساسية التي تكون أقل من ١٠٠ نسخة في أنواع HPV المستهدفة التي تم الحصول عليها.

وبالرغم من ذلك، فإن التجارب التي تم وصفها لا تشتمل على استخدام مادة حاملة لـ DNA . ويمكن أن يعطي ذلك تقديراً متفائلاً وغير حقيقي كما تم توضيحه في DNA البشري في العينات

الإكلينيكية clinical samples التي تعمل على كبت الحساسية الخاصة بـ PCR . يتم قياس الحساسية الخاصة بالطريقة طبقاً للاختراع الحالي في وجود ٥٠٠ نانو جرام من DNA البشري والذي يناظر ٧,٥ × ١٠ ٤ من الخلايا البشرية وبالتالي تحاكي بشكل دقيق ظروف العينة الإكلينيكية الغنية بالخلايا. وبالتالي، يوفر الاختراع الحالي حساسية تم تحسينها تحت ظروف حقيقية.

بالإضافة إلى ذلك، يصف الطلب الدولي رقم ٢٠٠٧/١١٥٥٨٢-١أ استخدام أنبوب منفرد يصل من نوع13-plex في اختبار PCR المتعدد. وبالرغم من ذلك، وطبقاً لحالة الفن، لم يتم توضيح جهاز قادر على إجراء هذا الاختبار. يمكن أن يتم إجراء الطريقة الخاصة بالاختراع الحالي على الأجهزة الموجودة التي يمكن الحصول عليها في الصورة المقترحة أو الصور المتغيرة أو نظائر منها.

في الطلب الدولي رقم رقم ٢٠٠٩/١١٤٧٢-١أ ، يكون الجين المستهدف الذي تم استخدامه لاختبارات PCR هو E1. وبالرغم من ذلك، يكون هذا الجين عبارة عن نقطة ساخنة خاصة بالحذف أو الإضافة أثناء تطور السرطان. تزيد احتمالية النتيجة السلبية الخاطئة وبالتالي تزيد شدة المرض. تستهدف الطريقة للاختراع الحالي جين L1 والذي يكون أقل عرضة للحذف.

وبالإضافة إلى ذلك، وفي الطلب الدولي رقم رقم ٢٠٠٩/١١٤٧٢-١أ ، تشتمل طرق اكتشاف وانتساخ HPV على تداول منتجات PCR في المعمل المفتوح. ويشتمل ذلك على المخاطر المتمثلة في الملوثات. يتم إجراء الطريقة الخاصة بالاختراع الحالي في نظام مغلق يعمل على القضاء على المخاطر وبالتالي، إزالة تلك المخاطر والتأكيد على النتائج التي يمكن الاعتماد عليها والاستغناء عن العمل الزائد المطلوب للتوثيق وتسهيل عمل PCR في المعمل المفتوح. وبالاعتماد على ما تم

ذكره أعلاه، هناك حاجة في المجال لطرق جديدة، وبادئات ومسبارات وأطقم لاكتشاف وانتساخ HPV والذي يكون عال الحساسية، وقابل لإعادة الإنتاج وأقل سعراً من الاختبارات الموجودة والتي تكون مناسبة لبرامج الفحص الكتلية.

الوصف العام للاختراع

يصف الاختراع الحالي تطور طريقة PCR الكمية في الزمن الفعلي باستخدام بادئات توافقية و مسبارات TaqMan محددة النوع -المتنوعة التي تسمح بالكشف الحساس و الكشف لمحدد و انتساخ ثلاثة عشر نوعاً من HPV مكونة للورم وهي HPV ١٦ ، ١٨، ٣١، ٣٣، ٣٥، ٣٩، ٤٥، ٥١، ٥٢، ٥٦، ٥٨، ٥٩ و ٦٦. بالإضافة إلى ذلك، ، تكشف الطريقة الخاصة بالاختراع الحالي أنواع HPV مثل HPV٦،١١، ٢٦، ٤٠، ٤٢، ٤٣، ٤٤، ٥٣، ٥٤، ٦١، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٣، ٨٢.

وبشكل أكثر تحديداً ، يتعلق الاختراع الحالي بطريقة لاكتشاف و/أو انتساخ و/أو الحساب الكمي لوجود أنواع الفيروس الحليمي البشري (HPV) في عينة بيولوجية ، يشتمل الاختبار على الخطوات التالية :

(i) تضخيم شظية حمض نووي amplification of a nucleic acid fragment من HPV في وجود polymerase DNA ، بادئ PCR أمامي مع أوليجيو نيوكليوتيد oligonucleotide من المتوالية رقم: ١ أو نظير له ، بادئ عكسي reverse primer لـ PCR مع oligonucleotide متوالية تم اختيارها من مجموعة تتكون من :

متوالية رقم : ٢، المتوالية رقم : ٣، المتوالية رقم : ٤، المتوالية رقم : ٥ أو المتوالية رقم : ٦ أو نظير منها أو مسبار probe مع متوالية oligonucleotide تم اختيارها من المجموعة التي تتكون من : المتوالية رقم : ٧، المتوالية رقم : ٨، المتوالية رقم : ٩، المتوالية رقم : ١٠، المتوالية رقم :

١١، المتوالية رقم : ١٢، المتوالية رقم : ١٣، المتوالية رقم : ١٤، المتوالية رقم : ١٥، المتوالية رقم : ١٦ ، المتوالية رقم : ١٧، المتوالية رقم : ١٨، المتوالية رقم : ١٩، المتوالية رقم : ٢٠، المتوالية رقم : ٢١، المتوالية رقم : ٢٢، المتوالية رقم : ٢٣، المتوالية رقم : ٢٥، المتوالية رقم : ٢٦، المتوالية رقم : ٢٧، المتوالية رقم : ٣٠، المتوالية رقم : ٣١، المتوالية رقم : ٣٢، المتوالية رقم : ٣٤، المتوالية رقم : ٣٥، المتوالية رقم : ٣٧، المتوالية رقم : ٣٨، المتوالية رقم : ٣٩، المتوالية رقم : ٤١، المتوالية رقم : ٤٤، المتوالية رقم : ٤٥، المتوالية رقم : ٤٦، المتوالية رقم : ٤٧، المتوالية رقم : ٤٨، المتوالية رقم : ٤٩، المتوالية رقم : ٥٠، المتوالية رقم : ٥١، المتوالية رقم : ٥٢، المتوالية رقم : ٥٥، المتوالية رقم : ٥٦، المتوالية رقم : ٥٧، المتوالية رقم : ٥٨، المتوالية رقم : ٥٩، المتوالية رقم : ٦١، المتوالية رقم : ٦٢، المتوالية رقم : ٦٣، المتوالية رقم : ٦٤، المتوالية رقم : ٦٥، المتوالية رقم : ٦٦، المتوالية رقم : ٦٨، المتوالية رقم : ٧٠، المتوالية رقم : ٧١، المتوالية رقم : ٧٢، المتوالية رقم : ٧٣، المتوالية رقم : ٧٤، المتوالية رقم : ٧٥، المتوالية رقم : ٧٧، المتوالية رقم : ٧٨، المتوالية رقم : ٧٩ و المتوالية رقم : ٨٠ أو نظير لها ، تم ترقيمها بصبغة fluorescence وجزيء مخمد quencher molecule ، و وسيلة تحكم داخلي ؛

(ii) اكتشاف التغير في التألق الفلورسنتي detection of a change of fluorescence و تحديد نوع HPV .

بالإضافة إلى ذلك، تشير الطريقة الخاصة بالاختراع الحالي إلى الكشف عن و/أو انتساخ و/أو التقدير الكمي المتزامن لوجود HPV ١٨، ٥٢، ٥٩، ٣٩، ٥١، ٥٦، ٦٦، ١٦ ، ٤٥، ٥٨، ٣١، ٣٣ و ٣٥ في عينة بيولوجية ، تشتمل الطريقة على التفاعلات المتوازية الأربعة التالية:

التفاعل ١-أ) تضخيم شظايا الحمض النووي amplification of the nucleic acid fragments

من HPV ١٨ ، ٥٢ و ٥٩ في وجود

(i) polymerase حمض نووي nucleic acid

(ii) بادئ PCR أمامي مع متوالية oligonucleotide من المتوالية رقم: ١ أو نظير لها،

(iii) بادئ عكسي PCR reverse primer مع متوالية oligonucleotide رقم : ٢ أو نظير لها،

(iv) مسبار probe مع oligonucleotide من المتوالية رقم: ٧،٨ و ٩ أو نظير له ، تم ترقيمه بحامل للفلور fluorophore و جزيء مخمد quencher molecule و

ب) اكتشاف التغير في طول موجة التألق الفلوروسنتي detection of a change of fluorescence الذي يحدد نوع HPV ١٨، ٥٢ و ٥٩ ؛

التفاعل ٢-أ) تضخيم شظايا الحمض النووي amplification of the nucleic acid fragments من HPV ٣٩،٥١،٥٦ و ٦٦ في وجود

(i) polymerase حمض نووي nucleic acid

(ii) بادئ PCR أمامي مع oligonucleotide من المتوالية رقم: ١ أو نظير له ،

(iii) بادئ عكسي PCR reverse primer مع oligonucleotide من المتوالية رقم: ٣ أو نظير له ،

(iv) مسبار probe مع oligonucleotide من المتوالية رقم: ١٠، ١١، ١٢ و ١٣ أو نظير له ، تم ترقيمه بحامل للفلور fluorophore و جزيء مخمد quencher molecule و

ب) اكتشاف التغير في طول موجة التألق الفلوروسنتي detection of a change of fluorescence منه الذي يحدد نوع HPV ٣٩، ٥١، ٥٦ و ٦٦؛

تفاعل٣-أ) تضخيم شظايا الحمض النووي amplification of the nucleic acid fragments من HPV ١٦ ،٤٥ و ٥٨ في وجود

٥ (i) حمض نووي nucleic acid polymerase

(ii) بادئ PCR أمامي مع oligonucleotide من المتوالية رقم: ١ أو نظير له ،

(iii) بادئ عكسي PCR reverse primer مع oligonucleotide من المتوالية رقم: ٤ أو نظير له ،

(iv) مسبار probe مع oligonucleotide من المتوالية رقم: ١٤، ١٥ و ١٦ أو نظير له ، تم ١٠ ترقيمه بحامل للفلور fluorophore و جزيء مخمد quencher molecule و

ب) اكتشاف التغير في طول موجة التألق الفلوروسنتي detection of a change of fluorescence منه الذي يحدد نوع HPV ١٦ ، ٤٥ و ٥٨؛

التفاعل ٤-أ) تضخيم شظايا الحمض النووي من HPV ٣١ ، ٣٣،٣٥ و وسيلة تحكم داخلية في وجود :

١٥ (i) حمض نووي nucleic acid polymerase

(ii) بادئ PCR أمامي مع oligonucleotide من المتوالية رقم: ١ أو نظير له ،

(iii) بادئ عكسي reverse primer PCR مع oligonucleotide من المتوالية رقم: ٥ أو نظير له ،

(iv) مسبار probe مع oligonucleotide من المتوالية رقم: ١٧، ١٨، ١٩ و ٢٠ أو نظير له، تم ترقيمه بحامل للفلور fluorophore وجزيء مخمد quencher molecule و

(v) وسيلة تحكم داخلي و

(ب) اكتشاف التغير في طول موجة التألق الفلوروسنتي detection of a change of fluorescence منه الذي يحدد نوع HPV ٣١، ٣٣، ٣٥ ووسيلة تحكم داخلية .

يشير الاختراع الحالي أيضاً إلى بادئ لتضخيم HPV تم اختياره من مجموعة تتكون من : المتوالية رقم : ١، المتوالية رقم :٢، المتوالية رقم : ٣، المتوالية رقم : ٤، المتوالية رقم : ٥ و المتوالية رقم : ٦.

بالإضافة إلى ذلك، ، يشير الاختراع إلى مسبار probe للكشف عن HPV و/أو انتساخ و/أو التقدير الكمي، تم اختيار المسبار من مجموعة تتكون من :

متوالية رقم : ٧، المتوالية رقم : ٨، المتوالية رقم : ٩، المتوالية رقم : ١٠، المتوالية رقم : ١١، المتوالية رقم : ١٢، المتوالية رقم : ١٣، المتوالية رقم : ١٤، المتوالية رقم : ١٥، المتوالية رقم : ١٦ ، المتوالية رقم : ١٧، المتوالية رقم : ١٨، المتوالية رقم : ١٩، المتوالية رقم : ٢٠، المتوالية رقم : ٢١، المتوالية رقم : ٢٢، المتوالية رقم : ٢٣، المتوالية رقم : ٢٥، المتوالية رقم : ٢٦، المتوالية رقم : ٢٧، المتوالية رقم : ٣٠، المتوالية رقم : ٣١، المتوالية رقم : ٣٢، المتوالية رقم : ٣٤، المتوالية رقم : ٣٥، المتوالية رقم : ٣٧، المتوالية رقم : ٣٨، المتوالية رقم : ٣٩، المتوالية رقم

: ٤١، المتوالية رقم : ٤٤، المتوالية رقم : ٤٥، المتوالية رقم : ٤٦، المتوالية رقم : ٤٧، المتوالية رقم : ٤٨، المتوالية رقم : ٤٩، المتوالية رقم : ٥٠، المتوالية رقم : ٥١، المتوالية رقم : ٥٢، المتوالية رقم : ٥٥، المتوالية رقم : ٥٦، المتوالية رقم : ٥٧، المتوالية رقم : ٥٨، المتوالية رقم : ٥٩، المتوالية رقم : ٦١، المتوالية رقم : ٦٢، المتوالية رقم : ٦٣، المتوالية رقم : ٦٤، المتوالية رقم : ٦٥، المتوالية رقم : ٦٦، المتوالية رقم : ٦٨، المتوالية رقم : ٧٠، المتوالية رقم : ٧١، المتوالية رقم : ٧٢، المتوالية رقم : ٧٣، المتوالية رقم : ٧٤، المتوالية رقم : ٧٥، المتوالية رقم : ٧٧، المتوالية رقم : ٧٨، المتوالية رقم : ٧٩ ومتوالية رقم : ٨٠ أو نظير لها .

يشير الاختراع الحالي أيضاً إلى طقم تشخيص لاكتشاف و/أو انتساخ و/أو الحساب الكمي لـ HPV في عينة بيولوجية ، تشتمل على بادئات أمامية وعكسية ، مسبارات خاصة بـ HPV ١١، ١٦ ، ١٨، ٢٦، ٣١، ٣٣، ٣٥، ٣٩، ٤٠، ٤٢، ٤٣، ٤٤، ٤٥، ٥١، ٥٢، ٥٣، ٥٤، ٥٦، ٥٩، ٥٩، ٦١، ٦٦، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٣ و ٨٢، وسيلة تحكم موجبة داخلية و polymerase DNA.

<u>شرح مختصر للرسومات</u>

سيتم الان شرح الرسومات والجداول :

الأشكال ١-١٣: توضح تحليلاً للعينات و منحنيات التضخيم الخاصة بنوع PCR التوافقي المتعدد المزدوج في الوقت الفعلي الخاص بالكشف المحدد عن أنواع HPV ١٦ ، ١٨، ٣١، ٣٣، ٣٥، ٣٩، ٤٥، ٥١، ٥٢، ٥٦، ٥٨، ٥٩ و ٦٦ حيث :

الشكل رقم ١ : يوضح تضخيم amplification لـ HPV ١٨ في مجموعة تضخيم متزامن ١.

الشكل رقم ٢ : يوضح تضخيم لـ HPV ٥٢ في مجموعة تضخيم متزامن ١.

الشكل رقم ٣ : يوضح تضخيم لـ HPV ٥٩ في مجموعة تضخيم متزامن ١.

الشكل رقم ٤ : يوضح تضخيم لـ HPV ٣٩ في مجموعة تضخيم متزامن ٢.

الشكل رقم ٥ : يوضح تضخيم لـ HPV ٥١ في مجموعة تضخيم متزامن ٢.

الشكل رقم ٦ : يوضح تضخيم لـ HPV ٥٦ في مجموعة تضخيم متزامن ٢.

الشكل رقم ٧ : يوضح تضخيم لـ HPV ٦٦ في مجموعة تضخيم متزامن ٢.

الشكل رقم ٨ : يوضح تضخيم لـ HPV ١٦ في مجموعة تضخيم متزامن ٣.

الشكل رقم ٩ : يوضح تضخيم لـ HPV ٤٥ في مجموعة تضخيم متزامن ٣.

الشكل رقم ١٠ : يوضح تضخيم لـ HPV ٥٨ في مجموعة تضخيم متزامن ٣.

الشكل رقم ١١ : يوضح تضخيم لـ HPV ٣١ في مجموعة تضخيم متزامن ٤.

الشكل رقم ١٢ : يوضح تضخيم لـ HPV ٣٣ في مجموعة تضخيم متزامن ٤

الشكل رقم ١٣ : يوضح تضخيم لـ HPV ٣٥ في مجموعة تضخيم متزامن ٤.

الشكل رقم ١٤ : يوضح منحنيات التضخيم الخاصة بوسيلة تحكم داخلية .

الأشكال أرقام ١٥-٢٢ : توضح مجموعات تضخيم وتخفيف من HPV ١٦، HPV ١٨، HPV

٣١، HPV ٣٣، HPV ٣٥ و HPV ٥٦ مع بادئات من PTf و ٢PTr.

الجدول رقم ١ : يشير إلى قائمة من المسارات التي تم توضيحها .

الجدول رقم ٢ : يشير إلى قائمة من المسبارات التي تم توضيحها .

الجدول رقم ٣ : يشير إلى تركيبة PCR المتعدد من مجموعة تضخيم متزامن ١، مجموعة تضخيم متزامن ٢، مجموعة تضخيم متزامن ٣ و مجموعة تضخيم متزامن ٤.

الجدول رقم ٤ : يشير إلى طريقة تقييم توافقية في الزمن الفعلي على عينات إكلينيكية .

الجدول رقم ٥ : يشير إلى مجموعة HPV ١، لصيغة خلط أساسية .

الجدول رقم ٦ : يشير إلى مجموعة HPV ٢، لصيغة خلط أساسية .

الجدول رقم ٧ : يشير إلى مجموعة HPV ٣، لصيغة خلط أساسية .

الجدول رقم ٨ : يشير إلى مجموعة HPV ٤، لصيغة خلط أساسية

الجدول رقم ٩ : يشير إلى الحساسية التحليلية لأنواع HPV المستهدفة .

الوصف التفصيلي

تقوم طريقة PCR في الزمن الفعلي الكمية الخاصة بالاختراع الحالي بكشف كل أنواع HPV المكونة للورم المخاطية التي تم التعرف عليها أقل من مستويات تصل إلى GU٤٠٠ لكل عينة أو أقل. تكون الطريقة شبه كمية بشك أساسي حيث تتم قراءة النتائج في شكل قيم C_T والتي تكون نسبية بالنسبة للتركيز الأولي من DNA المستهدف. من الممكن أيضاً أن يتم عمل تفاعلات في

نمط كمي كامل عن طريق تضمين مجموعات تخفف خاصة بالنوع (الأنواع) المستهدفة لكي يتم إجراء منحنيات قياسية مستهدفة.

يكون للطبيعة الكمية للطريقة العديد من المزايا. في الدراسات المختصة بالوبائيات من الممكن أن يتم تصميم قيمة مقطعية ثابتة لكل الأنواع، وبالتالي، القضاء على تقديرات التكافؤ المنحازة التي تنتج من اختلاف معين في النوع في الحساسية التحليلية. تم أيضاً اقتراح أنواع عالية العدوى من HPV والتي تكون أكثر من ٥٠٠٠٠ GU لكل عينة والتي تكون مهمة من الناحية الإكلينيكية على الرغم من عدم حسم تلك النقطة. في الطريقة المتعددة التوافقية، من الممكن أن يتم ضبط الجزء المقطوع عند أي قيمة كمية مطلوبة. وفي النهاية، يمكن أن يكون استخدام الطريقة الكمية في تتبع لنمو العدوى والتأثيرات الخاصة بالمعالجة التالية.

تكون الحساسية التحليلية للطريقة من ٤-٤٠٠ GU لكل الأنواع الموجودة في ٥٠٠ نانو جرام من DNA البشري، والذي يكون مناظراً لـ ٠,٧٥ × ١٠ ^{٥} خلية. وبالتالي فإن وجود فيروس منفرد في ٠,٥ % من الخلايا يمكن أن يعطي نتائج إيجابية. وعند تركيزات DNA البشرية المنخفضة المناظرة لـ٠,٧٥ × ١٠ ^{٤} خلية، تقوم الحساسية على تحسين العامل الخاص بـ ١٠. ويعني ذلك الوصول إلى نتائج إيجابية خاطئة نتيجة لوجود عينات خلايا فقيرة والتي يمكن أن تمثل مشكلة. وعلى الرغم من ذلك، فمن الممكن أن يتطلب إجراء الاختبار في نمط كمي كامل وجود معايير خالة بتركيز DNA الخلوي. وبالمقارنة باختبار الإمساك المهجن hybrid capture (HCII) ، وبالتالي تم اكتشاف أن HPV في عينات إكلينيكية أكثر كما هو متوقع في الحساسية الخاصة بالاكتشاف والطريقة المتعددة التوافقية طبقاً للاختراع الحالي والتي تكون على الأقل في ترتيب أهمية أعلى.

وبالتالي تغطي الطريقة طبقاً للاختراع كل أنواع HPV المولدة للورم في أحد الأمثلة. وفي الطريقة

التي تم تصميمها بشكل خاص لإعطاء أربعة أشكال من الأنبوب. يعطي ذلك استخدامات مفضلة خاصة بـ ١٨ × ١٢ (٩٦ عيناً) و ١٦ × ٢٤ (٣٤٨ عيناً) من الأشكال التي تكون قياسية في العديد من أجهزة PCR في الزمن الفعلي. وبالرغم من ذلك، من الوضاح أن الطريقة طبقاً للاختراع يمكن أن يتم استخدامها في شكل مختلف بدون الخروج من مجال الاختراع الحالي.

بالإضافة إلى ذلك، وفي الطريقة الخاصة بالاختراع الحالي، فإن بادئ أمامي واحد على الأقل وأربعة بادئات عكسية تكون مطلوبة. ويعمل ذلك على تبسيط جودة التحكم وتقليل تكلفة التصنيع.

وطبقاً لمتغيرات المتوالية المعروفة في الاختراع الحالي، تم الأخذ في الاعتبار المنطقة المستهدفة لجين L1 قبل تصميم البادئ والمسبار probe وكل مواضع التغييرات والتي يتم تجنبها أو حسابها فيما يتعلق بالتعديلات الخاصة بمتواليات المسبار.

تم قياس حساسية الطريقة طبقاً للاختراع في وجود ٥٠٠ نانو جرام من DNA البشري والذي يناظر ٧,٥ ٠ ١٠ ٤ من الخلايا البشرية وبالتاي تحاكي بشكل جيد الظروف في العينة الإكلينيكية الغنية بالخلية. يوفر ذلك حساسية تم تحسينها فيما يتعلق بكل المستهدفات من أنواع HPV. تستهدف الطريقة الخاصة بالاختراع الحالي جين L1 والذي يكون أكثر عرضة للحذف.

يمكن استخدام البادئات الخاصة بالاختراع الحالي مع تعديلات إضافية لكي يتم الكشف عن الأنواع المرتبطة بـ HPV مثل ، من بين أنواع أخرى، HPV ١١، ٢٦، ٤٠، ٤٢، ٤٣، ٤٤، ٥٣، ٥٤، ٦١، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٣، ٨٢.

في جهاز PCR في الزمن الفعلي المستخدم في الطريقة طبقاً للاختراع الحالي هناك اثنين من

القنوات اللونية الفارغة التي تسمح بإمكانية إضافة أنواع HPV المكونة للجين الخاص بالاختبار.

تكون المجموعة المتعددة التي تم وصفها في طلب الاختراع الحالي عبارة عن واحدة من عدد من المجموعات المحتملة. على سبيل المثال، فإن البادئات التي يتم استخدامها في المجموعة ٣ تكون معروفة بأنها قادرة على تضخيم أنواع HPV وهي أنواع HPV ١٨، ٣١، ٣٣، ٣٩، ٥١، ٥٨، ٥٩ و ٦٦ ووسيلة تحكم داخلية HPV ٦ وبالتالي فإن أي من تلك الأنواع يمكن أم يتم تحديدها بتلك المجموعة.

في الاختراع الحالي، يتم استخدام جهاز PCR في الزمن الفعلي بحيث يشتمل على أربعة قنوات لونية.

وبالرغم من ذلك، فإن أجهزة PCR في الزمن الفعلي يكون لها خمس أو ست أو سبع أو أكثر من القنوات اللونية والتي تكون متغيرات بديلة للقنوات اللونية الخاصة بالاختراع الحالي المحتملة. يمكن أن يتم بعد ذلك دمج البادئات والمسبارات في ثلاثة أو اثنين من التفاعلات. يمكن أن يتم بعد ذلك دمج البادئات والمسبارات في ثلاثة أو أثنين من التفاعلات الخاصة بالكشف عن أنواع HPV مشابهة.

في الاختبار الحالي، يمكن أن يتم تحليل شكل ٢٠ عينة في يوم العمل، وبالتالي جعل الاختبار مناسباً أكثر للمعامل ذات الإمكانات المنخفضة إلى المتوسطة.

يمكن تعديل الدفعات الأكبر من العينات باستخدام شكل به ٣٨٤ عينا من جهاز PCR في الزمن الفعلي، بالرغم من القدرة المتاحة من أجهزة استخلاص DNA والتي تكون أكثر أهمية في تحديد زمن تحليل PCR.

يكون PCR في الزمن الفعلي عبارة عن اختبار نظام مقفل. وبالتالي من غير الضروري أن تتم معالجة العينات في المعمل المفتوح. وبالتالي يتم تقليل المشكلات الخاصة بتنفيذ PCR بشكل كبير ويقلل ذلك بدوره من المصادر التي تم تكريسها للتحكم في الملوثات الكبيرة المرتبطة بتحليل PCR القبلي المفتوح.

تكون الطريقة الخاصة بالاختراع الحالي من بين أشياء أخرى لها قيمة في برامج الفحص حيث يكون من المفضلة الانتساخ الجيني لـ HPV.

تم وصف النماذج المفضلة من الاختراع الحالي. وبالرغم من ذلك، سوف يكون من المفهوم أن الاختراع ليس مقتصراً على نماذج معينة وأن تغييرات متعددة يمكن أن يتم إجراؤها فيه من خلال ذوي المهارة في المجال بدون الخروج من مجال وفحوى الاختراع كما تم وصف ذلك في عناصر الحماية التالية. توضح الأمثلة التالية الاختراع ولكنها لا تحدده.

الأمثلة

المثال رقم ١: plasmids

تم نقل المنطقة المستهدفة التي تشتمل على الplasmid ات من جينات L1 من HPV ٦، ١٦ ، ١٨، ٣١، ٣٣، ٣٥، ٣٩، ٤٥، ٥١، ٥٢، ٥٦، ٥٨، ٥٩ و ٦٦ إلى *Escherichia coli* DH5 –ألفا وتم عزلها عن طريق الطرد المركزي المتدرج لكثافة caesium chloride (Fritsch et al) أو لطقم Qiagen HiSpeed Midi Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). وقد تم تحديد تركيز DNA عن طريق القياس الضوئي الطيفي بالأشعة فوق البنفسجية.

المثال رقم ٢: العينات الإكلينيكية clinical samples

كانت العينات الإكلينيكية عبارة عن عينات دموية تم إرسالها إلى معملنا للتحليل الروتيني لـHPV وذلك فيما يتعلق بالفحص الثانوي لخلل التنسج منخفض الدرجة (LSIL) أو الخلايا المشابهة (ASCUS ، أو العينة غير الملائمة). تم تجميع العينات وتن نقلها في ناقل تحضيري رفيع من نوع CYTYC (وسط CYTYC ، Crawley, UK) وذلك طبقاً لتوصيات المُصنع. تم الطرد المركزي لـ ١٠ مل من العينة عند ٣٠٠٠ لفة في الدقيقة لمدة ١٠ دقائق وتمت إعادة تعليق الحبيبات بعد ذلك في ١٠٠ ميكرو لتر من محلول ملحي منظم من الفوسفات phosphate buffered قبل أن يتم استخلاص DNA باستخدام جهاز استخلاص DNA ذاتي باستخدام طقم استخلاص MagNAPure LC DNA (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). تم تخفيف DNA في ١٠٠ ميكرو لتر.

تم استخدام عينات إكلينيكية تم اختبارها سابقاً مع اختبار HCII باستخدام PCR التوافقي وكتلة الخط العكسي reverse line لكي يتم تقييم الاختبار.

الشكل رقم ٣- اختبار الإمساك بالجزء المهجن

تم إجراء اختبار الإمساك بالجزء المهجن الصحي (Digene, Gaithersburg, MD) باستخدام عينة بها ٢٥ مل من العينة طبقاً لتعليمات المصنع.

المثال رقم ٤: تصميم البادئ:

لكي يتم تحديد المستهدفات المناسبة لبادئات PCR التوافقية، تمت محاذاة متواليات جينات L1 من أنواع HPV ١٦ ، ١٨، ٣١، ٣٣، ٣٥، ٣٩، ٤٥، ٥١، ٥٢، ٥٦، ٥٨، ٥٩ و ٦٦، بالإضافة إلى HPV6 باستخدام CLUSTALW. ولكي يتم توليد متواليات إدخال منفصلة لكل محاذاة من CLUSTAL ، يتم استخدام متوالية النوع الحال للبروتين من نوع HPV في بحث BLAST بالإضافة إلى تحديد متواليات الصورة المتغيرة غير النموذجية. تم بعد ذلك استخدام المتوالية عند

مواضع متغيرة عن طريق استبدال شفرة الغموض الخاصة بـIUPAC المناسب. تم تحديد المناطق المناظرة لـ nt 6348 -٦٣٧٤ على genome HPV16 بأنها مناطق محافظة بشكل كبير وتم اختيارها لوضع بادئات عكسية أمامية وعكسية على الترتيب. يمكن أن يؤدي ذلك إلى بناء بادئات PTf و PTr. وحيث أن زوج البادئ المذكور لم يتم تضخيمه فإن كل أنواع المستهدفات لا تفي بالغرض، أو الظاهرة التي لا يتم عزوها غلى الاستقرار المنخفض للمجموعات التضخيم متزامن مع PTr أو النسخ الأقل تحللاً من PTr التي تم التوصل إليها.

تم وضع المتواليات في مجموعات بداخل مجموعات متجانسة على أساس المسافة الخاصة بالمتواليات المستهدفة من البادئ الأمامي والخلفي والتي تم عملها في :

.CLUSTALW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)

وكانت تلك المجموعات عبارة عن HPV18، HPV52، HPV59 (المجموعة ١) ،HPV39 ، HPV56،HPV51 وHPV66 (المجموعة ٢) ،HPV16، HPV45، HPV58 (المجموعة ٣) و HPV33،HPV31 وHPV35 بالإضافة إلى وسيلة تحكم داخلية HPV6 (المجموعة ٤). ولكل مجموعة، يتم عمل محاذاة جديدة CLUSTAL وتم تحديد البادئات العكسية الخاصة بالمجموعات لكي يتم تقليل تحلل البادئ وتحسين الحساسية. تم الوصول إلى المواضع المنوعة عن طريق استخدام التأين أو قاعدة البطاقة التي لم تتم معالجتها أو باستخدام ثيامين في شكل pyrimidine شامل أو guanine في شكل purine شامل (باستخدام الاستقرار الخاص بزوج القاعدة غير المخروطي G:T) أو دمج nucleotides مختلطة.

يمكن أن يؤدي ذلك إلى تصميم بادئات PTrGr1 وPTrGr2 وPTrGr4 .وتم الاحتفاظ بمتوالية PTr الأساسية في المجموعة ٣.

تم فحص منطقة مستهدفة بديلة مناظرة للمواضع ٦٤٤-٦٦٢٠ على HPV16 لكي يتم وضع البادئ العكسي.

تم تصميم البادئ PTr2 لكي يتم استهداف المنطقة المذكورة. تكون PTr2 مناسباً لتضخيم أنواع تضخيم أنواع HPV ١٦ ، ١٨، ٣١، ٣٣، ٣٥، ٤٥، ٥٢، ٥٦، ٥٨، ٥٨ و ٥٩.

٥ الجدول رقم ١: قائمة المتواليات

البادئ	المتوالية	المتوالية رقم
PTf	5-TG(CT)AAA TAT CC(AT) GAT TAT (AT)TI IAA ATG-3	١
PTrGr1b	5-TGT AGC CAG TAT GG(CT) TTA TTG AA-3	٢
PTrGr2	5-TG(GT) AGC CAA TAA GGT TTA TTA AA-3	٣
PTr957	5- TGI AIC CAA TAI GG(CT) TTA TTG AA -3	٤
PTrGr4	5- TGT AIC CAA TAT GGt TTA TTA AA-3	٥
PTr2	5- C(GT)G T(AG)G TAT CIC CAI CAA GTA ACA AA-3	٦

المثال رقم ٥: تصميم المسبار probe :

تم تصميم مسبارات TaqMan MGB باستخدام برنامج بادئ يعبر عن البادئ (Applied Biosystems, Foster City, CA) باستخدام amplicon مستهدف كتوالية إدخال وتحديدها بأنها ١٠ طول amplicon الذي يكون أكبر من أو يساو ٢٠٠ زوج قاعدة.تم ضبط البرنامج لكي يتم الوصول إلى بادئات عند درجة حرارة تصل إلى ٦٠° م ومسبارات عند ١٠° م أو أعلى (٧٠° م). حيث يكون من الضروري، لكي يتم التعويض عن عدم قدرة البرنامج أن توجد المسبارات بدون بواديء

تحديد الموضع بشكل متزامن، وقد تم وضع المتوالية بين أقواس خاصة بمتواليات البادئ الوهمية. تم توفير مسبارات TaqMan MGB عن طريق Applied Biosystems وتم ترقيمها باستخدام FAM أو VIC أو NED والذي تم إعادة ترقيمه فيما يتعلق بقنوات اللون القياسية الثلاثة من مجموعات AB Prism 7000 في أجهزة PCR في الزمن الفعلي. تم تضمين مسبارات MGB في الرابطة المحززة الفرعية والتي تعمل على رفع درجة حرارة المسبار probe وبالتالي السماح باستخدام مسبارات أقصر، المسبارات المظلمة (وسيلة إخماد غير فلورية non-fluorescent quencher). تكون القناة الرابعة التي يتم استخدامها بشكل عادي كمرجع سلبي متاحة على مجموعات أجهزة ABI 7000. تستخدم تلك القناة بشكل مثالي صبغة ROX. لات تكون مسبارات MGB التي تم ترقيمها بـ ROX قابلة للحصول عليها. ولكي يتم تحقيق Tm ، فغن اثنين من الطرق تم استخدامها. في الطريقة الأولى تم تصميم المسبارات في شكل مسبارات TaqMan MGB ، وتم تحديدها بعد ذلك بأنها مسبارات LNA على أساس اقتراحات خاصة بالموزعين (Sigma Genosys) أو استخدام موقع الويب http://lna-tm.com/. تقوم مسبارات LNA بتضمين deoxyribose في المادة الأساسية من فوسفات السكر التي تعمل على استقرار البنية الحلزونية وزيادة Tm. وعلى نحو بديل، تم استخدام التعبير عن البادئ بشكل بديل لكي يتم تصميم مسبارات TaqMan تقليدية باستخدام مجموعة نطية من البرنامج خاصة بهذا الغرض ومسبارات أقل من ٢٢ زوج قاعدة تم تقييمها أيضاً.

تم تصميم كل المسبارات باستخدام درجة حرارة ٧٠ ± ٢°م. كانت المسبارات التي تم ترقيمها بـ ROX عبارة عن طرف ٥' مرقم بالفلوروفور وتم إخماده مع BHQ2 عند طرف ٣ '

تمت مقارنة المسبارات المرشحة باستخدام محاذايات متوالية متعددة لـ CLUSTALW من منطقة amplicon من الأنواع الثلاثة عشر المستهدفة من HPV و HPV6 مع مواضع متغيرة تم تعليمها. تم اختيار متواليات المسبار probe المستهدفة من بين أنواع أخرى للاختبار الإضافي.

المثال رقم ٦: برنامج 6- PCR

تم إجراء كل التفاعلات الخاصة بـ PCR على جهاز تحليل جيني من نوع ABI Prism 7000 أو ٧٣٠٠ (Applied Biosystems, Foster City, CA) باستخدام الدالة المرجعية السالبة ROX والتي تم عدم تنشيطها لكي يتم السماح لقناة لون ROX أن تتغير لأغراض الاكتشاف. وفيما يتعلق بكل التجارب الخاصة ببرنامج PCR كان درجة الحرارة ٩٥° م لمدة ١٢ دقيقة ويلي ذلك ٤٥ دورة من ٩٥° م ، ١٥ ثانية؛ ٤٥، ٣٠ ثانية، ٦٠° م، ٦٠ ثانية. وبالنسبة للتجارب التي تستخدم SYBR تم إجراء التحليل الخاص بالانفصال عند نهاية البرنامج. كان حجم التفاعل هو ٥٠ ميكرو لتر من عينة DNA المستخدمة في كل التفاعلات. تم استخدام الخلطة الرئيسية الخاصة بـPCR طبقاً لتعليمات المُصنع.

المثال رقم ٧: اختبار البادئات Testing of primers

تم استخدام بادئات primers عند تركيزات تصل إلى ٦٠٠ نانو مولار. تم اختبار الحساسية التحليلية فيما يتعلق بأنواع HPV المستهدفة عن طريق التضخيم عند ١٠ أضعاف من مجموعات التخفيف الخاصة plasmid DNA في ١٠٠ نانو جرام/ميكرو لتر من DNA البشري (Sigma Aldrich, St Louis, MI). تم اكتشاف DNA الذي تم تضخيمه باستخدام SYBR الأخضر باستخدام Finnzymes DyNAmo SYBR الأخضر من طقم green qPCR F400 (Finnzymes, Espoo, Finland) باستخدام برنامج PCR الذي تمت زراعته باستخدام تحليل منفصل. تم تحديد الحساسية التحليلية كتركيز مستهدف منخفض الذي يعطي قمة انفصال خاصة بالنوع غير الملتبس. يكون المبدأ الخاص بالبادئ المقبول عند هذه المرحلة الخاصة بالتحليل هو حساسية تحليلية تصل إلى ٤٠٠٠ GU أو أفضل فيما يتعلق بكل الأنواع المستهدفة لـHPV.

المثال رقم ٨: تقييم مسبار probe والمعايرة

تم أولاً استخدام المسبارات عند تركيزات تصل إلى ٢٠٠ نانو مولار. تم إجراء الاختبار الخاص بالمسبارات عن طريق اختبار TaqMan PCR باستخدام طقم Finnzymes DyNAmo probe PCR F450 (Finnzymes, Espoo, Finland) أو في التجارب التالية، تستخدم PerfeCta qPCR FastMix و UNG Quanta Mastermix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD) ١٠ أضعاف من التحليل التسلسلي من النوع المستهدف HPV في ١٠٠ نانو جرام/ ميكرو لتر من DNA والبادئات القريبة. كانت إشارة التضخيم الإيجابي من ٤٠٠ GU من المستهدف DNA هو المبدأ الأقل فيما يتعلق بالمصادقة على اختبار المسبار مرة أخري. وعندما يتم استخدام تركيزات عالية في التفاعلات المتعددة، تنحو المسبارات أن تتداخل مع بعضها البعض. وبالتالي، فإن معايير المسبار يمكن إجراؤها لكي يتم تحديد تركيزات المسبار عند أقل حد لها التي يمكن استخدامها بدون فقد في الحساسية. تم اختبار تركيزات المسبار ٢٠٠، ١٥٠، ١٠٠ و٥٠ نانو مولار في مقابل ٤٠٠٠ و٤٠٠ و٤٠ و٤GU من النوع المستهدف. تم استخدام أقل تركيز من المسبار probe الذي يمكن استخدامه بدون فقد في الحساسية التحليلية في التفاعلات التضخيم متزامن.

المثال رقم ٩ : اختبار المسبارات في المجموعة المتعددة

وفيما يتعلق بالاختبار المتعدد، تم دمج المسبارات عند تركيزات مختارة مع بعضها ومع بادئات قريبة وتم اختبارها في مقابل مجموعات تخفيف من ثلاثة إلى أربعة أنواع من HPV في تفاعلات PCR. كانت المبادئ الخاصة بقبول توليفة من مجموعة متعددة هي الحساسية لـ ٤٠٠ GU أو أفضل وبتفاعل غير متشابك مع أنواع أخرى في المجموعة. حيث يتم اكتشاف الفقد غير المقبول للحساسية التحليلية أو التفاعل التبادلي في مجموعة متعددة،تم تكرار التفاعلات باستخدام مسبارات

في كل التوليفات لكي يتم تحديد المسبار probe الخاص بالتداخل. تم اختبار المجموعات الناجحة في مقابل ٤,١٠ GU^{4} من كل الأربعة عشر نوعاً من HPV في الاختبار لكي يتم اكتشاف التفاعل التبادلي. وعندما تتم ملاحظة التفاعل التبادلي، يتم اختبار مسبار التفاعل التبادلي في مقابل التفاعل التبادلي لنوع (أنواع) HPV في التفاعل لكي يتم تحديد ما إذا كان التفاعل التبادلي نتيجة تفاعل مباشر بين المسبار والتفاعل التبادلي لنوع HPV أو نتيجة التأثيرات الثانوية المسببة عن طريق المجموعة المتعددة. حيث تمت إعادة رفض المسبارات لكي يتم التدخل أو التفاعل التبادلي، وتم تصميم اثنين من المسبارات وتم اختبارها كما تم وصف ذلك أعلاه.

تم اختبار المسبارات التي تم اختبارها كما هو موضح في الجدول رقم ٢.

الجدول رقم ٢. قائمة المسبارات

Grp	HPV	المتوالية	متوالية رقم	المرقم	النوع	المستهدف
١	PTp18(7)	ATA CAC ACA GCT GCC AGG T	٢١	FAM	TaqMan MGB	HPV18
١	PTp18(8)	CTTCACCTGGCAGCT G	٢٢	FAM	TaqMan MGB	HPV18
١	PTp18(130)	CACTGTGCCTCAATC	٢٣	FAM	TaqMan MGB	HPV18
١	PTp18(131)	ACTGTGCCTCAATCC	٧	FAM	TaqMan MGB	HPV18
١	PTp18(177)	ACCTGGCAGCTGTGT	٢٥	FAM	TaqMan MGB	HPV18
١	PTp 52	TCT AAC TCT GGC AAT A	٢٦	ROX/BHQ2	TaqMan MGB	HPV52
١	PTp52(4)	tc+Taa+Ctc+Tggc+Aa+Tac+Tgc	٨	ROX/BHQ2	LNA	HPV52
١	PTp 59(1)	TAC TGA CAT ACG TGC C	٩	NED	TaqMan MGB	HPV59
١	PTp59(77q)	AGGCGAGAACAGGTT TTTGCCAGACA	٢٩	NED	TaqMan MGB	HPV59

HPV59	TaqMan MGB	NED	٣٠	ATCAACTTCCTGAATC ACT	PTp59(132)	١
HPV59	TaqMan MGB	NED	٣١	AAGGTACTGACATAC GTGCC	PTp59(159)	١
HPV39	TaqMan MGB	ROX/B HQ2	٣٢	CAC AGA TAT ACG TGC AAA	PTp 39(1)	٢
HPV39	LNA	ROX/B HQ2	١٠	ca+Ca+Gatat+Acg+Tg+C aa+Acc	PTp39(4)	٢
HPV39	LNA	ROX/B HQ2	٣٤	caca+Gatat+Acg+Tg+Caa +Acc	PTp39(5)	٢
HPV51	TaqMan MGB	FAM	٣٥	AGT GGT AAT GGC CGT G	PTp 51	٢
HPV51	TaqMan MGB	FAM	١١	AGTGGTAATGGCCGT GAC	PTp51(156)	٢
HPV51	TaqMan MGB	FAM	٣٧	TGGTAATGGCCGTGA CC	PTp51(158)	٢
HPV51	TaqMan MGB	FAM	٣٨	CGTGACCCTATAGAA AG	PTp51(168)	٢
HPV56	TaqMan MGB	VIC	٣٩	TAG CAA TGG TAG AGA AC	PTp 56	٢
HPV56	TaqMan MGB	VIC	١٢	CAATACCTGCAGAGT TATA	PTp56(2)	٢
HPV56	TaqMan MGB	VIC	٤١	ATATTTAAAGGGTAG CAATGGT	PTp56(3)	٢
HPV66	TaqMan MGB	NED	١٣	TTG GAA GGG TGG CAA T	PTp 66(1)	٢
HPV16	TaqMan MGB	FAM	١٤	ATT TGC AGT AGA CCC AGA G	PTp 16(6)	٣
HPV16	TaqMan MGB	FAM	٤٤	CTGTTGGTGAAAATG TACC	PTp16(94)	٣
HPV16	TaqMan MGB	FAM	٤٥	TGAAAATGTACCAGA CGATT	PTp16(101)	٣
HPV16	TaqMan MGB	FAM	٤٦	AGCCAGTTCAAATTA T	PTp16(155s)	٣
HPV33	TaqMan MGB	VIC	٤٧	TCT ATT CAA AGC AGT GC	PTp 33	٤/٣

HPV33	LNA	ROX/BHQ2	٤٨	ctac+Tgc+Ctc+Ta+Tt+Ca+Aag+Cag	PTp33(2)	٤/٣
HPV33	TaqMan MGB	NED, VIC	٤٩	TGCCTCTATTCAAAGCAGTGC	PTp33(8)	٤/٣
HPV33	TaqMan	VIC	٥٠	GGAACTACTGCCTCTATTCAAAGCAGTGCTGC	PTp33(10)	٤/٣
HPV33	TaqMan	ROX	٥١	AGAGGCTGTTCCCGATGACCTG	PTp33(141)	٤/ ٣
HPV33	TaqMan	ROX	٥٢	TTCCCGATGACCTGTACATTAAAGGT	PTp33(149)	٤/٣
HPV33	LNA	ROX/BHQ2	١٩	tg+Cctctatt+Caaag+Cagtgc	PTp33(9)	٤/٣
HPV58	TaqMan MGB	NED	١٦	TCC GGT AAT ACT GCA G	PTp 58	٣
HPV58	TaqMan MGB	NED	٥٥	CCAGTGAACCTTATGGG	PTp58(36)	٣
HPV58	TaqMan MGB	NED	٥٦	AAAACTTGGCGAGGCTG	PTp58(118m)	٣
HPV58	TaqMan MGB	NED	٥٧	AAGGGTCCGGTAATAC	PTp58(156)	٣
HPV58	TaqMan MGB	NED	٥٨	ACTGCAGTTATCCAAAGTA	PTp58(170)	٣
HPV45	TaqMan MGB	VIC	٥٩	ATA CAC ACA ACT GCC A	PTp 45(3)	١/٣
HPV45	TaqMan MGB	VIC	١٥	GTGAAACCCCTGGCAGT	PTp45(6)	١/٣
HPV45	LNA	ROX/BHQ2	٦١	aa+Tac+Aca+Caa+Ctg+Ccagg	PTP45(4)	١/٣
HPV45	LNA	ROX/BHQ2	٦٢	ct+Agc+Gct+Aat+Atg+Cgtgaa	PTp45(5)	١/٣
HPV45	TaqMan	VIC	٦٣	TGCGTGAAACCCCTGGCAGTTG	PTp45(172Q)	١/٣
HPV45	TaqMan MGB	VIC	٦٤	ACACAGTACCTACGGACCTA	PTp45(127)	١/٣
HPV45	TaqMan MGB	VIC	٦٥	CGCTAATATGCGTGAAAC	PTp45(164)	١/٣
HPV35	TaqMan	FAM	٦٦	TAC CAC TGG CAC	PTp 35	٤

	MGB			ATT G		
HPV35	TaqMan MGB	FAM	٢٠	GTACCACTGGCACAT TG	PTp35(4)	٤
HPV35	TaqMan MGB	FAM	٦٨	TACCACTGGCACATT G	pTP35(5)	٤
HPV31	TaqMan MGB	VIC	١٨	TCC GGT TCA ACA GCT AC	PTp 31	٤
HPV31	TaqMan	VIC	٧٠	TCAGGCGCGGTTGGT GAATCGGT	PTp31 (115g)	٤
HPV31	TaqMan MGB	VIC	٧١	TTCAACAGCTACTTTA GC	PTp31(168)	٤
HPV31	TaqMan MGB	VIC	٧٢	CTCCGGTTCAACAGC TA	PTp31(162)	٤
HPV6	TaqMan MGB	NED	٧٣	TGCCTGATACTCTTAT AATTAA	PTp6(2)	٤
HPV6	TaqMan MGB	NED	٧٤	ACCCCGAGCGGCT	PTp6(197)	٤
HPV6	TaqMan MGB	NED	٧٥	TGTTAACACCCCGAG CGG	PTp6(190	٤
HPV6	TaqMan MGB	NED	١٧	TAGTGGAAATCGCAC GTCT	PTp6(154)	٤
HPV6	TaqMan	ROX/BHQ2	٧٧	AACAGGGCTGGCGAG GTGGG	PTp6(101)	٤
HPV6	TaqMan	ROX/BHQ2	٧٨	TTTAACAGGGCTGGC GAGGTGGG	PTp6(98)	٤
HPV6	TaqMan	ROX/BHQ2	٧٩	ACAGGGCTGGCGAGG TGGG	PTp6(122)	٤
HPV6	TaqMan	ROX/BHQ2	٨٠	TTTTTAACAGGGCTG GCGAGGT	PTp6(116)	٤

تكون المجموعة التضخيم متزامن التي يتم بها تحديد أنواع معينة قد تم وضعها في العمود الأول. تمت كتابة متواليات الحمض النووي المغلقة Locked nucleic acid sequences (LNA™) بأحرف الحالة المنخفضة بالنسبة للوحدات البنائية العادية والأحرف الأمامية في الحالة العليا مع "+" للوحدات البنائية LNA . تم توضيح المسبارات التي تم استخدامها في خلط المجموعات المتنوعة فيما يلي بخط كبير. يوضح الشكل الرمادي للنصل أن المسبار قد تم استبداله. تكون المركبات

الحاملة للفلور fluorophors المستخدمة (FAM، VIC، NED و ROX) عبارة عن تلك المستخدمة في الطريقة الحالية. وعلى نحو بديل، يمكن استخدام المركبات الحاملة للفلور وتوليفات من المركبات الحاملة للفلور كما هو معروف للماهر في المجال.

بعد الدورات من ١-٣ من إعادة تصميم المسبارات /البادئات، تكون الصيغة التضخيم متزامن في الجدول ٣ كما يلي:

الجدول رقم ٣: التركيبة الخاصة بخلائط PCR التضخيم متزامن.

المجموعة التضخيم متزامن ١. HPV 39,51,56,66

البادئ	المتوالية	متوالية رقم	التركيز
PTf	5-TG(CT)AAA TAT CC(AT) GAT TAT (AT)TI IAA ATG-3	١	٦٠٠ نانو مولار
PTrGr2	5-TG(GT) AGC CAA TAA GGT TTA TTA AA-3	٣	٦٠٠ نانو مولار

مسبار probe	المتوالية	متوالية رقم	النوع	التركيز
PTp 39(4)	5-ROX CA+CA+GATAT+ACG+TG+CAA+A CC-3	١٠	LNA	٥٠ نانو مولار
PTp 51(156)	5- FAM AGT GGT AAT GGC CGT GAC-3	١١	TaqMan MGB	١٠٠ نانو مولار
PTp 56(2)	5- VIC CAA TAC CTG CAG AGT TAT A-3	١٢	TaqMan MGB	٥٠ نانو مولار
PTp 66 (1)	5- NED TTG GAA GGG TGG CAA T-3	١٣	TaqMan MGB	١٠٠ نانو مولار

المجموعة التضخيم متزامن ٢. HPV 39,51,56,66

البادئ	المتوالية	متوالية	التركيز
PTf	5-TG(CT)AAA TAT CC(AT) GAT TAT (AT)TI IAA ATG-3	١	٦٠٠ نانو مولار
PTrGr2	5-TG(GT) AGC CAA TAA GGT TTA TTA AA-3	٣	٦٠٠ نانو مولار

مسبار	المتوالية	متوالية	النوع	التركيز
PTp 39(4)	5-ROX CA+CA+GATAT+ACG+TG+CAA+A CC-3	١٠	LNA	٥٠ نانو مولار
PTp 51(156)	5- FAM AGT GGT AAT GGC CGT GAC-3	١١	TaqMan MGB	١٠٠ نانو مولار
PTp 56(2)	5- VIC CAA TAC CTG CAG AGT TAT A-3	١٢	TaqMan MGB	٥٠ نانو مولار
PTp 66 (1)	5- NED TTG GAA GGG TGG CAA T-3	١٣	TaqMan MGB	١٠٠ نانو مولار

المجموعة التضخيم متزامن ٣. HPV 16,45,58

البادئ	المتوالية	متوالية	التركيز
PTf	5-TG(CT)AAA TAT CC(AT) GAT TAT (AT)TI IAA ATG-3	١	٦٠٠ نانو مولار
PTr957	5- TGI AIC CAA TAI GG(CT) TTA TTG AA -3	٤	٦٠٠ نانو مولار
مسبار	المتوالية	متوالية	النوع	التركيز
PTp16(6)	5- FAM ATT TGC AGT AGA CCC AGA G-3	١٤	TaqMan MGB	١٥٠ نانو مولار
PTp45(6)	5- VIC GTG AAA CCC CTG GCA GT-3	١٥	TaqMan MGB	١٥٠ نانو مولار
PTp58	5- NED TCC GGT AAT ACT GCA G-3	١٦	TaqMan MGB	٥٠ نانو مولار

المجموعة التضخيم متزامن ٤. HPV 6,31,33,35

البادئ	المتوالية	متوالية رقم	التركيز
Oli1+	5- TG(CT)AAA TAT CC(AT) _ATT AT (AT)TI IAA ATG -3	١	٦٠٠ نانو مولار
PTrGr4	5- TGT AIC CAA TAT GGt TTA TTA AA-3	٥	٦٠٠ نانو مولار

	المتوالية	متوالية رقم	Kons.i Quantamix	C.off
PTp 6(154)	5-TAG TGG AAA TCG CAC GTC T-3 NED	١٧	٥٠ نانو مولار	٦-٧
PTp 31	5-TCC GGT TCA ACA GCT AC-3 VIC	١٨	٥٠ نانو مولار	٣١-٩
PTp 33(9)	5-ROX tg(+C)ctctatt(+C)aaag(+C)agtgc-BHQ2	١٩	١٥٠ نانو مولار	٣٣-٧
PTp 35(4)	5- GTA CCA CTG GCA CAT TG-3 FAM	٢٠	١٠٠ نانو مولار	٣٥-٧

المثال رقم ١٠: وسيلة التحكم الداخلية_Internal Control

تم استخدام genome يحتوي على plasmid من نوع HPV غير المكون للورم من HPV6 في شكل وسيلة تحكم داخلية. يكون تحديد واختبار مسبار probe التحكم الداخلي مثل المسبارات الأخرى. ولكي يتم تحديد التركيزات المناسبة من وسيلة التحكم الداخلية، تمت إضافة HPV6 إلى تفاعلات المجموعة 4 PCR عند تركيزات تخفيف تصل إلى عشر مرات من ٤,١٠ ^{٣} GU إلى ٤٠ GU لكل تفاعل. تم استخدام الخليط المتعدد الذي يشتمل على وسيلة التحكم الداخلية في اختبار التضخيم باستخدام أنواع HPV ٣١، ٣٣ و٣٥ × ١٠ مرات تخفيف لكي يتم تحديد تركيزات التحكم الداخلية،

إذا وجدت أي منها، مما يؤدي إلى تقليل الحساسية التحليلية للأنواع المستهدفة.

الجدول رقم ١١: التقييم في مقابل العينات الإكلينيكية clinical samples

وبمجرد الوصول إلى الصيغة النهائية من الاختبار بالاعتماد على نتائج الاختبارات المذكورة أعلاه، يتم تقييم الاختبار على ٣٧ عينة إكلينيكية وتمت مقارنة النتائج باستخدام النتائج السابقة من اختبار الإمساك للمركب الهجين hybrid HCII الخاصة بالنسخ باستخدام اختبار النقطة في السطر العكسي.

الجدول رقم ٤: مقارنة النتائج الخاصة بالمجموعة المتعددة من PCR فيما يتعلق ٣٧ عينة إكلينيكية بالمقارنة باختبارالإمساك الهجين (HCII) والنتائج الخاصة بالنسخ السابق باستخدام نقطة الخط العكسية. لم تتم مقابلة نتائج عكسية متعلقة بالاختبارات السابقة. كان إحدى العينات سلبية وخاطئة بالنسبة لاختبار HCII وفي عينة واحدة يفشل الاختبار المتعدد في اكتشاف النوع الذي تم الحصول عليه عن طريق اختبار الطباعة السابق.

أوضحت النتائج بالتالي أن ٥ عينات من الاختبار المتعدد طبقاً للاختراع الحالي يتم اكتشافها في أنواع إضافية لم يتم اكتشافها في التحليل السابق.

جدول رقم : عينات إكلينيكية اختبار التوافق في الزمن الفعلي الخاص بالتقييم.

العينة	نتيجة HCII	نتيجة النسخ القبلي	النتيجة التوافقية التضخيم متزامن
		HPV16	HPV16
١	+	-	-
٢	-	-	-
٣	-	HPV35	HPV16, 35, 52
٤	+	-	-
٥	-	HPV31	HPV31, 52
٦	+	-	-
٧	-	HPV51	HPV51, 56
٨	+	HPV51	HPV51
٩	+	-	-
١٠	-	-	-
١١	-	-	HPV51, 66
١٢	-	-	-
١٣	-	-	-
١٤	-	-	-
١٥	-	-	-
١٦	-	-	-
١٧	-	HPV39	HPV39
١٨	+	-	-
١٩	-	HPV51	HPV51
٢٠	-	-	HPV16, 45
٢١	-	-	-
٢٢	-	-	-
٢٣	-	-	-
٢٤	-	-	-
٢٥	-	-	-
٢٦	+	-	-
٢٧	-	-	-
٢٨	-	-	-
٢٩	-	HPV45	HPV45
٣٠	±	-	-
٣١	-	HPV16	HPV16
٣٢	+	-	-
٣٣	-	HPV31	HPV31
٣٤	-	HPV51, 52, 59	HPV51, 52
٣٥	+	-	-
٣٦	-	-	-
٣٧	-	HPV16	HPV16

وبالتالي، يقارن الجدول رقم ٤ ، نتائج مجموعة التضخيم المتزامن التوافقية PCR لـ ٣٧ عينة، بالمقارنة باختبار HCII وقد تم وضع النتائج السابقة وكتابتها باستخدام نقط خطية عكسية. هناك

موافقة كاملة خاصة بالنتائج لـ ٢٨ عينة، منها ٥ إيجابية و٢٣ عينة سلبية. على الرغم من ذلك فإن هناك اثنين من عينات HCII سلبية بينما أن نقطة الخط العكسية وPCR التضخيم متزامن التوافقية تعطي نتائج مثالية. في العينة رقم ٥، يكشف اختبار المجموعة المتنوعة التوافقية عن أنواع زائدة لم يتم اكتشافها عن طريق الخط النقطي. كانت تلك الأنواع عبارة عن HPV66 (عينة واحدة) والتي لم يتم تضمينها في اختبار النقطة الخطية العكسي، HPV52 (اثنين من العينات) و HPV56 (عينة واحدة)والتي يكون لأجلها خط الاختبار العكسي معروفاً بأنه يقلل الحساسية وHPV35 و HPV16 وHPV45 (واحدة في كل حالة). في واحدة من العينات، يفشل الاختبار المتعدد التوافقي في اكتشاف النوع (HPV59) عن طريق النقطة العكسية الخطية.

المثال رقم ١٢: إعداد PCR في الوقت الفعلي التوافقية

تم استخدام الإجراء الحالي لكي يتم تحليل ٢١ عينة إكلينيكية. كانت العينات عبارة عن عينات DNA من عينات الرقة التي تم استخلاصها باستخدام وسيلة استخلاص DNA آلية من MagNAPure.

١-يتم خلط PCR فيما يتعلق بالمجموعات ١، ٢، ٣، و ٤ تم تحضيرها في أنابيب منفصلة طبقاً للجداول التالية:

الجدول رقم ٥

المجموعة HPV ١، صيغة الخلط الأساسية: تفاعل ٥٠ ميكرولتر.

تركيز البادئ ٦٠٠ نانو مولار .

تركيز المسبار probe ١٥٠ نانو مولار لـ HPV18، ٥٠ نانو مولار لـ HPV52 و ١٠٠ نانو مولار لـ HPV59.

مكون	حجم لكل عينة	حجم ٢٦ عينة ومجموعات مقارنة
Rx-mix QuantaFast حلقي qPCR	٢٥ ميكرولتر	٦٥٠ ميكرولتر
PTf ١٠٠ بيكومول/ ميكرولتر	٠,٣ ميكرولتر	٧,٨ ميكرولتر
PtrGr1 100 بيكو مول/ميكرو لتر	٠,٣ ميكرولتر	٧,٨ ميكرولتر
المسبارات ١٨ (١٣١)، ٥٢(٤)، ٥٩(١) ٥ بيكومول/ ميكرولتر	١,٥+٠,٥+١,٠ ميكرولتر	٣٩+١٣+٢٦ ميكرولتر

٥ الجدول رقم ٦

المجموعة HPV ٢، صيغة الخلط الأساسية : تفاعل ٥٠ ميكرولتر .

تركيز البادئ ٦٠٠ نانو مولار .

تركيز المسبار probe ٥٠ نانو مولار لـ HPV39، ١٠٠ نانو مولار لـ HPV51، ٥٠ نانو مولار لـ HPV56 و ١٠٠ نانو مولار لـ HPV66

مكون	حجم لكل عينة	حجم ٢٦ عينة ومجموعات مقارنة
Rx-mix QuantaFast Cycling qPCR	٢٥ ميكرولتر	٦٥٠ ميكرولتر

PTf ١٠٠ بيكومول/ ميكرولتر	٠,٣ ميكرولتر	٧,٨ ميكرولتر
PTrGr2 ١٠٠ بيكومول/ ميكرولتر	٠,٣ ميكرولتر	٧,٨ ميكرولتر
المسبارات ٣٩ (٤)، ٥١ (١٥٦)، ٥٦(٢) ٦٦ (١) ٥ بيكومول/ ميكرولتر	١,٠ +٠,٥+١,٠+٠,٥ ميكرولتر	١٣+٢٦+١٣+٢٦ ميكرولتر
H2O	١٦,٤ ميكرولتر	٤٢٦ ميكرولتر

جدول رقم ٧

المجموعة HPV ٣، صيغة الخلط الأساسية : تفاعل ٥٠ ميكرولتر .

تركيز البادئ ٦٠٠ نانو مولار .

٥ تركيز المسبار probe ١٥٠ نانو مولار لـ HPV16، ١٥٠ نانو مولار لـ HPV45 و ٥٠ نانو مولار لـ HPV58

مكون	حجم لكل عينة	حجم ٢٦ عينة ومجموعات مقارنة
Rx-mix QuantaFast Cycling qPCR	٢٥ ميكرولتر	٦٥٠ ميكرولتر
PTf ١٠٠ بيكومول/ ميكرولتر	٠,٣ ميكرولتر	٧,٨ ميكرولتر
PTr ١٠٠ بيكومول/ ميكرولتر	٠,٣ ميكرولتر	٧,٨ ميكرولتر
المسبارات ١٦ (٦)، ٤٥ (٦)، ٥٨ ٥ بيكومول/ ميكرولتر	٠,٥+١,٥+١,٥ ميكرولتر	١٣+٣٩+٣٩ ميكرولتر
H_2O	١٥,٩ ميكرولتر	٤١٣ ميكرولتر

الجدول رقم ٨

المجموعة HPV ٤، صيغة الخلط الأساسية : تفاعل ٥٠ ميكرولتر .

تركيز البادئ ٦٠٠ نانو مولار .

تركيز المسبار probe ٥٠ نانو مولار لـ HPV٦، ٥٠ نانو مولار لـ HPV31، ١٥٠ نانو مولار لـ HPV33 و ١٠٠ نانو مولار لـ HPV35

مكون	حجم لكل عينة	حجم ٢٦ عينة ومجموعات مقارنة
Rx-mix QuantaFast Cycling qPCR	٢٥ ميكرولتر	٦٥٠ ميكرولتر
PTf ١٠٠ بيكومول/ ميكرولتر	٠,٣ ميكرولتر	٧,٨ ميكرولتر
PtrGr 4 ١٠٠ بيكومول/ ميكرولتر	٠,٣ ميكرولتر	٧,٨ ميكرولتر
المسبارات ٦ (١٥٤)، ٣١، ٣٣ (٩)، ٣٥(٤) ٥ بيكومول/ ميكرولتر	١,٠ +١,٥+٠,٥+٠,٥ ميكرولتر	٢٦+٣٩+١٣+١٣ ميكرولتر
IK	٠,٥ ميكرولتر	١٣ ميكرولتر
H_2O	١٥,٩ ميكرولتر	٤١٣ ميكرولتر

٥ ٢-برنامج PCR : ٩٥°، ١٢ دقيقة ويلي ذلك ٤٥ دورة عند ٩٥° م لمدة ١٥ ثانية، وعند ٤٥° م لمدة ٣٠ ثانية، وعند ٦٠° م لمدة ٦٠ ثانية.آلة PCR في الزمن الفعلي AB7300. تم استخدام إعداد الطبق ذي العيون الـ ٩٦ التالي:

الصف ١، ٢، ٣: وسائل اكتشاف للمجموعة ١

الصف ٤، ٥، ٦: وسائل اكتشاف للمجموعة ٢،

الصف ٧، ٨، ٩ وسائل اكتشاف للمجموعة ٣ و

الصف ١٠، ١١، ١٢ وسائل اكتشاف للمجموعة ٤.

تم أيضاً إدخال عدد العينة لكل ٢١ عينة.

تم إجراء كل عينة في كل المجموعات. بالإضافة إلى ذلك، تم تضمين وسائل التحكم الخاصة في كل مجموعة والتي تشتمل على كل أنواع HPV في المجموعة وفي وسائل التحكم السلبية.

وبالتالي، تم تضمين وسائل التحكم التالية:

وسيلة التحكم من النوع الإيجابي

وسيلة التحكم من النوع ١٣ التي تشتمل على ٤٠٠٠ GU من HPV ١٦، ١٨، ٣١، ٣٣، ٣٥، ٣٩، ٤٥، ٥١، ٥٢، ٥٦، ٥٨، ٥٩ و٦٦ لكل حجم مساو لـ ٥ ميكرو لتر.

وسائل تحكم المجموعة الموجبة: تشتمل على ٤٠٠٠ GU من HPV ١٨، ٥٢، و٥٩ (المجموعة ١)، HPV ٣٩، ٥١، ٥٩ و ٦٦ (المجموعة ٢)، ، HPV ١٦، ٤٥و ٥٨ (المجموعة ٣) وHPV ٣١، ٣٣، ٣٥ (المجموعة ٤) وقد تم استخدام تلك المجموعات مع المجموعات المناظرة لها.

وفيما يتعلق بكل مجموعة تضخيم متزامن، فإن المجموعة المتعددة من النوع الـ١٣، ومجموعة التحكم ومجموعة التحكم السلبية (لم يتم إليها إضافة DNA) قد تم تنفيذها.

٣- تم خلط PCR كما تم وصف ذلك في (١) وجعلها في أجزاء مساوية، تمت إضافة ٤٥ ميكرو لتر إلى كل عين ويلي ذلك إعداد الطبق.

تمت إضافة ٥ ميكرو لتر من العينات من DNA وتمت إضافة عينة المقارنة الموجبة طبقاً لإعداد

الطبق. تم إحكام غلق الطبق PCR وتم وضعه في آلة PCR . يستغرق برنامج PCR حوالي ٢,٥ ساعة.

الاعتبارات اللوجيستية Logistic considerations

كان الوقت المطلوب لاكتمال تحليل ٢٠ عينة هو ٨ ساعات-٤,٥ ساعة لمعالجة عينة، ١٥ دقيقة لإعداد PCR، ٢,٥ ساعة ، زمن إجراء PCR وساعة واحدة للتحليل. الخاص بهذه العينات والتي تصل إلى حوالي ٢,٥ ساعة في الزمن.

تم توضيح تحليل العينات ومنحنيات التضخيم الخاصة بنوع PCR اللتضخيم المتزامن الشائع في الزمن الفعلي لاكتشاف أنواع معينة HPV ، ١٦، ١٨، ٣١، ٣٣، ٣٥، ٣٩، ٤٥، ٥١، ٥٢، ٥٦، ٥٨، ٥٩ و٦٦ في الأشكال من ١-١٣. يكون المحور الرأسي عبارة عن لوغارتم (التألق الفلورسنتى fluorescence) أو جزء أساسي تم طرحة خاصة بقناة اللون المناسبة. يكون المحور الأفقي عبارة عن دورة PCR. يتم تعليم الخط الأفقي باستخدام رأس سهم على المحور الرأسي من الناحية اليمنى والذي يكون بمثابة خط القيمة الحدية الذي يتم وضعه بشكل يدوي بعد تصحيح التألق الفلورسنتى fluorescence الأساسي. تعتبر منحنيات التضخيم العابرة لخط القيمة الحدية عبارة عن قيمة موجبة وحلقة PCR جزيئية حيث يعبر محيط التضخيم عن خط القيمة الحدية والذي يكون بمثابة حلقة قيمة حدية (C_T) موجودة في التقرير المرفق. يوضح الشكل رقم ٤ التضخيم الخاصة بوسيلة التحكم الداخلية، HPV6.

النتائج الخاصة بالمجموعة التضخيم متزامن ١،HPV ١٨و٥٢ و٥٩.

يوضح الشكل رقم ١ تضخيم HPV ١٨ في مجموعة تضخيم متزامن ١. تكون اثنين من المنحنيات الموجبة عبارة عن وسائل تحكم موجبة. وبالتالي ليس هناك عينات موجبة من HPV18 .

يوضح الشكل رقم ٢ تضخيم HPV52 في مجموعات التضخيم المتزامن ١، ٤ حيث تكون المنحنيات الموجبة متاحة. تكون المنحنيات بشكل البرتقالي والشكل الرمادي عبارة عن وسائل تحكم موجبة. تكون اثنين من المنحنيات الزرقاء عبارة عن عينات موجبة (العينة الرابعة و٦) التي بها HPV52.

يوضح الشكل رقم ٣ تضخيم HPV59 في مجموعة تضخيم متزامن ١. تكون اثنين من المنحنيات الموجبة عبارة عن وسائل تحكم موجبة. لا يوجد عينات موجبة بها HPV59.

النتائج الخاصة بمجموعة التضخيم المتزامن ٢، HPV39 ، ٥١، ٥٦، ٦٦

يوضح الشكل رقم ٤ تضخيم HPV39 في مجموعة التضخيم المتزامن ٢. يكون المنحنى الأخضر عبارة عن وسيلة تحكم موجبة تشتمل على أنواع مستهدفة من المجموعة ٢. في مجموعة التحكم الثانية الموجبة يتم تضمين كل الأربعة عشر نوعاً المستهدفة من HPV39 التي لم يتم تضخيمها. يكون المنحنى الأسود عبارة عن عينة موجبة قوية (العينة ١٨) التي تشتمل على HPV39.

يوضح الشكل رقم ٥ التضخيم الخاص بـHPV51 في مجموعة التضخيم المتزامن الثانية٢. تكون ستة من المنحنيات الموجبة مرئية. تكون المنحنيات الخضراء والبنية العابرة لخط القيمة الحدية عند الحلقة ٢٩ عبارة عن وسائل تحكم موجبة. تكون المنحنيات المتبقية الأربعة عبارة عن عينات موجبة من HPV51 وتكون اثنتين منها (العينة ٨ و٩ موجبة بشكل قوي). تكون المنحنيات السوداء والزرقاء الخاصة باثنين من العينات متطابقة. تخترق العينة ٢٠ (المنحنى الأخضر) خط القيمة الحدية القريب من وسيلة التحكم الموجبة الذي يوضح أنها تشتمل على كميات مشابهة من HPV51 (GU٤٠٠٠). تكون العينة ١٢ (المنحنى الأحمر) موجبة بشكل ضعيف.

يوضح الشكل رقم ٦ تضخيم HPV56 في مجموعة تضخيم متزامن ٢، ٣ في المنحنيات الموجبة

التي تكون مرئية. تكون المنحنيات الخضراء والبنية عبارة عن وسائل تحكم موجبة. تكون المنحنيات الزرقاء عبارة عنية عينة موجبة (العينة ٨). ترجع المنحنيات المسطحة إلى التأثير التنافسي لتركيزات عالية جداً من HPV51 في العينة المذكورة .

يوضح الشكل رقم ٧ تضخيم HPV66 في مجموعة التضخيم المتزامن ٢. تكون المنحنيات الخضراء والبنية في أقصى اليمين عبارة عن وسائل تحكم موجبة. وتكون المنحنيات الحمراء عبارة عن عينة موجبة.

النتائج الخاصة بمجموعة التضخيم المتزامن ٣، HPV ١٦ و ٤٥ و ٥٨

يوضح الشكل رقم ٨ تضخيم للمجموعة التضخيم متزامن HPV في المجموعة ٣ و ٤ والتي تكون بمثابة منحنيات موجبة وتكون مرئية. تكون المنحنيات البنية المنحنيات الحمراء عابرة لخط القيمة الحدية عند الحلقة ٣٤ وتكون بمثابة وسائل تحكم موجبة. يكون المنحنى البني أكثر استواءً من المنحنى الأحمر ويحتمل أن يكون ذلك بسبب أن وسيلة التحكم الموجبة يتم تمثيلها عن طريق المنحنى البني الذي يشتمل على كل الأنواع المستهدفة الأربعة عشر والتي تنتج جهداً كبيراً خاص بالتنافس. تكون المنحنيات السوداء والخضراء عبارة عن عينات موجبة لـHPV16 (العينات ١ و ٢١) والتي تكون واحدة منها موجبة بشكل ضعيف جداً.

يوضح الشكل رقم ٩ تضخيم HPV45 في منحنيات المجموعة التضخيم متزامن ٣، ٣ الموجبة والتي يمكن رؤيتها. تكون المنحنيات البنية والحمراء عبارة عن وسائل تحكم موجبة. تكون المنحنيات الخضراء عبارة عن عينة موجبة من HPV45 (العينة ٢١).

يوضح الشكل رقم ١٠ تضخيم عينة HPV58 في المجموعة التضخيم متزامن ٣.تكون اثنين المنحنيات الموجبة عبارة عن وسائل تحكم موجبة.لا يوجد هناك عينات موجبة من HPV58.

نتائج مجموعة التضخيم المتزامن ٤، HPV ٣١، ٣٣، ٣٥ ومجموعة التحكم الداخلية (HPV6)

يوضح الشكل رقم ١١ تضخيم HPV31 في المجموعة المتعددة ٤,٣ من خلال المنحنيات الموجبة التي يمكن رؤيتها. تكون اثنين من المنحنيات الخضراء المشابهة عبارة عن وسائل تحكم موجبة. يكون المنحنى الأزرق عبارة عن عينة موجبة (العينة ٦) الذي يشتمل على كميات كبيرة من HPV31.

يوضح الشكل رقم ١٢ تضخيم HPV33 المجموعة المتعددة ٤. تكون اثنين من المنحنيات الخضراء المشابهة عبارة عن وسائل تحكم موجبة والتي تكون بمثابة إشارات موجبة. ولا يوجد هناك عينات موجبة من HPV33.

يوضح الشكل رقم ١٣ تضخيم HPV35 في العديد من المجموعات المتعددة ٤,٣ التي لها منحنيات موجبة يمكن رؤيتها. تكون اثنين من المنحنيات الخضراء المشابهة عبارة عن عينات موجبة. يكون اللون الأحمر الداكن بمثابة عينة موجبة (العينة ٤) التي تشتمل على HPV35.

يوضح الشكل رقم ١٤ منحنيات تضخيم خاصة بوسيلة تحكم داخلية. تشتمل كل العينات على نفس كمية HPV6 ويتم دمج كل العينات مما يوضح غياب التثبيط. تكون المنحنيات نحو الجانب الأيمن عبارة عن مجموعة أساسية من المنحنيات التي توضح التثبيط الجزئي أو التنافس. تمت رؤية خمسة من تلك المنحنيات. في واحد من المنحنيات (في العينة رقم ٤) فإن التضخيم الخاص بوسيلة التحكم الداخلية يتم تثبيطه بشكل كامل. يسبب ذلك تثبيط بإشارة تضخيم قوية من HPV35 في نفس الأنبوب. تشتمل عينة مثبطة بشكل قليل، العينة رقم ٩ على HPV51 والتي يكون لها تركيزات عالية غير عادية. على الرغم من أن HPV51 لم يتم تضمينها في المجموعة ٤، وعلى الرغم من أن التشابه في متواليات البادئات يكون كافياً بشكل كبير لتوليد التضخيم التنافس في العينة الساخنة.

تكون العينات الثلاثة المتبقية (٣، ٨ و١٧) عبارة عن عينات سالبة ويمكن أن تكون مثبطة بشكل جزئي.

تكون وسيلة التحكم الداخلية HPV6 التي تمت إضافتها بهذا الشكل عبارة عن تفاعل مزدوج للمجموعة ٤ عند مستويات من ٤٠٠ -٤٠٠٠ GU لكل تفاعل بدون تضمين الحساسية التحليلية الخاصة بـ HPV31 أو HPV33 أو HPV35 . تم اختيار ٤٠٠٠ GU لكل تفاعل عند تركيز قياسي فيما يتعلق بوسيلة التحكم الداخلية internal control .

الجدول رقم ٩: الحساسية التحليلية

النوع HPV	الحساسية التحليلية (GU) (١٠٠ نانجرام/ ميكرولتر DNA بشري)	الحساسية التحليلية (GU) (١٠ نانجرام/ ميكرولتر DNA بشري)
HPV16	٤٠	٤
HPV18	٤٠	٤
HPV31	٤	٤
HPV33	٤٠٠	٤٠
HPV35	٤٠٠	٤٠

HPV39	٤٠	٤
HPV45	٤٠٠	٤
HPV51	٤	٤
HPV52	٤٠٠	٤٠
HPV56	٤٠	٤
HPV58	٤٠٠	٤٠
HPV59	٤٠	٤
HPV66	٤٠٠	٤٠

يشير هذا الجدول إلى الحساسية التحليلية للعديد من تفاعلات PCR التضخيم متزامن. تم إجراء التفاعلات باستخدام الصيغ المتعددة التي تم وصفها في الجداول من ٥-٨. كان المستهدف DNA هو ١٠ أضعاف في التخفيف بالنسبة HPV plasmid في ١٠٠ نانوجرام/ميكرو لتر من DNA البشري المناظر لـ ٥٠٠ أو ٥٠ نانو جرام على الترتيب من DNA البشري في العينة. تكون الحساسية التحليلية عبارة عن أقل رقم للنسخ (GU) الذي يعطي منحنى التضخيم الذي يمكن أن يتم تمييزه بشكل واضح عن fluorescence الأساسي.

المثال رقم ١٣ استخدام البادئ PTr2

تم إجراء التضخيم باستخدام التخفيف المتسلسل الخاص بـHPV16 و HPV18 و HPV31 و HPV33 و HPV35 و HPV56 مع بادئات من PTf و PTr2.

وبالتالي تم إجراء التضخيم في تفاعل ١٠٠ ميكرو لتر باستخدام ٥٠٠ نانو جرام من كل بادئ، ١,٥ ميكرو من Amplitaq Gold (Applied Biosystems) ، ١,٥ مل مولار من $MgCl_2$ و ٢٠٠ ميكرو مولار من dNTPs في محلول منظم من Amplitaq Gold. كان برنامج PCR كما يلي

٩٣° م ، ٣٠ ثانية ، ٤٠° م ، ٣٠ ثانية ، ٧٢° م و ٩٠ ثانية، ٤٠ دورة، ١٠ ميكرو لتر من المادة التي تم تضخيمها والتي تم استخدامها عند ١,٥ % من جل الأجاروز وتم تعريضها إلى الاستشراد الكهربي عند ١٣٠ فولت لمدة ٩٠ دقيقة، وتمت تلطيخها بـSYBR أخضر طبقاً لتعليمات المُصنع وتم تصويرها فوتوغرافياً تحت ضوء ٣٠٠ نانو متر من الأشعة فوق البنفسجية. تم توضيح النتائج في الأشكال من ١٥-٢٢.

وبالتالي يكون PTr2 مناسباً لتضخيم أنواع HPV

المثال رقم ١٤ طقم التشخيص

يمكن أن يكون لطقم التشخيص الخاص بالاختراع الحالي التصميم التالي، ولكن من الواضح أنه يمكن عليه إدخال العديد من التعديلات من خلال الماهر في المجال بدون الخروج من مجال وفحوى الاختراع.

يمكن أن يشتمل الطقم على أربعة صفوف كل من ستة أنابيب (الأنابيب ١-٦) التي تشتمل على كل مواد التفاعل الضرورية لاكتشاف أنواع HPV ١٦ ، ١٨، ٣١، ٣٣، ، ٣٥، ٣٩، ٤٥، ٥١، ٥٢، ٥٦، ٥٨، ٥٩ و ٦٦.

الجدول رقم ١ يشتمل على ٥٠٠ ميكرو لتر بها بادئ أمامي PTf ومسبارات بادئ خلفي PTrGr1 بالإضافة إلى مسبارات HPV18 (مرقم بـFAM)، HPV59 (مرقم NED) ومسبار LNA probe بالنسبة لـHPV52 (مرقم ROX).

الأنبوب ٢: يشتمل على ٥٠٠ ميكرو لتر من المحلول الذي يشتمل على بادئ أمامي PTf وبادئ عكسي reverse primer PTrGr2 بالإضافة إلى TaqMan MGB (مرقم FAM)، HPV56 (مرقم VIC) وHPV66 (مرقم NED) ومسبار LNA probe الخاص بـ HPV39 (مرقم ROX).

الأنبوب ٣: يشتمل على ٥٠٠ ميكرو لتر من محلول به بادئ أمامي PTf وبادئ عكسي reverse primer PTr بالإضافة إلى مسبارات TaqMan MGB فيما يتعلق بـHPV16 (مرقم FAM)، HPV45 (مرقم VIC) وHPV58 (مرقم NED).

الأنبوب ٤: يشتمل على ٥٠٠ ميكرو لتر من المحلول المشتمل على بادئ أمامي PTf وبادئ عكسي reverse primer PTrGr4 بالإضافة إلى مسبارات TaqMan MGB الخاصة بـHPV35 (مرقم FAM)، ومرقم HPV31 VIC ومسبار LNA probe الخاص بـHPV52 (المرقم ROX). وبالإضافة إلى ذلك، تم تضمين مسبار TaqMan فيما يتعلق بوسيلة التحكم الداخلية HPV6 ووسيلة التحكم الداخلية التي تستهدف تركيز يصل إلى ٨٠٠ نسخة لكل ميكرو لتر.

الأنبوب ٥: يشتمل على ٢٠ ميكرو لتر من وسيلة التحكم الإيجابية التي يكون لها ٤٠٠٠ نسخة من أنواع HPV ١٦ ، ١٨، ٣١، ٣٣، ، ٣٥،٣٥، ٣٩، ٤٥، ٥١، ٥٢، ٥٦، ٥٨، ٥٩ و ٦٦.

الأنبوب رقم ٦ يشتمل على ٢٥٠٠ ميكرو لتر من ٢ × PCR الخلطة الرئيسية المشتملة على polymerase DNA ثابت حرارياً و deoxynucleotide triphosphates و magnesium chloride في محلول منظم أساسي.

وطبقاً للإجراء التالي، يمكن أن يتم تحليل ٢٣ عينة بشكل متزامن. يمكن أن تكون ثلاثة من تلك العينات عبارة عن وسائل تحكم سلبية. بالإضافة إلى ذلك، يتم استخلاصDNA من العينات باستخدام طريقة مناسبة.

١- تم السماح لكل من الأنابيب من ١ إلى ٦ بالذوبان عند درجة حرارة الغرفة.

٢- المجموعة ١: تم تحضير الخلطة الرئيسية من المثال رقم ١٢ عن طريق إضافة ٦٠٠ ميكرو لتر من الخلطة الرئيسية PCR (الأنبوب ٦) إلى الأنبوب ١ وتم الخلط في الاتجاه العكسي. ٣- المجموعة ٢: تم تحضير الخلطة الرئيسية من المثال رقم ١٢ عن طريق إضافة ٦٠٠ ميكرو لتر من الخلطة الرئيسية PCR (الأنبوب ٦) إلى الأنبوب ٢ وتم الخلط في الاتجاه العكسي. ٤- المجموعة ٣: تم تحضير الخلطة الرئيسية من المثال رقم ١٢ عن طريق إضافة ٦٠٠ ميكرو لتر من الخلطة الرئيسية PCR (الأنبوب ٦) إلى الأنبوب ٣ وتم الخلط في الاتجاه العكسي.

٥- المجموعة ٤: تم تحضير الخلطة الرئيسية من المثال رقم ١٢ عن طريق إضافة ٦٠٠ ميكرو لتر من الخلطة الرئيسية PCR (الأنبوب ٦) إلى الأنبوب ٤ وتم الخلط في الاتجاه العكسي. ٦- تم نقل ٤٥ ميكرو لتر من المجموعة ١ من الخلطة الرئيسية إلى كل عين من الصفوف من أ و هـ من طبقه به ٩٦ عيناً من ٥٠٠ ميكرو لتر في طبق PCR البشري.

٧-تم نقل ٤٥ ميكرو لتر من المجموعة ٢ من الخلطة الرئيسية إلى كل عين من الصفوف من ب ، و.

٨-تم نقل ٤٥ ميكرو لتر من المجموعة ٣ من الخلطة الرئيسية إلى كل عين من الصفوف من ج ، ز.

٩-تم نقل ٤٥ ميكرو لتر من المجموعة ٤ من الخلطة الرئيسية إلى كل عين من الصفوف من د ، ح.

١٠-تمت إضافة ٥ ميكرو لتر من عينة DNA ١ إلى العين أ ١، ب ١، ج١، ود١.

١١- تمت إضافة ٥ ميكرو لتر من عينة DNA ٢ إلى العين أ ٢، ب ٢، ج٢، ود٢.

١٢- الاستمرار في إضافة العينات في نفس النمط للعيون أ٣-د٣، من خلال أ ١٢-د١٢.

١٣- الاستمرار في إضافة العينات في نفس النمط للعيون د١-ح١، من خلال د١١-ح ١١.

١٤- تمت إضافة ٥ ميكرو لتر من وسيلة التحكم الموجبة لكل العيون من د ١٢- ح١٢.

١٥- تم الغلق المانع للتسرب ووضع آلة PCR في مكانها وبداية برنامج PCR.

١٦- سوف يتم اكتشاف أنواع HPV ١٨ و٥٢ و٥٩ في الصفوف rows من أ إلى هـ.

١٧- سوف يتم اكتشاف أنواع HPV ٣٩ و٥١ و٥٦ و٦٦ في الصفوف ب ، و.

١٨- سوف يتم اكتشاف أنواع HPV ١٦ ٤٥ و٥٨في الصفوف ج ، ز.

١٩- سوف يتم اكتشاف أنواع HPV ٣١، ٣٣، ٣٥ ووسيلة التحكم الداخلية في الصفوف د، ح.

يجب أن يكون برنامج PCR عبارة عن:

به نشاط polymerase ويتم إتلاف العينة: ١٠ دقائق عند ٩٥°م.

ويلي ذلك ٤٥ دورة من :

المسخ لمدة ١٥ ثانية عند ٩٥°م

التلدين: ٣٠ ثانية عند ٤٥°م،

التمدد: ٦٠ ثانية عند ٦٠°م.

يجب أن تتم برمجة آلة PCR لكي تعمل على جمع بيانات fluorescence في أربعة قنوات من الألوان والتي تم جعلها في أفضل صورة لكي يتم الكشف عن صبغات fluorescence FAM، VIC، NED، وROX.

يقصد من الأمثلة السابقة أنها أمثلة موضحة للاختراع فقط. يجب أن يتم فهم أن الشخص الماهر في المجال يمكنه تعديل الطريقة أو الطقم أو المسبارات أو البادئات التي تم وصفها في هذه الوثيقة بدون الخروج عن المجال المقبول للاختراع الذي تم وصفه أعلاه وفي عناصر الحماية فيما يلي.

عناصر الحماية

١ ١- طريقة لاكتشاف و/أو انتساخ و/أو التقدير الكمي المتزامن لوجود الورم الحليمي البشري
٢ human papillomavirus (HPV) ، ١٨، ٥٢، ٥٩، ٣٩، ٥١، ٥٦، ٦٦، ١٦ ، ٤٥، ٥٨، ٣١، ٣٣
٣ و ٣٥ في عينة بيولوجية ، تشتمل الطريقة على التفاعلات المتوازية الأربعة التالية :
٤ التفاعل ١-أ) تضخيم شظايا الحمض النووي amplification of the nucleic acid fragments
٥ من الورم الحليمي البشري(HPV) human papillomavirus ١٨ ، ٥٢ و ٥٩ في وجود :
٦ (i) polymerase حمض نووي nucleic acid
٧ (ii) بادئ PCR أمامي مع متوالية أوليجيو نيوكليوتيد oligonucleotide من المتوالية رقم: ١،
٨ (iii) نظير لها، بادئ عكسي reverse primer PCR مع متوالية أوليجيو نيوكليوتيد
٩ oligonucleotide رقم : ٢،
١٠ (iiii) مسبار probe مع أوليجيو نيوكليوتيد oligonucleotide من المتوالية رقم: ٧،٨ و ٩، تم
١١ ترقيمه بحامل للفلور fluorophore و جزيء مخمد quencher molecule و
١٢ ب) اكتشاف التغير في طول موجة التألق الفلوري fluorescence the wavelength منه الذي
١٣ يحدد نوع الورم الحليمي البشري(HPV) human papillomavirus ١٨، ٥٢ و ٥٩ ؛
١٤ التفاعل ٢-أ) تضخيم شظايا الحمض النووي amplification of the nucleic acid fragments
١٥ من الورم الحليمي البشري (HPV) human papillomavirus ٣٩،٥١،٥٦ و ٦٦ في وجود :
١٦ (i) polymerase حمض نووي nucleic acid
١٧ (ii) بادئ PCR أمامي مع أوليجيو نيوكليوتيد oligonucleotide من المتوالية رقم: ١،
١٨ (iii) بادئ عكسي reverse primer PCR مع أوليجيو نيوكليوتيد oligonucleotide من المتوالية
١٩ رقم: ٣،
٢٠ (iv) مسبار probe مع أوليجيو نيوكليوتيد oligonucleotide من المتوالية رقم: ١٠، ١١، ١٢ و
٢١ ١٣، تم ترقيمه بحامل للفلور fluorophore وجزيء مخمد quencher molecule و
٢٢ ب) اكتشاف التغير في طول موجة التألق الفلوري fluorescence the wavelength منه الذي

٢٣ يحدد نوع الورم الحليمي البشري(HPV) human papillomavirus ٣٩، ٥١، ٥٦ و ٦٦؛

٢٤ تفاعل٣-أ) تضخيم شظايا الحمض النووي amplification of the nucleic acid fragments من

٢٥ الورم الحليمي البشري(HPV) human papillomavirus ١٦ ،٤٥ و ٥٨ في وجود

٢٦ (i) polymerase حمض نووي nucleic acid

٢٧ (ii) بادئ PCR أمامي مع أوليجيو نيوكليوتيد oligonucleotide من المتوالية رقم: ١،

٢٨ (iii) بادئ عكسي PCR reverse primer مع أوليجيو نيوكليوتيد oligonucleotide من المتوالية

٢٩ رقم: ٤،

٣٠ (iv) مسبار probe مع أوليجيو نيوكليوتيد oligonucleotide من المتوالية رقم: ١٤، ١٥ و ١٦،

٣١ تم ترقيمه بحامل للفلور fluorophore و جزيء مخمد quencher molecule و

٣٢ ب) اكتشاف التغير في طول موجة التألق الفلوري fluorescence the wavelength منه الذي

٣٣ يحدد نوع الورم الحليمي البشري(HPV) human papillomavirus ١٦ ، ٤٥ و ٥٨؛

٣٤ التفاعل ٤-أ) تضخيم شظايا الحمض النووي amplification of the nucleic acid fragments

٣٥ من الورم الحليمي البشري (HPV) human papillomavirus ٣١ ، ٣٣،٣٥ و وسيلة تحكم

٣٦ داخلية في وجود :

٣٧ (i) polymerase حمض نووي nucleic acid

٣٨ (ii) بادئ PCR أمامي مع أوليجيو نيوكليوتيد oligonucleotide من المتوالية رقم: ١،

٣٩ (iii) بادئ عكسي PCR reverse primer مع أوليجيو نيوكليوتيد oligonucleotide من المتوالية

٤٠ رقم: ٥،

٤١ (iv) مسبار probe مع أوليجيو نيوكليوتيد oligonucleotide من المتوالية رقم: ١٧، ١٨، ١٩ و

٤٢ ٢٠، تم ترقيمه بحامل للفلور fluorophore و جزيء مخمد quencher molecule و

٤٣ (v) وسيلة تحكم داخلي internal control و

٤٤ (ب) اكتشاف التغير في طول موجة التألق الفلوري fluorescence the wavelength منه الذي

٤٥ يحدد نوع الورم الحليمي البشري (HPV) human papillomavirus ٣١، ٣٣، ٣٥ ووسيلة تحكم

٤٦ داخلية internal control.

١ ٢- طريقة طبقاً لعنصر الحماية ١، حيث يتم إجراء التفاعلات المذكورة بشكل مواز وفي عبوات
٢ منفصلة.

١ ٣- طريقة طبقاً لأيٍ من عناصر الحماية ١الى٢، حيث المركبات الحاملة للفلور fluorophors
٢ الأربعة عبارة عن FAM،VIC، NED و ROX.

١ ٤- طريقة طبقاً لأيٍ من عناصر الحماية ١الى٢، حيث تكون وسيلة التحكم الداخلية عبارة عن
٢ الورم الحليمي البشري human papillomavirus (HPV) ٦.

١ ٥- طاقم تشخيص لاكتشاف و/أو انتساخ و/أو التقدير الكمي المتزامن لوجود الورم الحليمي
٢ البشري human papillomavirus (HPV) ١٦، ١٨، ٣١، ٣٣، ٣٥، ٣٩، ٤٥، ٥١، ٥٢، ٥٦،
٣ ٥٨، ٥٩ و ٦٦ في عينة بيولوجية تشتمل على الأربعة توليفات للمسبار probe البادئ كما هو
٤ مستخدم بعنصر الحماية ١.