الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

المملكة العربية السعودية
Kingdom of Saudi Arabia

براءة اختراع

إن الرئيس التنفيذي للهيئة السعودية للملكية الفكرية و بموجب أحكام نظام براءات الإختراع و التصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة و الأصناف النباتية و النماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/27 وتاريخ 1425/05/29هـ و المعدل بقرار مجلس الوزراء رقم 536 و تاريخ 1439/10/19هـ ، و لائحته التنفيذية.
يقرر منح :

ذا شينيس يونيفيرسيتي اوف هونج كونج
The Chinese University of Hong Kong

براءة اختراع رقم : SA 8574

بتاريخ : 1443/02/01 هـ
الموافق : 2021/09/08 م

عن الإختراع المسمى :

إنشاء متواليات لجزيء مفرد لحمض ريبوزي نووي منزوع الأكسجين في البلازما

SINGLE-MOLECULE SEQUENCING OF PLASMA DEOXYRIBONUCLEIC ACID

وفق ما هو موضح في وصف الاختراع المرفق، ولمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق النظامية في المملكة العربية السعودية خلال فترة سريان الحماية.

الرئيس التنفيذي

د. عبدالعزيز بن محمد السويلم

الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

[19] **الهيئة السعودية للملكية الفكرية**
[11] **رقم البراءة:** SA 8574 B1

[12] **براءة اختراع**

[45] **تاريخ المنح:** 1443/02/01 هـ
الموافق: 2021/09/08 م

[21] رقم الطلب: 518390907
[22] تاريخ دخول المرحلة الوطنية: 1439/05/26 هـ
الموافق: 2018/02/12 م
[30] بيانات الأسبقية:
US 62/204.396 2015/08/12 م
[72] اسم المخترع: لو يوك- مينج دينيس، شيو روسا واى كون، شينج سوك هانج
[73] مالك البراءة: ذا شينيس يونيفيرسيتى اوف هونج كونج
عنوانه: بواسطة اوفيس اوف ريسيرش اند كنوليدج ترانسفير سيرفيسز، روم 301، بى شو بولدينج شاتين، نيو تيريتوريس، هونج كونج 999077، الصين
جنسيته: صينية
[74] الوكيل: شركة الهدف لخدمات العلامات المحدودة

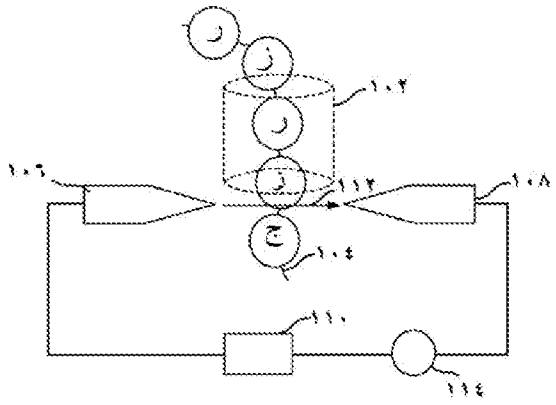
[86] رقم الطلب الدولي: PCT/CN2016/094802
تاريخ إيداع الطلب الدولي: 2016/08/12 م
[87] رقم النشر الدولي: WO 2017/025059 A1
تاريخ النشر الدولي: 2017/02/16 م
[51] التصنيف الدولي(IPC®):
C12Q 001/068, G01N 033/487
G06F 019/022
[56] المراجع:
EP 1225234, WO 2006095169
US 2013040827

الفاحص: حصه بنت عمر البيز

[54] اسم الاختراع: إنشاء متواليات لجزيء مفرد لحمض ريبوزي نووي منزوع الأكسجين في البلازما
SINGLE-MOLECULE SEQUENCING OF PLASMA DEOXYRIBONUCLEIC ACID

[57] الملخص: يتعلق الاختراع الحالي بطريقة لتحديد متوالية حمض نووي nucleic acid sequence. يمكن أن تتضمن الطريقة استقبال مجموعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين Deoxyribonucleic acid (DNA). يمكن أن تتضمن الطريقة أيضًا تحويل مجموعة أولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للحصول على كونكاتيمير concatemer. يمكن أن تتضمن الطريقة إجراء إنشاء متواليات لجزيء مفرد single-molecule sequencing للكونكاتيمير للحصول على متوالية أولى من الكونكاتيمير. في بعض التجسيدات، يمكن إنشاء متواليات لجزيء مفرد باستخدام مسم نانوي nanopore، ويمكن أن تتضمن الطريقة تمرير الكونكاتيمير خلال مسم نانوي. يمكن بعد ذلك الكشف عن إشارة كهربائية electrical signal أولى بينما يمر الكونكاتيمير خلال المسم النانوي. يمكن أن تناظر الإشارة الكهربائية الأولى متوالية أولى من الكونكاتيمير. بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن تتضمن الطريقة تحليل الإشارة الكهربائية الأولى لتحديد المتوالية الأولى. يمكن محاذاة المتواليات الفرعية Subsequences للمتوالية الأولى لتحديد المتواليات المناظرة لكل من المجموعة الأولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. الشكل (1أ)

عدد عناصر الحماية (33)، عدد الأشكال (16)



إنشاء متواليات لجزيء مفرد لحمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين في البلازما

SINGLE-MOLECULE SEQUENCING OF PLASMA DEOXYRIBONUCLEIC ACID

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يستند هذا الطلب إلى الطلب الأمريكي المؤقت رقم 204.396/62، المودَع بتاريخ 12 أغسطس لعام 2015، حيث يتم تضمين محتوياته هنا كمرجع لجميع الأغراض.

إن اختبار قبل الولادة غير الاختراقي Noninvasive prenatal testing (NIPT) عن طريق إنشاء متواليات حمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid (DNA) في بلازما الأم maternal plasma متوفر سريريًا الآن لفرز اختلال تضاعف العدد الكروموسومي الجنيني fetal chromosomal aneuploidies (1). على النقيض من إجراء بزل السَّلى amniocentesis، فإن إنشاء متواليات حمض حمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين في بلازما الأم لا يبدي أي مخاطر تتعلق بالإجهاض miscarriage risk. تتسم هذه الاختبارات بحساسية قريبة من 99٪ ونوعية قريبة من 99٪ (1). بالتالي، زاد الطلب السريري لاختبار اختبار قبل الولادة غير الاختراقي بشكل كبير منذ أن أصبح متوفر تجاريًا في عام 2011.

يُعد إنشاء متواليات متوازية بشكل كبير مكوّنًا رئيسيًا لمعظم بروتوكولات المختبرات المستخدمة حاليًا لاختبار اختبار قبل الولادة غير الاختراقي لاختلال تضاعف العدد الكروموسومي chromosomal aneuploidies (2). نظرًا لتكلفة الأدوات العالية، يتم إجراء هذه الاختبارات حاليا في مختبرات مرجعية reference laboratories. ولقد قامت مؤسسة Oxford Nanopore technologies بتطوير منصة إنشاء متواليات sequencing platform الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين أساسها المسم النانوي (3). تتضمن وحدات إنشاء متواليات بمسم نانوي Nanopore sequencers تكلفة معدات منخفضة نسبيًا وحيز إشغال منخفض. تبلغ تكاليف كل خلية تدفق flow cell 500–900 دولار أمريكي، ويمكن استخدامها لعدة مرات حتى 48 ساعة. كما أن سرعة إنشاء المتواليات سريعة نسبيًا بحيث يمكنها قراءة 30 قاعدة في الثانية من كل مسم نانوي. إن مثل تلك الخصائص مفيدة للاستخدام في المختبرات السريرية. ولكن، تتسم تقنيات المسم النانوي الحالية بأنها غير فعالة للعينات (على سبيل المثال، البلازما) التي تُستخدَم عادة لاختبار قبل الولادة غير الاختراقي.

تتعلق براءة الاختراع الأوروبية رقم: 1225234 ب1 بتخليق أحماض نووية nucleic acids وتحديدًا بتخليق وتكبير أحماض نووية غير منتظمة من أجل تشكيل متواليات سريع. ويعد تحديد متوالية النوكليوتيد لحمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين وحمض نووي ريبوزي Ribonucleic acid (RNA) بطريقة سريعة هدفًا رئيسيًا للباحثين في مجال التكنولوجيا الحيوية، خاصةً للمشاريع التي تسعى للحصول على متوالية الجينومات genomes الكاملة للكائنات الحية. بالإضافة إلى هذا، فإن التحديد السريع لمتوالية جزيء حمض نووي مهم لتحديد الطفرات الجينية genetic mutations وتعدد الأشكال في الأفراد ومجموعات الأفراد.

يتعلق الطلب الدولي رقم: 2006095169أ1 بطريقة لتحليل بولي نوكليوتيد polynucleotide مستهدف له وحدات مميزة من متوالية الحمض الأميني تشمل: (1) تشكيل بولي نوكليوتيد أول عبارة عن كونكاتيمير concatemer له متواليات بولي نوكليوتيد مستهدف متكررة عديدة؛ (2) تشكيل بولي نوكليوتيد على بولي نوكليوتيد الأول مهجن مع قسم من واحد أو أكثر من البولي نوكليوتيدات المستهدفة، بحيث يقابل القسم المتهجن، أو القسم غير المتهجن، وحدة متوالية على الهدف، وتحديد وحدة المتوالية على الهدف.

تتعلق براءة الاختراع الأمريكية رقم: 2013040827 أ1 بطرق لتشكيل متوالية حمض نووي تستخدم مسام نانوية لاكتشاف و/أو قياس كميات المركبات، مثل المنتجات أو المنتجات الثانوية لتفاعلات تشكيل متواليات الحمض النووي، وبتحديد متوالية نوكليوتيد nucleotide sequence باستخدام هذا الاكتشاف و/أو القياس. وقد يستخدم الاكتشاف أو القياسات منتجات أو منتجات ثانوية لها وسوم نبضية مقاومة، وسوم بصرية، أو وسوم يمكنها توليد كل من إشارات بصرية ونبضية مقاومة. وتعتبر الوسوم النبضية المقاومة وسوم جزيئية مرتبطة أو مرفقة بحليلة تسمح باكتشاف الحليلة الموسومة عن طريق تغيير في الخصائص الكهربائية للمسم النانوي، مثل المقاومة عبر المسم النانوي. وقد تكون الوسوم الخاصة باكتشاف المسم النانوي أيضًا عبارة عن وسوم بصرية، تحديدًا مستقبلات أزواج من مستقبل ومانح يمكنهم الخضوع إلى انتقال طاقة رنين فلورية fluorescent resonance energy transfer (FRET)، حيث تكون المانحات مرتبطة مع، أو وسم، مسم نانوي.

<u>الوصف العام للاختراع</u>

تحسّن التجسيدات فعالية تقنيات إنشاء متواليات لجزيء مفرد single-molecule sequencing عند تحليل عينات باستخدام شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين صغيرة نسبيًا. على سبيل

المثال، يمكن زيادة تركيز شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في عينة بشكل كبير، وبالتالي السماح بتفاعل مزيد من الشظايا مع وسيلة إنشاء المتواليات sequencing device (على سبيل المثال، مسم نانوي). وفي مثال آخر، يتم دمج شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في وحدات كونكاتيمير concatemers لإنشاء جزيئات أطول يمكن قراءتها، وبالتالي السماح بقراءة عدة شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين (بمعنى أكثر تحديدًا، شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الموجودة في الأصل بالعينة) على نحو فعال عبر إنشاء متواليات لجزيء واحد. يمكن استخدام إجراءات المعلومات الحيوية للكشف عن شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المختلفة التي تشكّل جزءً من نفس الكونكاتيمير. يمكن أن تتضمن التجسيدات التقنيتين أيضًا.

يمكن أن تتضمن التجسيدات طريقة لتحديد متوالية حمض نووي nucleic acid sequence. يمكن أن تتضمن الطريقة استقبال مجموعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن تتضمن الطريقة أيضًا تحويل مجموعة أولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للحصول على كونكاتيمير أول. يمكن أن تتضمن الطريقة إنشاء متواليات لجزيء مفرد للكونكاتيمير الأول للحصول على متوالية أولى للكونكاتيمير الأول. في بعض التجسيدات، يمكن إنشاء متواليات لجزيء مفرد باستخدام مسم نانوي، ويمكن أن تتضمن الطريقة تمرير الكونكاتيمير الأول خلال مسم نانوي أول. يمكن بعد ذلك الكشف عن إشارة كهربائية electrical signal أولى بينما يمر الكونكاتيمير خلال المسم النانوي الأول. يمكن أن تناظر الإشارة الكهربائية الأولى متوالية أولى للكونكاتيمير الأول.

يمكن أن تتضمن تجسيدات أخرى طريقة لتحديد متوالية حمض نووي. يمكن أن تتضمن الطريقة استقبال مجموعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن تحويل مجموعة أولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للحصول على كونكاتيمير أول. يمكن أن يتم تهجين نوكليوتيد موسوم بمادة فلورية fluorescent-labeled nucleotide في الكونكاتيمير. يمكن الكشف عن إشارة فلورية fluorescent signal أولى، حيث تناظر الإشارة الفلورية نوكليوتيد معين. يمكن بعد ذلك شطر الوسم الفلوري fluorescent label ويمكن إضافة نوكليوتيد آخر موسوم بمادة فلورية، ويمكن تكرار العملية.

يمكن أن تتضمن تجسيدات طريقة تُجرى بواسطة نظام كمبيوتر. يمكن أن تتضمن الطريقة استقبال

متوالية أولى لكونكاتيمير أول يولَّد بواسطة تحويل مجموعة أولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن تتضمن الطريقة أيضًا محاذاة متواليات فرعية للمتوالية الأولى لتحديد متواليات شظية fragment sequences مناظرة لكل شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للمجموعة الأولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين.

يمكن أن تتضمن بعض التجسيدات طريقة لإنشاء متواليات لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خالية من الخلايا. يمكن أن تتضمن شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الخالية من الخلايا شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما. يمكن أن تتضمن الطريقة استقبال عينة حيوية biological sample تتضمن مجموعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن تتضمن العينة الحيوية تركيزًا أول من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن تتضمن الطريقة أيضًا تركيز العينة الحيوية لتتضمن تركيزًا ثانيًا من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن يكون التركيز الثاني من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين أعلى من التركيز الأول لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خمس مرات أو أكثر. يمكن أن تتضمن الطريقة أيضًا تمرير مجموعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خلال مسام نانوية nanopores على ركيزة substrate. بالنسبة لكل من مجموعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، يمكن الكشف عن إشارات كهربائية electrical signals بينما تمر شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خلال مسم نانوي. يمكن أن تناظر الإشارات الكهربائية متوالية شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين.

يمكن أن تتضمن تجسيدات طريقة لإنشاء متواليات لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خالية من الخلايا. يمكن أن تتضمن الطريقة تركيز عينة حيوية لتتضمن تركيزا ثانيا من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين يزيد عن تركيز أولي لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين بخمس مرات أو أكثر. يمكن أن تتضمن الطريقة أيضًا تقنية إنشاء متواليات لجزيء مفرد. يمكن تهجين شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين بواسطة نوكليوتيد موسوم بمادة فلورية. يمكن أن تتضمن الطريقة أيضًا الكشف عن إشارة من النوكليوتيد الموسوم بالمادة الفلورية، بالإشارة المناظرة للنوكليوتيد. يمكن شطر النوكليوتيد الموسوم بالمادة الفلورية، ويمكن تكرار العملية لتحديد نوكليوتيدات إضافية ومتوالية لشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع

الأكسجين.

يمكن أن تتضمن التجسيدات أيضًا منتج كمبيوتر يشتمل على وسط يمكن قراءته بالكمبيوتر computer readable medium يخزن مجموعة من التعليمات لإجراء عملية لأي من طرق إنشاء متواليات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الموصوفة هنا. يمكن أن تتضمن بعض التجسيدات منتج كمبيوتر وواحد أو أكثر من المعالجات لتنفيذ تعليمات مخزنة على الوسط المقروء بالكمبيوتر. تتضمن التجسيدات الإضافية أنظمة لإجراء أي من الطرق.

يتم توجيه تجسيدات أخرى نحو أنظمة، أجهزة مستهلكين نقالة portable consumer devices، ووسط مقروء بالكمبيوتر مرتبط بالطرق الموصوفة هنا.

يمكن الحصول على فهم أفضل لطبيعة وفوائد تجسيدات الاختراع الحالي بالإشارة إلى الوصف التفصيلي التالي والرسومات المصاحبة.

<u>شرح مختصر للرسومات</u>

الشكل 1أ عبارة عن مخطط مبسط لوسيلة مسم نانوي nanopore device وحمض نووي وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

الشكل 1ب عبارة عن عملية تحويل شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين إلى كونكاتيمير وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

الشكل 2 عبارة عن عملية تحويل شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين إلى كونكاتيمير بطول شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين فاصلة وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

الشكل 3أ عبارة عن مخطط سير عمليات إطاري لطريقة إنشاء متواليات لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين عن طريق تحويل شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين إلى كونكاتيمير وباستخدام إنشاء متواليات لجزيء مفرد وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

الشكل 3ب عبارة عن مخطط سير عمليات إطاري مبسط لطريقة إنشاء متواليات لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين باستخدام إنشاء متواليات بمسم نانوي nanopore sequencing وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

الشكل 4 عبارة عن مخطط سير عمليات إطاري مبسط لطريقة تحليل متوالية كونكاتيمير وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

الشكل 5 عبارة عن مخطط سير عمليات إطاري مبسط لطريقة إنشاء متواليات لشظايا الحمض

الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين بكفاءة أكبر عن طريق زيادة تركيز شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين عدة مرات وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

الشكل 6 عبارة عن توزيعات حجمية لتجمعات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما تم إنشاء متواليات لها بواسطة وحدة إنشاء متواليات بمسم نانوي nanopore sequencer وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي. يتم رسم منحنى لتوزيع تكراري لشظايا متواليات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما التي تتراوح من صفر إلى 500 زوج قاعدي.

الشكل 7 عبارة عن منحنيات لأحجام الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما من البلازما في الأم مع جنين أنثى من بيانات تم الحصول عليها عن طريق إنشاء متواليات بمسم نانوي ومنصة إنشاء متواليات Illumina sequencing platform وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

الشكل 8 عبارة عن التوزيعات المقروءة للكروموسومات chromosomes مقارنةً بتوزيع متوقع من جينوم بشري human genome يمكن تعيين خريطة له وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي. يتم قراءة التوزيع التناسبي لمتواليات المسم النانوي بالنسبة لكل كروموسوم chromosome في تجميعة عينة. تشير القضبان الرمادية الممتلئة filled grey bars إلى نسبة النوكليوتيدات الناشئة من الكروموسومات البشرية المناظرة بناء على جزء يمكن تعيينه من الجينوم البشري المرجعي reference human genome، hg 19. أما القضبان الملونة المتبقية فتشير إلى نسبة القراءات التي لها متواليات المتحاذية مع الكروموسومات البشرية المناظرة لعينات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما.

الشكل 9 عبارة عن منحنى Circos لنتائج إنشاء متواليات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما من مرضى السرطان باستخدام تقنية إنشاء متواليات بمسم نانوي وإنشاء متواليات متوازية بشكل كبير وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

الشكل 10 عبارة عن توزيع حجم جزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المحولة إلى كونكاتيميرات وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

الشكل 11 عبارة عن توزيع حجم جزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما المشتقة من الأجزاء المحولة إلى كونكاتيميرات concatemerized segments من أنثى غير حامل وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي

الشكل 12 عبارة عن تمثل جينومي لأجزاء متحاذية aligned segments من الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين مركز في البلازما من أنثى غير حامل وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

الشكل 13 عبارة عن توزيع حجم جزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما المشتقة من أجزاء محولة إلى كونكاتيميرات من أنثى حامل بجنين ذكر وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

الشكل 14 عبارة عن تمثيل چينومي لأجزاء متحاذية من الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين مركز في البلازما من أنثى حامل بجنين ذكر وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

الشكل 15 عبارة عن مخطط إطاري لنظام لإجراء وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

الشكل 16 عبارة عن مخطط إطاري لنظام كمبيوتر توضيحي يمكن استخدامه مع نظام وطرق وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

الوصف التفصيلي:

يشير مصطلح "نسيج tissue" إلى مجموعة من الخلايا التي تتجمع معا كوحدة وظيفية functional unit. يمكن الوصول إلى أكثر من نمط واحد للخلايا في نسيج مفرد. يمكن أن تتكون الأنماط المختلفة من الأنسجة من أنماط مختلفة من الخلايا (على سبيل المثال، خلايا كبدية hepatocytes، خلايا حويصلات شعبية alveolar cells أو خلايا دم blood cells)، ولكن يمكن أن تناظر أيضًا أنسجة من الكائنات الحية المختلفة (الأم مقابل الجنين) أو خلايا صحية healthy cells مقابل خلايا ورمية tumor cells.

يشير مصطلح "عينة حيوية" إلى عينة يمكن أخذها من خاضع للعلاج (على سبيل المثال، بشر مثل امرأة حامل، شخص يعاني من سرطان، أو شخص مشتبه بإصابته بالسرطان، مستقبِل زراعة عضو organ transplant recipient أو خاضع للعلاج مشتبه بأنه يعاني من مرض يتضمن عضو (على سبيل المثال، القلب في احتشاء عضلة القلب myocardial infarction، أو الدماغ سكتة stroke، أو نظام تكوين دم hematopoietic system في الأنيميا anemia) وتحتوي على واحد أو أكثر من جزيئات الحمض النووي محل الاهتمام. يمكن أن تكون العينة الحيوية عبارة عن سائل بالجسم مثل الدم، البلازما، المصل serum، البول، السائل المهبلي vaginal fluid، سائل من قيلة hydrocele (على سبيل المثال قيلة الخصية testis)، سوائل شطف المهبل vaginal flushing fluids، سائل بلوري pleural fluid، سائل استسقائي ascitic fluid، سائل مخي شوكي cerebrospinal fluid، اللعاب saliva، العرق، الدموع، البلغم sputum، سائل غسل القصبات bronchoalveolar lavage fluid، سائل تفريغ discharge fluid من الحلمة nipple، سائل شطف aspiration fluid من أجزاء

مختلفة من الجسم (على سبيل المثال، درقية thyroid، صدر)، إلخ. يمكن استخدام عينات البراز أيضًا. في تجسيدات مختلفة، يمكن أن تكون غالبية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في عينة حيوية تم تخصيبها لحمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين خال من الخلايا (على سبيل المثال، عينة بلازما تم الحصول عليها عبر بروتوكول طرد مركزي centrifugation protocol) خالية من الخلايا، على سبيل المثال، يكون بصورة أكبر من 50٪، 60٪، 70٪، 80٪، 90٪، 95٪، أو 99٪ من الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خال من الخلايا. يمكن أن يتضمن بروتوكول الطرد المركزي، على سبيل المثال 3000 عجلة الجاذبية الأرضية × 10 دقائق، بما يؤدي للحصول على جزء من السائل، وإعادة الطرد المركزي عند، على سبيل المثال، 30000 عجلة جاذبية الأرضية أيضًا لأكثر من 10 دقائق لإزالة الخلايا المتبقية. يمكن اشتقاق الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خال من الخلايا في عينة من خلايا متنوعة الأنسجة cells of various tissues، وبالتالي يمكن أن تشتمل العينة خليطا من الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خال من الخلايا.

يمكن أن يشير مصطلح "حمض نووي" إلى ديوكسي ريبو نوكليوتيدات deoxyribonucleotides أو ريبو نوكليوتيدات ribonucleotides وبوليمرات منها في صورة مفردة أو مزدوجة الجديلة. يمكن أن يتضمن المصطلح أحماض نووية nucleic acids تحتوي على نظائر نوكليوتيد nucleotide analogs معروفة أو وحدات بنائية أو روابط سلسلة رئيسية معدلة، تخليقية، طبيعية، وغير طبيعية، تتسم بخصائص ربط مشابهة للحمض النووي المرجعي reference nucleic acid، والتي يتم تأيضها بطريقة مشابهة للنوكليوتيدات المرجعية reference nucleotides. يمكن أن تتضمن أمثلة لمثل تلك النظائر، بدون حصر، مركبات فوسفورو ثيوات phosphorothioates، فوسفور أميديت phosphoramidites، مركبات ميثيل فوسفونات methyl phosphonates، مركبات كيرال-ميثيل فوسفونات chiral-methyl phosphonates، مركبات 2-O-ميثيل ريبو نوكليوتيد 2-O-methyl ribonucleotides، ببتيد-أحماض نووية peptide-nucleic acids (PNAs).

ما لم يُنص خلاف ذلك، تتضمن متوالية حمض نووي معينة أيضًا بشكل غير مباشر صور متغيرة معدلة على نحو محافظ منها (على سبيل المثال، استبدالات رامز انحلالي degenerate codon substitutions) ومتواليات مكملة complementary sequences، فضلا عن المتوالية المشار إليها بشكل غير مباشر. على نحو محدد، يمكن تحقيق استبدالات رامز انحلالي عن طريق توليد متواليات يتم فيها استبدال الموضع الثالث لواحد أو أكثر من الروامز المختارة (أو كلها) بوحدات بنائية مختلطة

القاعدة و/أو ديوكسي إينوسين deoxyinosine (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). يتم استخدام مصطلح الحمض النووي بشكل متبادل مع الجين، حمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين المكمل complementary Deoxyribonucleic acid (cDNA)، حمض نووي ريبوزي رسول Ribonucleic acid Messenger(mRNA)، أوليجو نوكليوتيد oligonucleotide، وبولي نوكليوتيد polynucleotide.

يمكن فهم مصطلح "نوكليوتيد"، بالإضافة إلى أنه يشير إلى مونومرات ريبو نوكليوتيد ribonucleotide أو ديوكسي ريبو نوكليوتيد deoxyribonucleotide طبيعية، على أنه يشير إلى صور متغيرة بنائية ذات صلة منها، بما في ذلك مشتقات ونظائر، تكون مكافئة وظيفيًا بالنسبة للسياق المعين الذي يُستخدم فيه النوكليوتيد (على سبيل المثال، التهجين hybridization في قاعدة مكمّلة complementary base)، ما لم يشير السياق بوضوح خلاف ذلك.

يشير مصطلح "كونكاتيمير" إلى جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين مستمر مؤلف من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين منفصلة تم دمجها في الجزيء المفرد. يمكن أو لا يمكن أن تتضمن الصور المتنوعة لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المنفصلة للكونكاتيمير المتوالية نفسها. يمكن لبعض شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين على الأقل في كونكاتيمير أن تتضمن متواليات مختلفة. يمكن اشتقاق شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المنفصلة المستخدَمة لصنع الكونكاتيمير من أنسجة متنوعة توجد في عينة حيوية، على سبيل المثال، عندما تكون شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين عبارة عن شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خالية من الخلايا، كما يمكن أن يحدث في البلازما وخلائط الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الخالية من الخلايا الأخرى.

يشير مصطلح "قراءة متوالية" إلى سلسلة من نوكليوتيدات تم إنشاؤها من أي جزء أو كل من جزيء حمض نووي nucleic acid molecule. على سبيل المثال، يمكن أن تكون قراءة متوالية هي شظية الحمض النووي nucleic acid fragment الكاملة التي توجد في العينة الحيوية. يمكن الحصول على قراءة متوالية من إنشاء متوالية لجزيء مفرد. يشير مصطلح "إنشاء متوالية لجزيء مفرد" إلى إنشاء جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين مفرد القالب للحصول على قراءة متوالية بدون الحاجة إلى تفسير معلومات متوالية قاعدة من النسخ النسائلية clonal copies لجزيء الحمض

الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للقالب. يمكن أن تعمل تقنية إنشاء متواليات لجزيء مفرد على إنشاء الجزيء الكامل أو جزء من جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين فحسب. يمكن إنشاء غالبية جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، على سبيل المثال، بصورة أكبر من 50٪، 55٪، 60٪، 65٪، 70٪، 75٪، 80٪، 85٪، 90٪، 95٪، أو 99٪.

لإنشاء متواليات، يمكن أن يشير مصطلح "إشارة" إلى قياس يتم أخذه في لحظة معينة. تتضمن أمثلة تلك الإشارات إشارة بصرية optical signal أو إشارة كهربائية. يمكن أن توفر إشارة بصرية صورة تناظر لونًا معينًا يناظر قاعدة معينة، على سبيل المثال عند حدوث تهجين. يمكن لصورة مفردة أن تكون من مصفوفة من وسائل إنشاء المتواليات sequencing devices (على سبيل المثال، مسم نانوي أو حجم إنشاء متواليات آخر)، وبالتالي فإن الصورة المفردة يمكن أن تكون ذات عدة إشارات بصرية optical signals. يمكن أن تكون إشارة كهربائية قياسا عبر إلكترودات electrodes تم أخذه فورا في الوقت المناسب. يمكن أن توفر الإشارات الكهربائية لفترة زمنية واحدة أو أكثر من القواعد في متوالية لجزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن تشتمل الإشارة الكهربائية تيارًا current أو إشارة جهد voltage signal.

يشير مصطلح "مسم نانوي" إلى فتحة يمكن فيها وضع جزيء أو جزء من جزيء، حيث يمكن الكشف عن إشارة بناءً على واحدة أو أكثر من الخصائص لجزء من الجزيء في المسم النانوي. يمكن تكوين مسم نانوي من مواد مختلفة مثل بوليمرات، أو معادن، أو مواد أخرى في حالة صلبة، أو بروتينات، أو توليفات منها.

يشير مصطلح "تصنيف" إلى أي عدد أو خصائص أخرى ترتبط بخاصية معينة لعينة. على سبيل المثال، يمكن أن يشير مصطلح رمز "+" (أو الكلمة "موجب") إلى أنه يتم تصنيف عينة بأنها تتضمن صيغ حذف أو تضخيمات. يمكن أن يكون التصنيف ثنائيًا (على سبيل المثال، موجب أو سالب) أو يتضمن عدد أكبر من مستويات التصنيف (على سبيل المثال، مقياس من 1 إلى 10 أو من صفر إلى 1). يشير مصطلح "قطفة" و"قيمة حدية threshold" إلى عدد محدد سلفا يُستخدم في عملية. على سبيل المثال، يمكن لمصطلح قطفة أن يشير إلى حجم يتم بعده استبعاد الشظايا. يمكن أن تكون قيمة حدية عبارة عن قيمة يتم تطبيق تصنيف معين أعلاها أو أدناها. يمكن استخدام أي من هذين المصطلحين في أي من هذه السياقات.

يشير مصطلح "اختلال تضاعف العدد الكروموسومي" أو "اختلال تضاعف عدد الكروموسومات"،

طبقا لاستخدامه هنا، إلى تغيير في المقدار الكَمّي لكروموسوم عن چينوم ثنائي المجموعة الكروموسومية diploid genome. يمكن أن يكون التغيير عبارة عن كَسْب أو فَقْد. يمكن أن يتضمن كامل كروموسوم واحد أو منطقة من كروموسوم.

يشير مصطلح "اختلال توازن المتوالية sequence imbalance" أو "زيغ aberration"، طبقا لاستخدامه هنا، إلى انحراف ذي دلالة طبقا لتحديده بواسطة قيمة قطفة واحدة على الأقل بكمية من منطقة كروموسومية chromosomal region ذات صلة سريريًا من كمية مرجعية. يمكن أن يتضمن اختلال توازن المتوالية اختلالا في توازن جرعة الكروموسوم chromosome dosage، اختلالا في توازن الأليل allelic imbalance، اختلالا في توازن جرعة الطفرة mutation dosage، اختلالا في توازن عدد النسخ، اختلالا في توازن جرعة النمط الفردي haplotype dosage، واختلالات أخرى مشابهة في التوازن. على سبيل المثال، يمكن أن يحدث اختلال في توازن الأليلات عندما يتضمن ورم tumor أليلا لچين allele of gene تم حذفه أو أليلا لچين تم تضخيمه أو تضخيما تفريقيا لاثنين من الأليلات alleles في الچينوم genome الخاص بهما، وبالتالي تكوين اختلال في التوازن في موقع معين في العينة. هناك مثال آخر؛ يمكن لمريض أن يتضمن طفرة موروثة inherited mutation في چين كابت للورم tumor suppressor gene. يمكن عندئذ أن يتابع المريض طريقه ليُصاب بورم يتم فيه حذف الأليل غير الطافر non-mutated allele للچين الكابت للورم. بالتالي، في نطاق الورم، يوجد اختلال في توازن جرعة الطفرة. عندما يحرر الورم حمض ريبوزي نووي منزوع الأكسجين الخاص به في بلازما المريض، سيتم اختلاط الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الورم في الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين التكويني (من الخلايا الطبيعية normal cells) للمريض في البلازما. ومن خلال استخدام الطرق الموصوفة هنا، يمكن الكشف عن الاختلال في توازن الطفرة لخليط الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين هذا في البلازما. يمكن أن يتضمن أي زيغ صيغة حذف أو تضخم بمنطقة كروموسومية.

يشير مصطلح "منحنى الحجم" بصفة عامة إلى أحجام شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في عينة حيوية. يمكن لمنحنى الحجم أن يكون عبارة عن مخطط أنسجة يوفر توزيعا لمقدار شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين بمجموعة مختلفة من الأحجام. يمكن استخدام متغيرات إحصائية متنوعة (يُشار إليها أيضًا بمتغيرات الحجم أو متغير فحسب) لتمييز منحنى حجم عن آخر. يشير متغير واحد إلى النسبة المئوية لشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع

الأكسجين بحجم أو نطاق معين من الأحجام بالنسبة لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين كلها أو بالنسبة لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين بحجم أو نطاق آخر. يمكن للتجسيدات أن تحسن فعالية إنشاء متواليات لجزيء مفرد عند تطبيقها على شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خالية من الخلايا في عينة حيوية (على سبيل المثال، في بلازما أو مصل)، حيث تكون شظايا صغيرة نسبيًا مكونة من حوالي 200 قاعدة. نظرًا لأن شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خالية من الخلايا، مثل شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما، تكون صغيرة أو قصيرة، وعادة موجودة بتركيزات منخفضة في العينة الحيوية، يمكن أن لا يُتوقع استخدام مسم نانوي لإنشاء متواليات من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الخالية من الخلية لتوفير نتائج دقيقة. إن الشظايا الصغيرة التي تمر خلال مسم صغير تجعل إنشاء متواليات من شظية أمرًا صعبًا عندما تكون الشظية في المسم النانوي. بالإضافة إلى ذلك باستخدام شظية صغيرة، يمكن أن تكون محاذاة مع جينوم مرجعي reference genome أمرًا أكثر صعوبة بالنظر إلى الأخطاء المتوقعة في إنشاء متواليات. يمكن أن يشتمل إنشاء متواليات بمسم نانوي على أخطاء في إنشاء المتواليات تبلغ حوالي 10-15٪. في تجسيدات، يمكن تحسين الفعالية بواسطة تحويل شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين إلى كونكاتيمير لإنشاء جزيئات أطول يُراد إنشاؤها. في تجسيدات أخرى، يمكن تحسين الفعالية عن طريق زيادة تركيز شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في العينة.

بدون هذه التطورات، يمكن ألا يكون إنشاء متواليات لجزيء مفرد على الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما أمرًا عمليًا. بدون هذه الطرق، يمكن الكشف عن مجموعة من زيغ الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما عن طريق إنشاء متواليات لجزيء مفرد. يمكن تطبيق التجسيدات على عدة مجالات في الطب، بما في ذلك تشخيص ما قبل الولادة، تقييم السرطان، التعامل مع الأمراض الالتهابية inflammatory diseases، تقييم مرض مناعة ذاتية autoimmune disease، والعلاج الحاد acute medicine، مثل الصدمة الرَّضّية trauma. علاوة على ذلك، تم الإفادة بأنه يمكن تمييز سيتوكينات مُمَثْيَلة methylated cytosines من سيتوكينات غير مُمَثْيَلة unmethylated cytosines بواسطة إنشاء متواليات لجزيء مفرد (12). وقد أفدنا مسبقًا بأنه من خلال الكشف عن منحنى مثيلة methylation profile لحمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين في البلازما، نستطيع تحديد جزء من الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الجنيني، الكشف

عن الأمراض المرتبطة بالحوامل اللاتي يعانين من منحنى مثيلة مشيمي زائغ aberrant placental methylation profile، الكشف عن مثيلة زائغة aberrant methylation مرتبطة بالسرطان وحمامى الذئبة الجهازية systemic lupus erythematosus (7، 9، 11). بناء على ذلك، يمكن أيضًا استخدام التجسيدات في تطبيقات تكشف عن المثيلة.

1. إنشاء متواليات لجزيء مفرد من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين

إن الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما أو المصل يكون عبارة عن جزيئات حمض نووي خالية من الخلايا cell-free nucleic acid molecules في الدورة الدموية للمرضى البشر ويتم إطلاقها خلال عملية موت الخلايا، سواء كجزء من دوران طبيعي أو عمليات باثولوجية pathological processes. ونظرًا لأنه يتم إطلاق جزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في الدورة الدموية كجزء من عملية انحلال الخلايا cell degradation process، فإنها تدور في الدورة الدموية في صورة شظايا قصيرة (أقل من 200 زوج قاعدي) وتوجد عند تركيزات منخفضة. من المعروف أن غالبية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما في الخاضعين للعلاج الأصحاء تنشأ من خلايا دموية hematological cells (6).

أثناء الحمل، تساهم المشيمة placenta بجزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما إلى الدورة الدموية للأم وتوفر وسيلة للوصول إلى الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين جنيني لتشخيص قبل الولادة غير اختراقي non-invasive prenatal diagnosis (7). إن الأورام والسرطانات لها معدلات دوران خلايا cell turnover rates مرتفع وتساهم بالحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما حيث يمكن الكشف عن الشذوذ الكروموسومي والجيني بشكل غير اختراقي وتعمل كعينة حية سائلة لتشخيص السرطان، المراقبة، الفرز ، والتكهن بالمرض (8، 9). إن الحالات الالتهابية Inflammatory conditions، مثل احتشاء عضلة القلب، السكتة، التهاب الكبد hepatitis، وغيرها تؤدي أيضًا إلى زيادة إسهامات بالحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما من الأعضاء الملتهبة inflamed organs (10). ترتبط أمراض المناعة الذاتية Autoimmune diseases، مثل حمامى الذئبة الجهازية، أيضًا بشذوذ الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما (11). في الأمراض المذكورة أعلاه، يمكن أن يبين منحنى الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما صور متغيرة مفردة النوكليوتيد المرتبطة بالمرض، زيغ عدد نسخ الكروموسومات أو الكروموسومات الفرعية subchromosomal (كسب أو فقد عدد النسخ،

اختلال تضاعف عدد الكروموسومات)، المثيلة الزائغة (مثيلة فائقة hypermethylation أو مثيلة منخفضة hypomethylation) وشذوذ منحنى الحجم (الكميات الفائضة لجزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين القصيرة أو الكميات الفائضة لجزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الطويلة). بإيجاز، لقد أصبح تحليل الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الخال من الخلايا في الدورة الدموية وسيلة مهمة لتطوير الاختبارات التشخيصية الجزيئية لمجموعة واسعة من الأمراض.

إن إنشاء متواليات مفردة الجزيئات، غير الحصرية للتنسيق المصنَّع بواسطة Oxford Nanopore Technologies، منصة جذابة لتحليل إنشاء متواليات حمض الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين نظرًا لأن السرعة العالية التي يمكن بها تحديد كل قاعدة لحمض ريبوزي نووي منزوع الأكسجين. إن تدفق العمل لإنشاء مجموعة أمر بسيط نظرًا لأن لتجاوز خطوات التضخيم. فيمكن أن ينشئ متواليات لامتدادات متواصلة من الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، حتى مئات من الكيلو قاعدة. ومع ذلك، فإن مثل تلك المزايا غير قابلة للتطبيق بسهولة على تحليل الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما. أولا، جزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما عبارة عن شظايا قصيرة، في الغالب أقل من 200 زوج قاعدي من حيث الطول. إن تركيز الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما والمصل أقل بشكل كبير من ذلك الموجود في العينات الحية للأنسجة. بالتالي، عندما يتم تطبيق عينة الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما على وحدة إنشاء متواليات بالمسم النانوي nanopore sequencer، كانت فعالية إنشاء المتواليات منخفضة. بعبارة أخرى، كان الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في العينة مخففًا جدًا ووجد جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما طريقه بشكل غير منتظم جدًا نحو مسم نانوي. حتى عندما وجد جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما طريقه نحو مسم نانوي وتم إنشاء متواليات منه، نظرًا لطوله القصير، فإن معلومات إنشاء المتواليات وفرت كمية صغيرة جدًا فحسب من المعلومات بالنسبة للجينوم البشري. بلغ حجم الجينوم البشري ثنائي المجموعة الكروموسومية haploid human genome 3.3×10^9 قاعدة. علاوة على ذلك، سيتوقع المرء معدل خطأ إنشاء المتواليات باستخدام مسام نانوية لإنشاء متواليات من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين قصيرة أقل دقة حتى منه عند إنشاء متواليات من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين طويلة. بالتالي، لقد

استهدفنا تطوير طرق لزيادة تكرار أو فرص يمكن بها معالجة جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما بواسطة المسام النانوية ووسائل إنشاء متواليات sequencing devices لجزيء مفرد أخرى.

أ. إنشاء متواليات بمسم نانوي

إن إنشاء متواليات بمسم نانوي صورة من وحدة إنشاء متواليات لجزيء مفرد single molecule sequencer حيث يتم الكشف عن قواعد الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين من خلال استخدام المسام النانوية nanopores. تستخدم Oxford Nanopore Technologies مسام بروتينية protein pores، ألفا-هيموليسين alpha-hemolysin. يتم تصنيع مصفوفة من مثل تلك المسام للاستقرار على غشاء membrane (5). بالإضافة إلى مسام البروتين، يمكن أن يكون مسم نانوي عبارة عن مسم نانوي في حالة صلبة، حيث يتم تصنيع المسم النانوي في مادة شبه موصفة semiconductor materials، بما في ذلك مركبات سيليكون silicon compounds، مثل نيتريد سيليكون silicon nitride، وجرافين graphene. يمكن توصيل كل مسم بدارة كهربائية electrical circuit.

يبين الشكل 1أ مخططًا مبسطًا لمسم نانوي 102 وجزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين 104 وفقًا لتجسيدات التقنية الحالية. يمكن أن يحدد الإلكترود Electrode 106 والإلكترود 108 جزءً من المسم النانوي أو يوجد قرب المسم النانوي. يتم عرض الإلكترود 106 والإلكترود 108 بأنها تتضمن طرفا يمكن أن يكون بشكل مخروطي أو مثلثي. في بعض التجسيدات، يمكن أن تتخذ الإلكترودات شكلا مختلفا. على سبيل المثال، يمكن أن تتضمن الإلكترودات طرفا مسطحا flat end، طرفا نصف كروي hemispherical end، أو طرفا مستديرا rounded end. على سبيل المثال، يمكن أن يكون الإلكترودان بنفس الشكل. على سبيل المثال، يمكن لإلكترود أن يتضمن طرفا مخروطي الشكل conical end والآخر مسطحا. يمكن أن تكون المسافة بين الإلكترودين مساوية أو أقل من أو أكبر من قطر أو عرض المسم النانوي. يمكن توصيل الإلكترود 106 والإلكترود 108 بمصدر إمداد بالطاقة power source 110. يمكن أن ينتقل تيار 112 من إلكترود 106 إلى إلكترود 108. يمكن أن يكون مصدر الإمداد بالطاقة 110 على اتصال كهربائي بمجموعة من المسام النانوية وزوج مناظر من الإلكترودات.

عندما يمر جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين 104 خلال مسم نانوي 102، سيكون

هناك تغير في التيار، حيث يمكن قياسه بالمتر 114. إن قواعد الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المختلفة، بمعنى A، C، G، T ستحفز كمية مختلفة في تغير التيار. وبمراقبة جهد نمط التيار لكل مسام نانوي، يمكن تحديد متوالية جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين 104 الذي مر خلال مسم نانوي 102. نظرًا لأن إنشاء المتواليات أمر حساس بقدر كاف للكشف عن قواعد الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين على جزيء مفرد للحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، بمعنى أكثر تحديدًا لا يتطلب تضخيم مجموعات إنشاء المتواليات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، يتم تحسين سرعة الكشف عن المتواليات بشكل كبير.

ومع ذلك، هناك عيب هو أن دقة تحديد قواعد الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين يتسم بضعف نسبي عن تقنيات إنشاء المتواليات التي تكشف عن متواليات توافقية consensus sequences من النسائل المتضخمة amplified clones لكل جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، مثل إنشاء متواليات Illumina. مع ذلك، ثبت أن دقة الكشف عن القواعد تتحسن بشكل كبير عندما يتم تفسير قراءات 2D، (3). عند تحضير عينة الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين لإنشاء متواليات بمسم نانوي، يتم إضافة موائم دبوسي hairpin adaptor إلى طرف كل جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين مزدوج الجدائل. عندما يقترب مثل جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين من المسم النانوي، فإن الجديلة المزدوجة ستنفصل وسيمر إحدى طرفي جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين مفرد الجديلة خلال المسم النانوي عندما يمكن الكشف عن التغيرات في التيار. عندما يقترب إنشاء المتواليات من طرف هذا الطرف المفرد، فإن الجديلة المكملة المرتبطة بالدبوس ستستمر في المرور خلال المسم النانوي ويتم إنشاء متواليات لها. عندما يتم إنشاء متواليات لكلا جديلتي جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، يمكن اشتقاق متوالية توافقية وهو ما يُدعى قراءة 2D. طبقا لما هو وارد في المراجع، فإن قراءات 2D لها دقة تعيين قواعد أعلى من قراءات 1D (متواليات تم تفسيرها من جديلة مفردة فحسب).

ب. إنشاء متواليات لجزيء مفرد أخرى

يمكن أن تتضمن التجسيدات أيضًا تقنيات إنشاء متواليات لجزيء مفرد خلاف التقنيات التي تستخدم المسام النانوية. على سبيل المثال، باستخدام وحدة إنشاء متواليات لجزيء مفرد Helicos Helicos Single Molecule sequencer اختصارًا (SeqLL)، يمكن تهجين جزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين على سطح زجاج. يمكن عندئذ إضافة نوكليوتيد موسوم بمادة فلورية إلى كل

جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، ويمكن التقاط صورة. يمكن عندئذ شطر الجزيء الفلوري fluorescent molecule بعيدًا وغسله ويمكن إضافة نوكليوتيد آخر موسوم بمادة فلورية وتكرار العملية. يمكن أن يتضمن كل نوكليوتيد وسم متألق fluorescent-labeled nucleotide مختلف، بما يسمح بإنشاء متواليات لحمض ريبوزي نووي منزوع الأكسجين.

يمكن أن يتضمن مثال آخر طريقة إنشاء متواليات في الزمن الحقيقي مفردة الجزيئات single-molecule real-time لـ Pacific Biosciences اختصارًا (SMRT). في هذه الطريقة، يمكن تثبيت إنزيم بوليميراز polymerase enzyme الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين بقاع دليل موجة في الوضع صفر zero-mode waveguide (ZWM). يمكن عندئذ أن يلتقط البوليميراز جزيء مفرد للحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن بعد ذلك دمج نوكليوتيد موسوم بمادة فلورية في معقد الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين–إنزيم. يمكن عندئذ لكاشف أن يكشف عن الإشارة المتألقة fluorescent signal، ويمكن إجراء تعيين قاعدة. يمكن عندئذ شطر علامة التألق fluorescence tag ويمكن أن تنتشر خارج دليل موجة في الوضع صفر. يمكن تكرار العملية، بحيث أن كل نمط من النوكليوتيد يتضمن علامة متألقة مختلفة، بما يسمح بإنشاء متواليات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين.

2. زيادة الفعالية

لزيادة الفعالية، هناك خيار بتضخيم تجمع الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما لزيادة كمية المادة الوراثية genetic material في العينة في نطاق الحجم المتناه المراد تطبيقه على غرفة إنشاء المتواليات sequencing chamber أو خلية التدفق flow cell. مع ذلك، فإن استخدام مثل هذا البروتوكول سيعني أن المرء لم يعد يجري إنشاء متواليات لجزيء مفرد، حيث سيقوم المرء الآن بإنشاء متواليات قالب الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الأصلي وكل شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المستنسخة. إن مثل هذا الاستخدام لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المستنسخة سيتسبب في أخطاء عند محاولة الحصول على معلومات كمية حول شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الأصلية، على سبيل المثال، عدد نسخ شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الأصلية في منطقة جينومية genomic region معينة، مثل كروموسوم كامل.

في الاقسام التالية، يتم وصف طريقتين لزيادة الفعالية. في إحدى الطرق، يمكن تسلسل شظايا

الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين لتكوين كونكاتيمير قبل إجراء إنشاء متواليات مفردة الجزيئات. في طريقة أخرى، يتم تسلسل شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين بصورة عالية في عينة قبل إنشاء متواليات لجزيء مفرد (على سبيل المثال، قبل إنشاء متواليات بمسم نانوي).

أ. الكونكاتيميرات

في بعض التجسيدات، يمكن تحويل شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين (على سبيل المثال، شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما) إلى كونكاتيميرات، كما هو مبين في الشكل 1ب. يمكن لعملية التحويل إلى كونكاتيميرات concatemerization أن تربط سلسلة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين ببعضها بعضا. على سبيل المثال، يمكن أن توجد شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، 152، وشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، 154، في عينة. كإجراء أولي لربط الشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين ببعضها بعضا، يمكن تحضير أطراف شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين 152 وشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين 154 باستخدام مجموعة فوسفات phosphate group مضافة إلى الأطراف، بما يؤدي إلى شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين 156 وشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين 158. يمكن عندئذ ربط شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين معا بواسطة إنزيمات ليجاز ligase enzymes في ارتباط طرف خامل blunt-end ligation لتكوين جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين طويل. على سبيل المثال، كونكاتيمير 160. يمكن اعتبار الكونكاتيمير 160 جزيء جديد عبارة عن توليفة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين 152 و154. سيتضمن الكونكاتيمير 160 متوالية عبارة عن توليفة من المتواليات الفرعية المناظرة لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين 152 و154.

يبين الشكل 2 طريقة مشابهة لتكوين الكونكاتيميرات، باستخدام شظايا فاصلة spacer fragments (تُدعى أيضًا "شطور مباعدة spacers") بين شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن تخضع شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين 202 وشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين 204 لعملية "تذييل A"، حيث يمكن إضافة نوكليوتيد A بطرف لكل جديلة من شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، بما يكون شظية الحمض الريبوزي النووي

المنزوع الأكسجين 206 وشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين 208. يمكن لشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين فاصلة 210 أن تتضمن متوالية معروفة ذات نوكليوتيد T nucleotide T عند طرف كل جديلة لشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين فاصلة. يمكن أن تكون المتوالية المعروفة لشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الفاصلة بطول أقل من 20 زوج قاعدي، متضمنا من 4 إلى 10 أزواج قاعدة ومن 10 إلى 20 زوج قاعدي، بما لا يتضمن النوكليوتيدات A أو T المضافة على أطراف الشظايا الفاصلة. يمكن استخدام نوكليوتيدات مكملة complementary nucleotides أخرى أيضًا عند أطراف شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الفاصلة وشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما. يمكن عندئذ ربط شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الفاصلة 210 بشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين 206 وشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين 208 بواسطة إنزيمات ليجاز لتكوين جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين طويل مبين ككونكاتيمير 212. يمكن وضع شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين فاصلة بين اثنين من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين التي لا تُعد فواصل. على سبيل المثال، يمكن أن تكون شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين فاصلة بين شظيتي الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين مستخلصتين من العينة الحيوية. يمكن أن تتضمن الكونكاتيمير 212 متوالية عبارة عن توليفة من المتواليات المناظرة لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين 206 و208 جنبا إلى جنب مع واحدة أو أكثر من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الفاصلة 210.

في بعض التجسيدات، يمكن أن تدل الشظايا الفاصلة على طرف شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين وبداية شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين أخرى، على سبيل المثال، عندما لا تظهر المتوالية المعروفة للشظايا الفاصلة في چينوم مرجعي مناظر للخاضع للعلاج (على سبيل المثال، چينوم بشري) أو تظهر أقل من عدد معين من المرات (على سبيل المثال، أقل من 2 أو 3). يمكن لنظام كمبيوتر أن يحدد متوالية لشظية مباعدة spacer fragment عن طريق مقارنة متواليات فرعية بمجموعة متوقعة لواحد أو أكثر من المتواليات المعروفة المستخدمة للشظايا الفاصلة. في بعض الاستخدامات، يمكن أن تكون الشظايا الفاصلة عبارة عن توليفة A-T عند موضع مفرد. في بعض الاستخدامات، يمكن أن يكون استخدام A وT بشكل رئيسي للارتباط على النقيض

من أي تحديد لوقت بدء ونهاية الشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين.

يمكن أن تتضمن الطرق ذات شطر مباعدة تحديد قاعدة بدء لمتوالية فرعية مناظرة لشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للعينة الحيوية. يمكن أن يستند تحديد قاعدة البدء على تحديد واحدة من المتواليات المعروفة لشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الفاصلة. يمكن تحديد طرف المتوالية الفرعية بناءً على تحديد أحد المتواليات المعروفة لشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الفاصلة بعد المتوالية الفرعية.

باتباع هذه الطرق، عندما يبلغ الجزيء الكبير (الكونكاتيمير) مسم نانوي، يمكن إنشاء متواليات لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين عديدة في البلازما نظرًا لأن الكونكاتيمير يمكن أن يتضمن عدة شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما في جزيء طويل مفرد. نظرًا جزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما يمكن أن تكون مزدوجة الجديلة بصورة طبيعية، يمكن وضع موائم دبوسي عند طرف الكونكاتيمير بحيث يمكن إنشاء قراءات 2D، بمعنى أكثر تحديدًا يتم قراءة الجديلتين. بعد إنشاء الجدائل، يمكن تحديد الوحدات الأصلية لجزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما التي تم دمجها في الكونكاتيمير. إن خلق جزيء طويل من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين عديدة وإنشاء متواليات من الجزيء الطويل في المسم النانوي يوفر فعالية أكبر من الانتظار لتحرك نفس الجزيئات العديدة بشكل منفصل في المسام النانوية ليتم إنشاء متواليات لها.

1. الاستخدام في إنشاء متواليات لجزيء مفرد

يبين الشكل 3أ مخطط تدفق إطاري مبسط لطريقة 300 لإنشاء متواليات لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين عن طريق تحويل شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين إلى كونكاتيمير واستخدام إنشاء متواليات لجزيء مفرد وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

عند الإطار 302، يمكن لطريقة 300 أن تشتمل على استقبال مجموعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن تكون مجموعة شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين عبارة عن شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خالية من الخلايا من عينة حيوية. يمكن أن تكون العينة الحيوية عبارة عن بلازما أو مصل. يمكن أن يتم فصل شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين من مكونات أخرى للعينة الحيوية، على سبيل المثال، بينما يتم فصل البلازما من مكونات أخرى من الدم. يمكن أن تكون شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين

أي شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين موصوفة هنا.

عند الإطار 304، يمكن لطريقة 300 أن تشتمل على تحويل مجموعة أولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للحصول على كونكاتيمير أول. يمكن أن تكون عملية التحويل إلى كونكاتيمير أي طريقة موصوفة هنا. يمكن أن يشتمل الكونكاتيمير الأول على شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خلاف المجموعة الأولى. بالتالي، يمكن أن لا تتضمن المجموعة الأولى لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين كل من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين التي تكوّن الكونكاتيمير الأول. يمكن أن تتضمن شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين أخرى في الكونكاتيمير الأول شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين فاصلة.

يبين الإطار 306 أن الطريقة 300 يمكن أن تتضمن أيضًا إنشاء متواليات لجزيء مفرد للكونكاتيمير الأول للحصول على متوالية أولى للكونكاتيمير الأول. يمكن أن يتضمن إنشاء متواليات لجزيء مفرد إنشاء متواليات بمسم نانوي. يمكن توفير الكونكاتيمير الأول إلى وسيلة إنشاء متواليات كجزء من إجراء عملية إنشاء متواليات لجزيء مفرد. يمكن أن تكون وسيلة إنشاء المتواليات عبارة عن وسيلة مسم نانوي، دليل موجي بصري، خلية تدفق مهيأة بحيث يتهجن الكونكاتيمير في خلية التدفق، أو أي خلية تفاعل reaction cell أو موقع يحدث فيه الكشف عن متواليات لجزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين مفرد. يمكن أن يتضمن مثال لخلية تدفق خلية تدفق ذات أوليجو نوكليوتيد ملتصق بسطح خلية التدفق، حيث يمكن أن تتهجن الأوليجونوكليوتيدات oligonucleotides مع الكونكاتيمير الأول. يمكن أن تتضمن الطريقة 300 الكشف، استخدام وسيلة إنشاء المتواليات، مجموعة من الإشارات المناظرة للكونكاتيمير الأول. يمكن لمجموعة الإشارات أن تناظر المتوالية الأولى للكونكاتيمير الأول. يمكن أن تتضمن الإشارات إشارات من الوسوم المتألقة fluorescent labels أو الوسوم الأخرى بإشارات قابلة للكشف بصريا مرتبطة بالكونكاتيمير الأول. يمكن الكشف عن الإشارات الآتية من الوسوم المتألقة بواسطة كواشف بصرية optical detectors، أشعة ليزر lasers، وسائل مقترنة بالشحنة charge-coupled devices، أدلة موجية في وضع صفر zero-mode waveguides، وسائل حساسة بصريا optically sensitive devices أخرى يمكنها تحديد وجود أو غياب حدث بصري، أو توليفة منها.

2. الكشف عن الإشارات الكهربائية في مسام نانوية

يبين الشكل 3ب مخطط سير عمليات إطاري مبسط لطريقة 350 لإنشاء متواليات لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين باستخدام إنشاء متواليات بمسم نانوي وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي. في الطريقة 350، تكون وسيلة إنشاء المتواليات عبارة عن مسم نانوي، يمكن أن يوجد في مصفوفة من المسام النانوية على ركيزة. يمكن إجراء سمات طريقة 350 عند تنفيذ الطريقة 300.

عند الإطار 352، يمكن أن تتضمن الطريقة 350 استقبال مجموعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن تكون مجموعة الشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين عبارة عن شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خالية من الخلايا من عينة حيوية. يمكن أن تكون العينة الحيوية عبارة عن بلازما أو مصل. يمكن فصل شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين من مكونات أخرى من العينة الحيوية، على سبيل المثال، يتم فصل البلازما من مكونات أخرى من الدم.

يمكن فصل شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين عند حاوية تُستخدم للتحويل إلى كونكاتيمير. يمكن أن تكون الحاوية عبارة عن قارورة أو أنبوب، مثل أنبوب إبندورف. يمكن أن يتم خلط شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في الحاوية مع إنزيمات ليجاز ومحاليل منظمة buffers.

يبين الإطار 354 أن الطريقة 350 يمكن أن تتضمن أيضًا تحويل مجموعة أولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للحصول على كونكاتيمير أول. يمكن أن تكون عملية التحويل إلى كونكاتيمير أي طريقة موصوفة هنا. يمكن أن يتضمن الكونكاتيمير الأول شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين أخرى خلاف المجموعة الأولى. لذا، يمكن أن لا تتضمن المجموعة الأولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين كل من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين التي تكوّن الكونكاتيمير الأول.

يمكن إجراء عمليات تحويل عديدة إلى كونكاتيمير بالتوازي، حيث تشكّل كل عملية كونكاتيميرًا منفصلًا. يمكن أن تكون الكونكاتيميرات المتنوعة بأطوال مختلفة، على سبيل المثال، نظرًا لأنه يمكن أن تكون شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المختلفة بأطوال مختلفة ولأنه يمكن دمج أعداد متنوعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في كونكاتيمير. على سبيل المثال، يمكن أن يتكون كونكاتيمير واحد من 3 شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين ويمكن أن يتكون كونكاتيمير آخر من 100 شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين.

في الإطار 356، يمكن أن تشتمل الطريقة 350 أيضًا على تمرير الكونكاتيمير الأول خلال مسم نانوي أول. يمكن أن يكون المسم النانوي الأول واحدا من مجموعة من المسام النانوية على ركيزة. يمكن أن تشتمل خطوة تمرير الكونكاتيمير الأول خلال مسم نانوي أول على تمرير جديلة أولى من الكونكاتيمير الأول خلال المسم النانوي. بعد أن تمر الجديلة الأولى خلال المسم النانوي، يمكن أن تمر الجديلة الثانية للكونكاتيمير الأول خلال المسم النانوي. يمكن توصيل الجديلة الأولى والثانية بموائم دبوسي. بهذه الطريقة، يمكن إنشاء متواليات لكلا الجديلتين، حيث يمكن أن توفرا دقة أكبر وتعيين للقواعد. يمكن مقارنة الإشارات الكهربائية لكلا الجديلتين كجزء من تعيين القواعد.

في الإطار 358، يمكن عندئذ الكشف عن الإشارات الكهربائية الأولى بينما يمر الكونكاتيمير خلال المسم النانوي الأول. يمكن أن تناظر الإشارات الكهربائية الأولى متوالية أولى للكونكاتيمير الأول. يمكن أن تتضمن الإشارات الكهربائية الأولى تيارا أو جهدا. في غياب الكونكاتيمير الأول الذي يمر خلال المسم النانوي الأول، يمكن أن يمر تيار أيوني بين الإلكترودات. عندما يمر جزيء حيوي biomolecule، مثل كوناكتيمير ، بين الإلكترودات، يمكن أن يؤثر الجزيء الحيوي في مرور الأيونات أو الإلكترونات بين الإلكترودات. يمكن أن يقل التيار أو الجهد، نتيجة لذلك. يمكن أن يرتبط كم التغير بجزء الجزيء الحيوي بين الإلكترودات. على سبيل المثال، يمكن أن يتضمن التيار أو الجهد توقيع إشارة كهربائية معينة عندما يمر نوكليوتيد معين أو مجموعة وظيفية بين الإلكترودات.

في بعض التجسيدات، يمكن أن يكون المسم النانوي جزءً من دارة كهربائية تشتمل على إلكترودين. يمكن أن يتباين التيار بين الإلكترودين بناء على أي نوكليوتيد (قاعدة) أو علامة مناظرة موجودة بين المسم النانوي. يمكن أن يتم الكشف عن الإشارات الكهربائية الأولى باستخدام أي تقنية مناسبة لقياس الجهد أو التيار في دارة.

في الإطار 360، يمكن أن تشتمل الطريقة 350 تحليل الإشارات الكهربائية الأولى لتحديد المتوالية الأولى. يمكن أن يشتمل التحليل على مقارنة نمط للإشارات الكهربائية على أنماط معروفة تناظر قواعد معينة. يمكن ان يتضمن تعيين القواعد للمسام النانوية استخدام نماذج مختلفة، بما في ذلك نماذج ماركوف مخفية، طبقا لما هو مناقش في المرجع Schreiber J. و Karplus K., "Analysis of nanopore data using hidden Markov models," Bioinformatics 2015 31:1897-1903، والذي يتم تضمينه هنا بالكامل كمرجع لجميع الأغراض. يمكن أن يتضمن التحليل إجراء تحليل، بواسطة كمبيوتر، للإشارات الكهربائية الأولى للجديلة الأولى والثانية لتحديد المتوالية الأولى. على سبيل

المثال، يمكن تحديد متوالية للجديلة الأولى والثانية، ويمكن مقارنة المتواليتين ببعضهما بعضا. يجب أن تكون المتواليات مكملة. يمكن أن يتم تجاهل الأوضاع غير المكملة، على سبيل المثال، أو إعادة تحليلها.

في بعض التجسيدات، يمكن استخدام تحليل الإشارات الكهربائية الأولى لتحديد تصنيف مثيلة لمواقع مختلفة للكونكاتيمير الأول، على سبيل المثال، مواقع CpG. يمكن أن يتضمن تصنيف المثيلة ما إذا تم مثيلة قاعدة، سواء كانت مثيلة زائغة (فرط مثيلة أو نقص مثيلة) موجودة (على سبيل المثال، ما إذا كانت منطقة، مثل جزيرة CpG، تتضمن مثيلة زائغ)، وما إذا تم معالجة الكونكاتيمير بهيدروكسيل ميثيل hydroxyl methylated.

في الإطار 362، يمكن أن تتضمن الطريقة 350 محاذاة متواليات فرعية للمتوالية الأولى لتحديد متواليات شظايا مناظرة لكل من المجموعة الأولى لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن تكون المتواليات الفرعية أي مجموعة من القواعد المتماسة contiguous bases في المتوالية الأولى، على سبيل المثال، كما هو محدد بواسطة نوافذ الانزلاق sliding windows. يمكن إجراء محاذاة بچينوم مرجعي، حيث يمكن أن تسمح بسوء مطابقات في الچينوم بالچينوم المرجعي. يتم وصف سوء محاذاة المتواليات الفرعية بمزيد من التفاصيل أدناه.

يمكن إجراء كونكاتيمير لمجموعة ثانية من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للحصول على كونكاتيمير ثاني، فضلا عن مجموعات أخرى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للحصول على كونكاتيميرات أخرى. يمكن لكل من الكونكاتيميرات أن تتضمن توليفة أو طفرة أولية من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين تختلف عن الكونكاتيميرات الأخرى. يمكن تمرير كل من الكونكاتيميرات خلال المسم النانوي الأول أو المسام النانوية الأخرى لمجموعة من المسام النانوية التي يمكن أن تشتمل على وسيلة إنشاء متواليات. يمكن الحصول على إشارات كهربائية أخرى بينما يمر كل من الكونكاتيميرات خلال مسم نانوي. يمكن أن تناظر الإشارات الكهربائية الأخرى متواليات مناظرة للكونكاتيميرات الأخرى. يمكن أن تكون التفاصيل التي تتضمن الكونكاتيميرات الأخرى مشابهة للطرق التي تتضمن الكونكاتيمير الأول.

يمكن أيضًا أن تتضمن الطريقة 350 تحديد حجم لكل من المجموعة الأولى لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للكونكاتيمير الأول. يمكن أيضًا تحديد أحجام شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للمجموعات الأخرى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين

للكونكاتيميرات الأخرى. على سبيل المثال، يمكن تحديد حجم شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين بمحاذاة المتواليات الفرعية مع چينوم مرجعي أو متواليات فاصلة spacer sequences معروفة. على سبيل المثال، إذا كان يمكن تحديد متواليات فاصلة، فيمكن تحديد طول شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين كعدد القواعد بين متواليتين فاصلتين. في مثل تلك التجسيدات، التي تستخدم متوالية فاصلة، لا توجد حاجة لمحاذاة المتواليات المحددة لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين مع چينوم مرجعي لتحديدها، حيث يمكن أن توفر المتواليات الفاصلة مثل تلك المعلومات. علاوة على ذلك، يمكن تجميع متواليات شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، بعد أو بدلًا من محاذاة چينوم مرجعي. عند محاذاة الچينوم المرجعي، يمكن أن يتضمن تحديد حجم شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين تحديد طول المتوالية الفرعية الأطول التي تحاذي منطقة واحدة من الچينوم المرجعي.

3. محاذاة متواليات فرعية

كما هو مبين في الشكل 4، يمكن أن تتضمن تجسيدات طريقة 400 تم إجراؤها بواسطة نظام كمبيوتر. يبين الشكل 4 مخطط عمليات إطاري مبسط لطريقة تحليل متوالية كونكاتيمير وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي.

في الإطار 402، يمكن أن تتضمن الطريقة 400 استقبال متوالية أولى لكونكاتيمير أول يولَّد بواسطة تحويل مجموعة أولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. في بعض التجسيدات، يمكن توليد الكونكاتيمير الأول بواسطة تحويل المجموعة الأولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين والمجموعة الثانية من العدد الوافر من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين إلى كونكاتيميرات. يمكن استقبال المتوالية الأولى من خطوة تعيين قواعد التي يمكن أن توجد على وسيلة إنشاء متواليات التي يمكن أن توجد على نظام الكمبيوتر أيضًا. وكمثال آخر، يمكن أن يكون نظام الكمبيوتر منفصلًا عن وسيلة إنشاء المتواليات ويمكن استقبال المتوالية الأولى على وصلة شبكية network connection أو عبر وسيلة ذاكرة memory device قابلة للإزالة. يمكن أن يكون الكونكاتيمير عبارة عن أي كونكاتيمير، على سبيل المثال، طبقا لما هو مبين هنا.

في الإطار 404، يمكن أيضًا أن تتضمن طريقة 400 محاذاة متواليات فرعية للمتوالية الأولى لتحديد متواليات شظية مناظرة لكل شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للمجموعة الأولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. في بعض التجسيدات، يمكن أن تتضمن محاذاة

متواليات فرعية محاذاة متواليات فرعية للمجموعة الثانية من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن تكون المجموعة الثانية من العدد الوافر من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين عبارة عن الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين فاصلة، طبقا لما هو مبين هنا. يمكن أن تكون الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الفاصلة عبارة عن متوالية، طولها أقل من أو يساوي 20 نوكليوتيد، بما في ذلك من 15 إلى 20، و10 إلى 15، و5 إلى 10 نوكليوتيد. في بعض التجسيدات، يمكن أن تتضمن الطريقة 400 محاذاة متواليات فرعية للمتوالية الأولى بچينوم مرجعي. يمكن أن يكون الچينوم المرجعي عبارة عن الچينوم البشري. لتحديد الوحدات الأصلية لجزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما، يمكن أن تحاذي النماذج متواليات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الطويلة الچينوم البشري على الفجوات. على سبيل المثال، يمكن اختيار نافذة منزلقة sliding window (على سبيل المثال، بطول 100–300) من المتوالية الطويلة للكونكاتيمير ، يمكن محاذاة متوالية النافذة (المتوالية الفرعية) بچينوم مرجعي. يمكن أن يكون الچينوم المرجعي مشتقا من چينوم بشري مرجعي، ولكن غير مقيد بمجموعة فرعية لمتواليات الچينوم البشري، چينوم مخفي بتكرار repeat-masked genome، الإكسوم exome، أو جزء من الچينوم ذي محتوى جى سى GC متوازن أو معتدل.

يمكن أن تكون النافذة (منزلقة) للأمام أو العكس بمقدار أقل من طول النافذة (على سبيل المثال، 20–50 قاعدة). يمكن اعتبار النافذة في موضعها الجديد بمثابة نافذة ثانية. يمكن أيضًا محاذاة المتوالية الفرعية للنافذة الثانية هذه بالچينوم المرجعي. إذا تم محاذاة المتوالية الفرعية للنافذة الثانية بمتوالية فرعية للچينوم المرجعي التي تتراكب مع متوالية فرعية سابقة للچينوم المرجعي، فيمكن اعتبار المتواليتين الفرعيتين جزءً من نفس شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. إذا تحاذت نافذتان منزلقتان بمناطق مختلفة، غير متجاورة أو غير متراكبة للچينوم المرجعي، يمكن تمييز متواليات شظيتي الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين.

إذا لم تتحاذى المتوالية الفرعية بالچينوم، ولكن متوالية فرعية قبله أو بعده، فيمكن تحديد التقاطع (الحافة) بين شظيتي الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن تحليل المناطق التي يمكن محاذاة شظيتي الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين بها لتحديد النقطة المحددة للتقاطع (على سبيل المثال، قاعدة بدء شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين وقاعدة نهاية شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الأخرى). يمكن أن يكون مثل هذا التقاطع هو نهاية أو

بدء متوالية فرعية لشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن تكون هذه الطريقة مفيدة بشكل محدد عندما لا يتم استخدام شطور مباعدة spacers في إنشاء كونكاتيميرات. في تجسيدات أخرى، يمكن إضافة متواليات محددة (على سبيل المثال، شفرات عمودية barcodes معينة أو شطور مباعدة معينة) إلى طرف الجزيئات الأصلية، ويمكن أن تدل المتواليات المحددة تلك على نهاية جزيء وبداية آخر.

بناء على ذلك، يمكن أن تجد النماذج تمددات أو أجزاء لقواعد الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين (تصل بصفة عامة حتى مئات من القواعد من حيث الطول) تخص مناطق مختلفة على الچينوم البشري. يمكن أن يمثل كل تمدد أو جزء متصل من قواعد الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين أصلي واحد في البلازما. إن التمددات أو الأجزاء المتجاورة من الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين التي تحاذت مع الأجزاء البعيدة المختلفة للچينوم البشري يمكن أن تنتمي إلى جزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين أخرى في البلازما تم تجميعها في الكونكاتيمير.

يتم تحريك أو انزلاق حجم النافذة وحجم خطوة النافذة بناء على دقة وضوح مرغوبة لحجم شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن يزيد حجم خطوة أصغر من دقة وضوح الحجم المحدد لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين بينما بيزيد من شدة الحوسبة. من الممكن أن يتعرف حجم نافذة أكبر على شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين أصغر من حجم النافذة بينما قد لا يؤدي حجم نافذة أصغر إلى محاذاة فريدة بالچينوم.

يمكن تعديل حجم النافذة وحجم الخطوة ديناميكيا. على سبيل المثال، يمكن استخدام حجم خطوة كبير لتضييق المناطق السفلية للتطابقات المحتملة ثم يمكن تقليل حجم الخطوة لتحديد التطابقات بشكل أكثر دقة. يمكن أن تتم محاذاة المتوالية الفرعية بكروموسوم أو منطقة كروموسومية بالچينوم المرجعي. يمكن أن تتضمن محاذاة المتوالية الفرعية السماح بعدد أو تكرار من سوء التطابق لتفسير خطأ إنشاء المتواليات. على سبيل المثال، يمكن أن تسمح محاذاة المتوالية بما يقل عن أو يساوي 10-15٪ من سوء التطابق.

طبقا لما هو مبين هنا، كانت هذه الطريقة فعالة في إنشاء متواليات لجزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما، بما يحدد الكروموسومات البشرية، يكشف عن الفروق التناسبية بين محتوى نوكليوتيد لكل كروموسوم وتحديد منحنى حجم عينة الحمض الريبوزي النووي المنزوع

الأكسجين الأصلية في البلازما قبل التحويل إلى كونكاتيمير. يمكن أن تتضمن الكونكاتيميرات شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين من الچينوم بالكامل. يمكن أن يتم توزيع شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في الكونكاتيمير عشوائيا من كل الكروموسومات أو جميعها تقريبًا.

ب. التركيز الزائد

يمكن أن يتضمن تجسيد آخر زيادة تركيز مجموعات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما المحملة على غرفة العينات sample chamber لخلية التدفق. لن يكون من المتوقع عادة أن يعمل التركيز الزائد للحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما على زيادة فعالية إنشاء متواليات بمسم نانوي. إن المسام النانوية تتضمن أخطاء إنشاء متواليات عالية نسبيا، وبالنظر إلى شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الصغيرة لتحليلها من البلازما والعينات الخالية من الخلايا الأخرى فضلا عن تركيز الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المنخفض في مثل تلك العينات الخالية من الخلايا cell-free samples، لن يكون من المتوقع أن تقوم المسام النانوية بإنشاء متواليات للشظايا بفعالية. ليس من المتوقع أن يعالج التركيز الزائد لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين هذه المسألة. وبرغم ذلك، يتم تحسين فرصة جزيء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في بلوغ مسم نانوي أو تقنية تحليل جزيء مفرد أخرى عن طريق تركيز الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المستخلص أو مجموعة إنشاء متواليات بمدخلات. إن تركيز الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المستخلَص يتضمن تركيز يتجاوز المستوى المطلوب للحصول على جم متوافق مع تقنية إنشاء متواليات. في بعض الحالات، يمكن أن يزيد تركيز الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المستخلَص بأكثر من 10 أضعاف. بعبارة أخرى، يمكن أن يتم تقليل الحجم إلى أقل من 10٪ من الأصل.

الشكل 5 عبارة عن مخط سير عمليات إطاري مبسط لطريقة 500 لإنشاء متواليات لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين أكثر فعالية عن طريق زيادة تركيز شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين عدة مرات وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي. يمكن استخدام الطريقة 500 لمنصات عديدة لإنشاء متواليات لجزيء مفرد. في المثال المتوفر، يتم وصف منصة إنشاء متواليات مسم نانوي.

في الإطار 502، يمكن أن تتضمن الطريقة 500 استقبال عينة حيوية تتضمن مجموعة من شظايا

الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن تتضمن العينة الحيوية تركيزًا أول من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في حجم بدء. يمكن أن تكون العينة الحيوية بأنماط متنوعة، على سبيل المثال، طبقا لما هو مبين هنا. على سبيل المثال، يمكن أن تكون العينة الحيوية بلازما أو مصل.

في الإطار 504، يمكن أن تتضمن الطريقة 500 أيضًا تركيز العينة الحيوية لتتضمن تركيزًا ثانيًا من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. كأمثلة متنوعة، يمكن أن يكون التركيز الثاني لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خمس مرات أو أكثر، 6 مرات أو أكثر، 7 مرات أو أكثر، 8 مرات أو أكثر، 9 مرات أو أكثر، 10 مرات أو أكثر، 50 مرة أو أكثر، 100 مرة أو أكثر، 500 مرة أو أكثر، أو 1000 مرة أو أكثر من تركيز شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن قياس التركيز لكل حجم أو كتلة.

يمكن إكمال التركيز بطرق متنوعة، كما سيُدرك بواسطة المهرة في المجال. على سبيل المثال، يمكن أن يكون تركيز العينة الحيوية عن طريق التجفيف بالتفريغ، عن طريق إزالة السائل بواسطة النز seepage أو الترشيح، أو بتقنيات تركيز أخرى معروفة للمهرة في المجال. يمكن مزج الترشيح أو النز بالطرد المركزي وإجبار السائل خلال مرشح حجمي size filter أو منخل جزيئي molecular sieve. هناك غشاء شبه منفذ semi-permeable membrane يمكن أن يسمح بتدفق سائل في اتجاه واحد يمكن استخدامه في التركيز. يمكن أن يتم تقليل حجم العينة الحيوية بعد التركيز بتناسب عكسي مع الزيادة في التركيز. على سبيل المثال، إذا تم زيادة التركيز بواسطة معامل 5، يمكن تقليل الحجم بمعامل 5.

يمكن أن يزيد التركيز بشكل كبير عنه في عمليات تقليدية. في بعض العمليات التقليدية، يتم استخلاص حجم أصغر من الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين بلازما من حجم بلازما. لتقليل الحجم لتلبية حجم تفاعل أو متطلبات أخرى في أداة تحليلية analytical instrument، يمكن تركيز الحجم أيضًا. على سبيل المثال، في عملية تقليدية يمكن استخلاص 210 ميكرو لتر من الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما من 4 ملليلتر من البلازما. يمكن تركيز 210 ميكرو لتر من الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما إلى 85 ميكرو لتر من أجل توفير إجمالي حجم تفاعل يبلغ 100 ميكرو لتر. ومع العملية التقليدية، تبلغ الزيادة في التركيز أقل من معامل 3، ولا يتم تركيز الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما لتحسين

دقة إنشاء المتواليات. في الطرق الحالية، يمكن أن يؤدي التركيز الزائد إلى مزيد من التمرير المتكرر لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خلال المسام النانوية أو وسائل إنشاء متواليات أخرى وبالتالي الكشف والتحليل المحسن.

في الإطار 506، يمكن أيضًا أن تتضمن الطريقة 500 تمرير مجموعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين من خلال مسام نانوية على ركيزة. في بعض التجسيدات، يمكن أن تتضمن الطريقة تقنية إنشاء متواليات لجزيء مفرد خلاف المسام النانوية. على سبيل المثال، يمكن أن تتضمن تقنية إنشاء المتواليات تقنية الزمن الحقيقي مفردة الجزيئات بواسطة شركة Pacific Biosciences أو Helicos عن طريق وحدة إنشاء متواليات لجزيء مفرد Helicos. يمكن أن تتضمن تقنيات إنشاء متواليات لجزيء مفرد التقنيات الموصوفة في المرجع Eid J. et al, "Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules," Science 2009 323:133-138، الذي يتم تضمين محتوياته هنا كمرجع لجميع الأغراض.

في الإطار 508، بالنسبة لكل من مجموعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، يمكن الكشف عن إشارات كهربائية بينما تمر شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خلال مسم نانوي. يمكن أن تناظر الإشارات الكهربائية متوالية أو متوالية فرعية لشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن تتضمن الإشارات الكهربائية تيارا أو جهدا أو أي إشارة كهربائية موصوفة هنا. عندما يتم استخدام تقنيات إنشاء المتواليات، يمكن استخدام إشارات فلورية fluorescent signals بدلًا من الإشارات الكهربائية.

في الإطار 510، يمكن أن تتضمن الطريقة 500 تحليل الإشارات الكهربائية لتحديد متوالية أو متوالية فرعية من شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. يمكن أن تتضمن الطريقة 500 تحديد حجم شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين وأحجام مجموعة من الشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، على سبيل المثال باستخدام معلومات المحاذاة. نتيجة لذلك، يمكن أيضًا تحديد توزيع حجم شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. بناء على توزيع الحجم لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، يمكن أيضًا تحديد فروق الكروموسوم، على سبيل المثال، طبقا لما هو موصوف في الطلب الأمريكي رقم 940.992/12 بعنوان "Size-based genomics" المودع بتاريخ 5 نوفمبر لعام 2010؛ الطلب الأمريكي رقم 308.473/13 بعنوان "Detection of genetic or molecular aberrations associated with cancer" المودع بتاريخ

30 نوفمبر لعام 2011؛ الطلب الأمريكي رقم 789.553/13 بعنوان "Size-based analysis of fetal DNA fraction in maternal plasma" المودع بتاريخ 7 مارس لعام 2013.

في بعض التجسيدات، يمكن أن تناظر الإشارات الكهربائية تصنيف مثيلة للكونكاتيمير الأول. يمكن أن يتضمن تصنيف المثيلة ما إذا كان يتم مثيلة قاعدة، سواء كانت هناك مثيلة زائغة (مثيلة مفرطة أو ناقصة)، وسواء تم معالجة الكونكاتيمير بهيدروكسيل ميثيل.

يمكن أن تتضمن الطرق محاذاة المتواليات أو المتواليات الفرعية لشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين بچينوم مرجعي. بشكل محدد، يمكن أن تكون المحاذاة عبارة عن كروموسوم محدد أو منطقة كروموسومية للچينوم المرجعي.

يمكن أن تمر نفس شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين من خلال نفس المسم النانوي عدة مرات. ومع كل مرور، يمكن الكشف عن الإشارات الكهربائية. يمكن مقارنة الإشارات الكهربائية من المسارات المختلفة من أجل المساعدة في تحديد المتوالية. يمكن استخدام زيادة تركيز شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين باستخدام تقنيات إنشاء متواليات لجزيء مفرد خلال المسام النانوية.

3. أمثلة لاستخدام التركيز الزائد

تبين الأمثلة أنه يمكن تركيز حمض ريبوزي نووي منزوع الأكسجين في البلازما لزيادة فعالية إنشاء متواليات مسم نانوي بينما يتم توفير نتائج دقيقة. يتم أيضًا وصف إنشاء متواليات باستخدام تركيزات زائدة في المرجع Cheng S. H. et al., "Noninvasive prenatal testing by nanopore sequencing of maternal plasma DNA: feasibility assessment," Clin. Chem. 61:10 (2015).

أ. المواد والطرق

تم الحصول على عينات البلازما من أربع مجموعات من الأفراد الذين تم توظيفهم عبر موافقة مكتوبة واعتماد مؤسسي، بمعنى أكثر تحديدًا، نساء حوامل في فترة الثلاثة أشهر حبلى بأجنة ذكور، نساء حوامل في فترة الثلاثة أشهر حبلى بالإناث، ذكور راشدين وإناث غير حوامل. تم تجميع عينات بلازما إي دي تي أيه EDTA في كل مجموعة لتوفير 20 ملليلتر على الأقل من بلازما لكل مجموعة. تم استخلاص عينات البلازما المجمعة pooled plasma samples باستخدام طقم صغير لدم QIAamp DSP DNA، (Qiagen, Germany)، (2). تم تركيز الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما الذي تم تصفيته تتابعيًا باستخدام 1050 ميكرو لتر لكل تجميعة بواسطة وحدة

تركيز Speedvac concentrator Speedvac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) حتى 85 ميكرو لتر. تم بالكامل استهلاك كل تجميعة الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين مركزة في البلازما لتحضير مجموعات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين باستخدام نماذج ترميم طرف وتذييل A (New England Biolabs, Ipswich, MA)، و Genomic DNA Sequencing Kit (SQK-MAP-005, Oxford Nanopore Technologies, UK)). تم تحميل كل مجموعة (150 ميكرو لتر) على خلية تدفق MinION Flow Cell (v7.3) (مسم نانوي) وإنشاء متواليات لها. تم تعيين قواعد لملفات بيانات المخرجات باستخدام برنامج METRICHOR™ (مسم نانوي). تم استخلاص قراءات 2D ومحاذاتها بالچينوم المرجعي بالچينوم البشري human genome (hg19) باستخدام برنامج مقارنة المتواليات على مستوى الچينوم LAST Genome-Scale Sequence Comparison (Computational Biology Research Consortium, Japan).

تم تشغيل عملية إنشاء المتواليات حتى تم استهلاك كل مجموعة واستغرق ذلك 6 إلى 24 ساعة. مرت 26.9٪–32.5٪ من القراءات على وحدة تعيين القواعد النووية basecaller. كانت أرقام 2D هي 56844، 50268، 35878 و36167، لتجميعات البلازما من النساء الحوامل اللاتي يحملن أجنة ذكور، للنساء الحوامل اللاتي يحملن أجنة إناث، الذكور الراشدين والنساء غير الحوامل، بالترتيب. إن متوسط الهوية الملحوظة، أي نسبة القواعد في قراءة تحاذي قاعدة مطابقة في متوالية مرجعية (3) بلغت 82.7٪ (81.4–84.5٪). ضمن قراءات 2D، تم محاذاة 16.9٪ (15.6–23.9٪) إلى موقع چينومي فريد وتم تحليلها أيضًا.

إن شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما التي تم إنشاء متواليات لها التي تحاذي الچينوم البشري الذي يتراوح طوله من 76 إلى 5776 قاعدة، وذروة عند 162 زوج قاعدي (155–168 زوج قاعدي) (**الشكل 6**). تبين كل من الرسوم البيانية في الشكل 6 حجم شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما التي تم إنشاء متواليات لها في أزواج قاعدة على المحور السيني، وتكرار حجم شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما كنسبة مئوية لإجمالي شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما التي تم إنشاء متواليات لها. إن الرسوم البيانية هي نتائج الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الذي تم إنشاء متواليات له من بلازما النساء اللاتي يحملن جنين ذكر، بلازما النساء اللاتي يحملن جنين أنثى، بلازما ذكر، وبلازما أنثى غير حبلى. إن أحجام قمة الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما من

الأربع بلازما متوافقة مع قراءاتنا السابقة بناء على منصات إنشاء متواليات Illumina (4). تم ملاحظة كميات دقيقة (0.06-0.3٪) من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الطويلة في البلازما (أكبر من 1000 زوج قاعدي) من بيانات إنشاء المتواليات بمسم نانوي ولكن ليس من تحليلات البيانات السابقة على منصات إنشاء متواليات أخرى (4).

يبين الشكل 7 منحنيات حجم لحمض الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما من بلازما النساء اللاتي يحملن جنين أنثى من بيانات تم الحصول عليها عن طريق إنشاء متواليات مسم نانوي والحصول عليها بواسطة منصة إنشاء متواليات Illumina. إن بيانات إنشاء المتواليات بالمسم النانوي هي نفس بيانات البلازما من النساء اللاتي يحملن جنين أنثى من الشكل 6. تتضمن منحنيات الحجم في الشكل 7 أشكالًا مشابهة للقمم بنفس الأحجام تقريبا. على سبيل المثال، تصل نسبة حجم الشظايا أقل من أو تساوي 150 زوج قاعدي إلى شظايا من 161 إلى 170 زوج قاعدي لإنشاء متواليات بمسم نانوي إلى 1.21 مقارنةً بـ 1.10 لإنشاء متواليات Illumina. أثبتت هذه النتائج أن منحنى الحجم للحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين البلازما يمكن تحديده بدقة باستخدام مسم نانوي وتركيز الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما. إن أي قمة في المدى 250-400 زوج قاعدي في البيانات التي تم الحصول عليها بواسطة إنشاء بيانات مسم نانوي تكون أبرز منها بواسطة إنشاء متواليات Illumina. وهذه القمة تناظر حمض الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الخال من الخلايا المشتق من النوكليوسومات الثنائية dinucleosomes، ويتباين وجود القمة عبر الأفراد. بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن يكون إنشاء متواليات Illumina أقل فعالية في إنشاء متواليات من الشظايا بهذا النطاق الحجمي.

ب. تحليل القراءات

يبين الشكل 8 توزيعات قراءات الكروموسومات مقارنةً بتوزيع متوقع من الچينوم البشري القابل للتعيين، الموسوم بالچينوم البشري. يتم إدراج الكروموسومات على المحور السيني. على المحور الصادي، تم حساب التوزيع التناسبي للقراءات لكل كروموسوم (التمثيل الچينومي) لكل عينة عن طريق عد رقم القراءات المتحاذية بكل كروموسوم على العدد الإجمالي للقراءات المتحاذية الإجمالية التي تم إنشاء متواليات لها من العينة وتم تمثيلها كتكرار وكنسبة مئوية. تم رسم منحنى يضم الچينوم البشري يمثل النتائج الآتية من بلازما النساء اللاتي يحملن جنين ذكر، بلازما النساء اللاتي يحملن جنين أنثى، بلازما ذكر، بلازما إناث غير حوامل. كانت توزيعات القراءة للصبغي الجسدي لك من

الأربع تجميعات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما مشابهة لتلك المتوقعة للچينوم البشري القابل للتعيين.

يتم ملاحظة الفروق في الكروموسوم X والكروموسوم Y في توزيع القراءة. كانت نسبة القراءات المتعينة إلى الكروموسوم X أقل في بلازما الذكر (2.70٪) مقارنة ببلازما الأنثى (5.22٪). تم الكشف عن متواليات الكروموسوم Y في تجميعة الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما للذكر البالغ (0.30٪) ولكن ليس في تجميعة الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما للأنثى غير الحامل.

إن تجميعة الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما من النساء الحوامل بأجنة ذكر بلغت 0.11٪ من القراءات المتحاذية مع الكروموسوم Y. وبالتوافق مع البيانات السابقة (2)، فإن 0.018٪ من القراءات تحاذت مع متواليات الكروموسوم Y في تجميعة الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما من النساء الحوامل بأجنة إناث. إن وجود قراءات متحاذية مع الكروموسوم Y لدى النساء الحوامل بأجنة إناث يمكن أن يكون نتيجة لخطأ معروف متحاذي مع خطأ ذكر. تضمنت تجميعة الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما من الأمهات الحاملات بأجنة ذكر متواليات الكروموسوم X بنسبة أقل بمقدار حوالي 1٪ عن النساء الحوامل بأجنة إناث.

يتم ملاحظة أن التوزيع النسبي لقراءات الكروموسوم X والكروموسوم Y مشابه للناتج المتوقع. أثبتت البلازما من الذكور بأنها تتضمن كروموسوم Y أكثر من البلازما الآتية من الحوامل والنساء غير الحوامل على حد سواء. تضمنت بلازما الذكور عدد كروموسومات X أقل من البلازما الآتية من الحوامل والنساء غير الحوامل. تضمنت بلازما الذكور حوالي نصف عدد الكروموسومات X للإناث غير الحوامل، وهو أمر متوقع نظرًا لأن الذكور يحملون كروموسوم X واحد فقط بينما تحمل الإناث عدد 2 كروموسومات X. تضمنت بلازما النساء اللاتي يحملن جنين ذكر توزيع قراءة من كروموسومات Y أعلى من بلازما النساء اللاتي يحملن جنين أنثى وبلازما أنثى.

بالتالي، يمكن الكشف عن متواليات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الجنينية وجرعة الكروموسوم chromosome X dosage X بين الأجنة الذكور والإناث بواسطة إنشاء متواليات بمسم نانوي وتركيز الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما. إن جرعة الكروموسوم X لجنين ذكر تعادل جرعة الكروموسوم X لجنين أنثى ذي أحادي الكروموسوم X أو متلازمة تيرنر.

بالتالي، تؤكد هذه الملاحظة أن المرونة المحتملة لاستخدام إنشاء متواليات بمسم نانوي للكشف غير الاختراقي عن اختلال تضاعف العدد الكروموسومي، مثل أحادي الكروموسوم X أو عدد نسخ الزيغ. نظرًا لأن أحادي الكروموسوم X يمثل انخفاضا لنسخة كروموسوم واحدة في الچينوم، فإن مدى التغير في عدد النسخ يكافئ ثلاثي الكروموسوم حيث توجد إضافة لنسخة كروموسوم واحدة في الچينوم. بالتالي، فإن هذه البيانات تعكس أيضًا أنه يمكن أيضًا تطبيق بروتوكولنا على الكشف غير الاختراقي لثلاثي الكروموسوم الجنيني 21، وثلاثي الكروموسوم 18 وثلاثي الكروموسوم 13 واختلال تضاعف العدد الكروموسومي الجنيني. وتؤكد هذه البيانات مرونة اختبار قبل الولادة غير الاختراقي على أساس إنشاء متواليات من مسام نانوي واختبار قبل الولادة غير الاختراقي لنقطة الرعاية.

4. إنشاء متواليات للسرطان باستخدام تركيز زائد

يمكن دوران حمض الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الخالي من الخلايا في الدورة الدموية في صورة "خزعة سائلة liquid biopsy" لمراقبة السرطان في الوقت الحقيقي. يبدي الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الخالي من السرطان شذوذ جيني genetic anomalies يوجد في الأورام الكامنة underlying tumors، التي يمكن الكشف عنها عن طريق تقنية إنشاء المتواليات المتوازية بشكل شامل. يمكن أيضًا الكشف عن هذه الأخطاء الكروموسومية في حمض الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما لمرضى السرطان باستخدام تقنية إنشاء متواليات بالمسم النانوي. تم تحليل عينات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما من مريضين يعانيان من كارسينوما كبدية خلوية hepatocellular carcinoma (HCC) عن طريق كل من إنشاء متواليات بمسم نانوي وإنشاء متواليات على التوازي بشكل شامل على منصة Illumina.

أ. المواد والطرق

تم جمع 20 ملليلتر من الدم المحيطي من مريضين تم تشخيص حالتهما بكارسينوما كبدية خلوية قبل العملية. تم عزل البلازما بالطرد المركزي عند 1600 × عجلة الجاذبية لمدة 1 دقائق، ثم عند 16000 × عجلة الجاذبية لمدة 10 دقائق. تم استخلاص الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين من 8 ملليلتر من البلازما باستخدام طقم مصغر من دم QIAamp DSP DNA، (Qiagen). تم إخضاع ثلاثة أرباع الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين البلازما لإنشاء متواليات مسم نانوي، بينما تم إنشاء الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المتبقي بواسطة NextSeq 500 (Illumina).

تم تحضير مجموعات إنشاء متواليات مسم نانوي بواسطة وحدة نمطية لترميم الطرف/تذييل end- dA repair/ dA-tailing module، اختصارًا (NEB)، و Nanopore Sequencing Kit (SQK-NSK007, Oxford Nanopore Technologies). تم تحميل المجموعة بالكامل على MinION Flow Cell (الإصدار R9)، وتم إنشاء متواليات على وحدة إنشاء المتواليات MinION Mk1B (مسم نانوي). تم تعيين قواعد لملفات بيانات المخرجات باستخدام METRICHORTM (مسم نانوي). تم استخلاص قراءات 2D ومحاذاتها بالچينوم المرجعي بالچينوم البشري باستخدام برنامج LAST. تم إجراء إنشاء متواليات Illumina للحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما طبقا لما هو مبين مسبقا (8).

ب. النتائج

تم حساب التوزيع التناسبي للقراءات المتحاذية لكل ذراع كروموسومي chromosome arm (التمثيل الچينومي genomic representation، GR) لكل عينة. بعبارات أخرى، فإن عدد المرشح الذي تم تمريره عالي الجودة يفيد بأن المحاذاة بذراع كروموسومي، ذراع p أو q، قد تم التعبير عنه كنسبة من قراءات مرشح تم تمريره عالي الجودة تماما تم إنشاء متواليات له من العينة. تم عندئذ حساب الفرق في التمثيل الچينومي بالنسبة لعينات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما للأفراد العاديين. إذا كانت التمثيل الچينومي لذراع كروموسومي هي 3 انحرافات قياسية أعلى متوسط مجموعة المقارنة، تُوضع المنطقة في الاعتبار لتوضيح كسب عدد نسخة. إذا كانت التمثيل الچينومي لذراع كروموسوم هي 3 انحرافات قياسية أدنى متوسط مجموعة المقارنة، تُوضع المنطقة في الاعتبار لتوضيح فقد عدد النسخ.

يبين الشكل 9 الفرق في التمثيل الچينومي على حالتين (HOT530 وHOT536) لـ كارسينوما كبدية خلوية عن طريق إنشاء متواليات لمسم نانوي (حلقة خارجية outer ring) وبواسطة منصة كارسينوما كبدية خلوية (حلقة داخلية inner ring). يتم وسم كروموسومات الفرق على الجزء الخارجي. كانت المناطق التي تم تحليلها analyzed regions هي أذرع الكروموسومات arms of chromosomes. يتم تمثيل كسب الكروموسومات كأعمدة خضراء وحسب امتدادها للخارج من مركز الحلقة المناظرة. يتم تمثيل فقد الكروموسومات كأعمدة حمراء وحسب امتدادها للخارج من مركز الحلقة المناظرة. كما هو مبين في الشكل 9، توافقت النتائج الآتية من إنشاء المتواليات بالمسم النانوي مع النتائج الآتية من منصة Illumina كثيرًا. أظهر العينات التي تم إنشاء متواليات لها أيضًا اتجاها بأنها تتضمن الحمض

الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين أطول مقارنة بالحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما من خاضعين للعلاج بدون سرطان. يبين هذا المثال أنه يمكن استخدام إنشاء متواليات بمسم نانوي مع طريقة التركيز الزائد لتحليل الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما من مرضى السرطان.

5. أمثلة باستخدام كونكاتيميرات

إن جزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما عادة ما تكون قصيرة (أقل من 200 زوج قاعدي)، ويمكن عادة استخدام وحدات إنشاء متواليات بمسم نانوي لإنشاء متواليات لجزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين طويلة. يمكن تحسين فعالية إنشاء المتواليات لجزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الطويلة في البلازما عن طريق ربط الجزيئات الفردية بجزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين منشأة طويلة، تُسمى كونكاتيميرات.

أ. المواد والطرق

1. إنشاء كونكاتيميرات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما

تم اختبار عينات من خاضعين للعلاج مختلفين. تم جمع 20 ملليلتر من الدم الوريدي المحيطي peripheral venous blood من خاضعة للعلاج عبارة عن أنثى غير حامل وخاضعة للعلاج عبارة عن أنثى حامل بجنين ذكر. تم حصد البلازما بعد تعريضها للطرد المركزي عند 1600×عجلة الجاذبية لمدة 10 دقائق وطردها مركزيا أيضًا عند 16000×عجلة الجاذبية لمدة 10 دقائق. تم بعد ذلك استخلاص الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين من 8 ملليلتر من البلازما باستخدام طقم مصغر من دم QIAamp DSP DNA (Qiagen)، بما يؤدي إلى الحصول على حجم 420 ميكرو لتر من الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما. تم تركيز الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المستخلص إلى 85 ميكرو لتر بواسطة وحدة تركيز SpeedVac (Thermo Scientific)، وتم إعادة ترميم طرفها بواسطة وحدة NEBNext End-Repair النمطية (New England Biolabs, NEB). تم تنقية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المرمَّم عند الطرف باستخدام طقم التنظيف MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen) وتصفيته تتابعيًا باستخدام 20 ميكرو لتر من محلول منظم buffer إى بى EB. بعد ذلك، تم وضع حمض الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في خطوات تسلسلية عن طريق إضافة 20 ميكرو لتر من خليط رئيسي أن إى بى Blunt/ TA Ligase Master Mix (NEB) مع الحضانة باستخدام 25 درجة مئوية لمدة 4 ساعات،

والتنقية باستخدام طقم التنظيف MinElute Reaction Cleanup بعد الحضانة.

2. إنشاء متواليات بمسم نانوي

بعد ذلك تم استخدام الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الذي تم تسلسله لتحضير مجموعة إنشاء متواليات بمسم نانوي عن طريق وحدات ترميم طرف وتذييل A، (NEB)،و Genomic DNA Sequencing Kit (SQK-MAP-005, Oxford Nanopore Technologies). تم تحميل المجمعة بالكامل على خلية تدفق MinION Flow Cell (v7.3) (مسم نانوي)، وإنشاء متواليات لها. تم تعيين قواعد لملفات بيانات المخرجات باستخدام برنامج METRICHOR™ (مسم نانوي). تم استخلاص قراءات 2D.

3. المحاذاة

تم إجراء محاذاة باستخدام برنامج LAST. تم الوصول إلى متطابقات أولية لكل موضع بدء ممكن. تم تقييد المتطابقات بمتطابقات ذات أدنى طول يحدث لأقصى عدد من المرات في الچينوم المرجعي، أو تم تقييد المتطابقات بطول معين محدد سلفا. من هذه التطابقات الأولية، تم إجراء عمليات محاذاة إضافية لمتواليات أطول من التطابقات الأولية هذه، وتم الاحتفاظ بتلك التي سجلت نقاط فجوة معينة بناء على التفاوت المرغوب لأخطاء إنشاء المتواليات. إذا قامت عمليات محاذاة متعددة بمشاركة نفس نقطة النهاية، تم الاحتفاظ بالمحاذاة ذات مجموع النقاط الأعلى. بهذه الطريقة، تم تحديد الشظايا المتحاذية بالچينوم البشري. يمكن تغيير المتغيرات والقواعد في LAST حسب اعتبارات الدقة.

ب. النتائج

تم إنشاء متواليات للحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المركَّز في البلازما على MinION لمدة ست ساعات حتى تم استهلاك المجموعة.

1. الإناث غير الحوامل

أعطى تعيين القواعد النووية 2.234 قراءة 2D، بحيث أن طول القراءة تراوح من 86 إلى 8.672 زوج قاعدي. يبين الشكل 10 منحنى توزيع تكرار الأحجام للكونكاتيميرات التي تم إنشاء متواليات لها من الإناث غير الحوامل. يكون حجم الكونكاتيمير في أزواج القاعدة على المحور السيني. يتم رسم منحنى للتكرار، المشار إليه بالنسبة المئوية، الذي يشير إلى حجم كونكاتيمير معين موجود في عينة المتواليات، وذلك على المحور الصادي. لا يتم عرض نقطة بيانات متطرفة outlier data point عند 8.672 زوج قاعدي من أجل تحسين قابلية قراءة الرسم البياني. لكل عينة تم إنشاء متواليات لها، تم

الكشف عن جزيئات الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين بطول يتراوح من حوالي 20 إلى 50.

كانت أحجام الجزيئات التي تم إنشاء متواليات لها أكبر كثيرا من الطول النمطي لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما، بطول أقل من 200 زوج قاعدي عادة. تدل هذه البيانات أنه تم تجميع شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما ككونكاتيميرات بشكل ناجح. تم بعد ذلك محاذاة هذه القراءات بالچينوم البشري. تم بعد ذلك فصل تمددات قواعد، أو أجزاء، انتمت إلى المناطق التي تم فصلها على الچينوم البشري، واعتبارها كشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين واحدة في البلازما. بشكل إجمالي، تم الحصول على 3.801 جزء تم تعيينه بشكل فريد، بمعنى شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين تم إنشاء متواليات لها في البلازما، وأظهرت 80.6٪ من الأجزاء التي تم تعيينها بشكل فريد متوالية متطابقة مع الچينوم المرجعي.

يبين الشكل 11 توزيع حجم الأجزاء المتحاذية للإناث غير الحوامل. تباينت أحجام هذه الأجزاء المتحاذية aligned segments من 78 إلى 560 زوج قاعدي، وأغلبها أدنى 200 زوج قاعدي. بلغت ذروة الحجم 162 زوج قاعدي. بلغ متوسط الحجم 173 زوج قاعدي. بلغ الحجم المتوسط 162 زوج قاعدي، وهو ما يتوافق مع الملاحظات السابقة على حجم الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما عن طريق إنشاء متواليات على التوازي بشكل شامل على منصة Illumina وأيضًا عن طريق إنشاء متواليات بمسم نانوي باستخدام تركيز زائد من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين.

يبين الشكل 12 التوزيع المحوسب للأجزاء المتحاذية مقارنةً بالچينوم المرجعي من ذكر. تم حوسبة التوزيع التناسبي للأجزاء المتحاذية لكل كروموسوم (تمثيل چينومي). كان التوزيع المحوسب مشابها لتوزيع الچينوم البشري ضمن كل الصبغيات الجسدية. بالنسبة للكروموسومات الجنسية sex chromosomes، كان التمثيل الجيني للكروموسوم X هو 5.79٪، والذي يتوقع لعينة من الإناث. لم يتم العثور على أي اختلال للكروموسوم Y. وبالتالي، فإن طرق استخدام كونكاتيمير بمسم نانوي يمكن أن تميّز بلازما الإناث عن البلازما الذكور.

2. الإناث الحوامل بجنين ذكر

إن الجنين الذكر في الإناث الحوامل يكون بعمر حمل 38 أسبوع و4 أيام عند أخذ عينة دم. يُعد

الحمل طبيعيا. تم تحويل شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما إلى كونكاتيمير قبل معالجة لإنشاء متواليات بمسم نانوي. تراوح حجم الكونكاتيمير من 100 إلى 13.466 زوج قاعدي، بحجم متوسط يبلغ 676 زوج قاعدي ومتوسط حجم يبلغ 965 زوج قاعدي.

يبين الشكل 13 حجم ملف الأجزاء المتحاذية من الكونكاتيمير لإناث حوامل بجنين ذكر. إن منحنى الحجم نموذجي للحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين في البلازما. بلغ الحجم المتوسط للشظايا 196 زوج قاعدي. بلغت ذروة الحجم 174 زوج قاعدي، مع تراوح الحجم من 92 إلى 2.934 زوج قاعدي. كان لحوالي 0.4٪ من الشظايا حجما أكبر من 2.000 زوج قاعدي فقط. وهذا الحجم مشابه للتوزيعات الحجمية الأخرى التي تم الحصول عليها بوسطة طرق تستخدم كونكاتيمير، تركيز زائد، أو إنشاء متواليات على التوازي بشكل شامل. على سبيل المثال، يشبه التوزيع توزيع حجمي يوجد باستخدام طريقة التركيز الزائد لبلازما من النساء اللاتي يحملن جنين ذكر كما هو مبين في الشكل 6.

يبين **الشكل 14** التوزيع الكروموسومي المحوسب computed chromosomal للأجزاء المتحاذية للأنثى الحامل بجنين ذكر مقارنةً بچينومات مرجعية reference genomes لذكر وأنثى غير حامل. يبين توزيع الكونكاتيميرات مستوى كروموسومي X بين ذلك الخاص بالذكر والأنثى غير الحامل. وهذا يؤكد أن بيانات الكروموسوم X تعكس أحادي الكروموسوم X لجنين الذكر الطبيعي. بالإضافة إلى ذلك، يبين الكونكاتيمير دليلا على الكروموسوم المشتق من الجنين Y. يمكن أن تكون بعض الانحرافات لتوزيع القراءة التي تم الحصول عليها عن طريق إنشاء متواليات من الچينوم المرجعي نتيجة قصر التحليل بأجزاء قابلة للمحاذاة قط من الچينوم المرجعي. برغم ذلك، كما هو مبين في هذه النتائج، يمكن لطرق استخدام كونكاتيمير أن تميز بلازما أم حامل بجنين ذكر عن ذكر أو أنثى غير حامل. من المرجح استخدام هذه الطرق لتمييز بلازما أم بجنين ذكر عن بلازما أم بجنين أنثى.

6. تجسيدات أخرى

يتضمن التجسيد 1 طريقة تشتمل على: استقبال مجموعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين؛ تحويل مجموعة أولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للحصول على كونكاتيمير أول؛ تمرير الكونكاتيمير الأول خلال مسم نانوي أول؛ والكشف عن إشارة كهربائية أولى بينما يمر الكونكاتيمير خلال المسم النانوي الأول، تناظر الإشارات الكهربائية متوالية أولى للكونكاتيمير الأول.

يتضمن التجسيد 2 طريقة التجسيد 1، حيث يشتمل أيضًا على تنفيذ بواسطة نظام كمبيوتر: تحليل الإشارات الكهربائية الأولى لتحديد المتوالية الأولى؛ ومحاذاة متواليات فرعية للمتوالية الأولى بچينوم مرجعي لتحديد متواليات شظية مناظرة لكل من المجموعة الأولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين.

التجسيد 3 يتضمن الطريقة وفقًا للتجسيد 1، حيث تشتمل خطوة تمرير الكونكاتيمير الأول خلال مسم نانوي أول على: تمرير جديلة أولى للكونكاتيمير الأول خلال المسم النانوي؛ وبعد ذلك، تمرير جديلة ثانية للكونكاتيمير الأول خلال المسم النانوي. التجسيد 4 يتضمن الطريقة وفقًا للتجسيد 3، حيث يشتمل أيضًا على تحليل، بواسطة نظام كمبيوتر، للإشارات الكهربائية الأولى للجديلة الأولى والجديلة الثانية لتحديد المتوالية الأولى.

التجسيد 5 يتضمن الطريقة وفقًا للتجسيد 1، حيث تكون مجموعة شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين عبارة عن شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خالية من الخلايا آتية من عينة حيوية.

التجسيد 6 يتضمن الطريقة وفقًا للتجسيد 2، حيث تكون العينة الحيوية عبارة عن بلازما أو مصل.

التجسيد 7 يتضمن الطريقة وفقًا للتجسيد 1، حيث يكون المسم النانوي الأول عبارة عن واحد من مجموعة من المسام النانوية على ركيزة. التجسيد 8 يتضمن الطريقة وفقًا للتجسيد 7، حيث يشتمل أيضًا على: تحويل مجموعة ثانية من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للحصول على كونكاتيمير ثاني؛ تمرير الكونكاتيمير الثاني خلال مسم نانوي ثاني لمجموعة من المسام النانوية؛ والكشف عن إشارة كهربائية بينما يمر الكونكاتيمير الثاني خلال المسم النانوي الثاني، تناظر الإشارات الكهربائية متوالية ثانية للكونكاتيمير الثاني. التجسيد 9 يتضمن الطريقة وفقًا للتجسيد 7، حيث يشتمل أيضًا على: تحويل مجموعة ثانية من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين للحصول على كونكاتيمير ثاني؛ تمرير الكونكاتيمير الثاني خلال المسم النانوي الأول؛ والكشف عن إشارة كهربائية بينما يمر الكونكاتيمير الثاني خلال المسم النانوي الأول، تناظر الإشارات الكهربائية متوالية ثانية للكونكاتيمير الثاني.

التجسيد 10 يتضمن طريقة تشتمل على : استقبال عينة حيوية تتضمن مجموعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين؛ تركيز العينة الحيوية لتتضمن تركيزًا أعلى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين؛ تمرير مجموعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع

الأكسجين خلال مسام نانوية على ركيزة؛ وبالنسبة لكل من مجموعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين: الكشف عن إشارات كهربائية بينما تمر شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خلال مسم نانوي، تناظر الإشارات الكهربائية متوالية شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين.

التجسيد 11 يتضمن طريقة تشتمل على تنفيذ بواسطة نظام كمبيوتر: استقبال متوالية أولى لكونكاتيمير أول يولَّد بواسطة تحويل مجموعة أولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين؛ ومحاذاة متواليات فرعية للمتوالية الأولى بچينوم مرجعي لتحديد متواليات شظية مناظرة لكل من المجموعة الأولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين. التجسيد 12 يتضمن الطريقة وفقًا للتجسيد 11، حيث تشتمل خطوة محاذاة المتواليات الفرعية على: محاذاة نوافذ المتوالية الأولى بالچينوم المرجعي؛ وتحديد متى تتحاذى نافذتين مع المناطق المختلفة للچينوم المرجعي. التجسيد 13 يتضمن الطريقة وفقًا للتجسيد 12، حيث يتم تحديد واحدة أو أكثر من النوافذ بين النافذتين بأنها لا تحاذي الچينوم المرجعي.

التجسيد 14 يتضمن منتج كمبيوتر يشتمل على وسط مقروء بالكمبيوتر يخزن مجموعة من التعليمات للتحكم في نظام كمبيوتر لإجراء عملية وفا لأي من التجسيدات 11-13. التجسيد 15 يتضمن نظامًا يشتمل على: منتج الكمبيوتر وفقًا للتجسيد 14؛ وواحد أو أكثر من المعالجات لتنفيذ التعليمات المخزنة على الوسط المقروء بالكمبيوتر. التجسيد 16 يتضمن نظامًا يشتمل على وسيلة لإجراء واحد أو أكثر من التجسيدات 11-13. التجسيد 17 يتضمن نظاما مهيأ لتنفيذ أي من التجسيدات 11-13. التجسيد 18 يتضمن نظاما يشتمل على وحدات نمطية تنفذ بشكل مناظر الخطوات وفقًا لأي واحد من التجسيدات 11-13.

7. أمثلة لنظام إنشاء المتواليات

يبين الشكل 15 مخططًا إطاريًا لنظام 1500 لإجراء عملية إنشاء متواليات لجزيء مفرد وفقًا لتجسيدات الاختراع الحالي. يمكن الحصول على عينة حيوية من مريض 1502 عن طريق وسيلة استخلاص extraction device 1504. يمكن أن تكون العينة الحيوية اي سائل بالجسم أو أي عينة حيوية موصوفة هنا. يمكن أن تشتمل وسيلة الاستخلاص 1504 على محقنة syringe، مشرط lancet، ممسحة swab، أو حاوية أو دورق لجمع عينة مثل بول. يمكن أن تشتمل وسيلة استخلاص 1504 على طقم مصغر من دم الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين QIAamp DSP

(Qiagen, Germany) (2). يمكن أن تحتوي العينة الحيوية على شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خالية من الخلايا، حيث يتم إرسالها إلى وسيلة تحضير preparation device 1506. يمكن أن تتضمن وسيلة التحضير 1506 وسيلة تنتج صورة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين خالية من الخلايا التي تُعتبر أكثر فعالية لإنشاء متواليات مفردة الجزيء. على سبيل المثال، يمكن أن يكون خرْج وسيلة التحضير 1506 عبارة عن كونكاتيميرات أو عينة مركزة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الخالية من الخلايا.

عندما يتم إنتاج كونكاتيميرات، يمكن أن تتضمن وسيلة التحضير 1506 مجفف خوائي vacuum dryer لزيادة التركيز، مثل وحدة تركيز SpeedVac (Thermo Scientific) أو وحدة تركيز فائقة ultraconcentrator تقوم بإزالة السائل بواسطة النز أو الترشيح. بالنسبة للكونكاتيميرات، يمكن ألا يزيد التركيز بمعامل يبلغ خمسة أو أكثر. يمكن أن تتضمن وسيلة التحضير 1506 وحدة نمطية لترميم الأطراف الخاصة بشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين، مثل وحدة نمطية لترميم الطرف NEBNext End-Repair (New England Biolabs, NEB). بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن تتضمن وسيلة التحضير 1506 طقمًا لتنقية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المرمم الطرف، مثل طقم تنظيف التفاعل MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen). يمكن أيضًا أن تتضمن وسيلة التحضير 1506 وسيلة حضانة يمكنها حضانة إنزيمات ليجاز (على سبيل المثال، Blunt/ TA Ligase Master Mix (NEB)) عند درجة حرارة لعدة ساعات (على سبيل المثال، 25 درجة مئوية لمدة 4 ساعات). يمكن لوسيلة التحضير 1506 أن تتضمن طقمًا إضافيًا لتنقية الكونكاتيميرات بعد التفاعل، حيث يمكن أن تتضمن طقم تنظيف MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen). يمكن أن تتضمن وسيلة التحضير 1506 أيضًا وسيلة تداول سائل آلية robotic liquid handler، يمكنها خلط السوائل ونقلها.

عند إنتاج تركيز زائد من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين الخالية من الخلايا، يمكن لوسيلة التحضير 1506 أن تتضمن مجفف خوائي (على سبيل المثال، وسيلة تركيز Speedvac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)) أو وسيلة تركيز فائقة تحرك السائل بالنز أو الترشيح. يمكن أنت تضمن وسيلة التحضير 1506 أيضًا وحدات ترميم أطراف وتذييل A أيضًا (New England Biolabs, Ipswich, MA). يمكن أن تتضمن وسيلة التحضير 1506 أيضًا وسيلة تداول سوائل آلية، يمكنها خلط ونقل السوائل.

يمكن إرسال الكونكاتيميرات أو شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين المركَّزة الآتية من وسيلة التحضير 1506 إلى وسيلة إنشاء متواليات لجزيء مفرد 1508 للحصول على قراءات متواليات. يمكن أن تشتمل وسيلة إنشاء متواليات لجزيء مفرد 1508 أيضًا على وسيلة مثل خلية تدفق MinION Flow Cell (v7.3) (مسم نانوي)، تقنية الزمن الحقيقي مفردة الجزيئات، (Pacific Biosciences)، أو وحدات إنشاء متواليات لجزيء مفرد Helicos، (SeqLL). يمكن أن تشتمل وسيلة إنشاء متواليات لجزيء مفرد 1508 أيضًا على أطقم مرتبطة بمسم نانوي، مثل Genomic DNA Sequencing Kit (SQK-MAP-005, Oxford Nanopore Technologies, UK أو Nanopore Sequencing Kit (SQK-NSK007, Oxford Nanopore Technologies).

يمكن لوسيلة إنشاء متواليات لجزيء مفرد 1508 أن تخرج قراءات متوالية خرْج من الكونكاتيميرات أو شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين مركَّز. يمكن إخراج قراءات المتواليات كملفات بيانات ويمكن تحليلها بواسطة نظام كمبيوتر 1510. يمكن أن يكون نظام الكمبيوتر عبارة عن نظام كمبيوتر مخصص ذي برامج لتحليل قراءات المتواليات. يمكن تعيين قواعد نووية لملفات بيانات المخرجات باستخدام برنامج METRICHOR™ (مسم نانوي). يمكن استخلاص قراءات 2D ومحاذاتها باستخدام برنامج LAST. يمكن أن يكون نظام الكمبيوتر عبارة عن نظام الكمبيوتر 10 في الشكل 16، كما هو مبين أدناه.

8. نظام الكمبيوتر

يمكن لأي من أنظمة الكمبيوتر المذكورة هنا أن تستخدم أي عدد مناسب من الأنظمة الفرعية. يبين الشكل 16 أمثلة للأنظمة الفرعية هذه في نظام الكمبيوتر 10. في بعض التجسيدات، يتضمن نظام كمبيوتر جهاز كمبيوتر واحد، حيث يمكن أن تكون الأنظمة الفرعية عبارة عن مكونات جهاز الكمبيوتر. في تجسيدات أخرى، يمكن لنظام كمبيوتر أن يتضمن عدة أجهزة كمبيوتر، كل منها عبارة عن نظام فرعي، بمكونات داخلية. يمكن لنظام كمبيوتر يتضمن أجهزة كمبيوتر سطح مكتب وأجهزة كمبيوتر محمولة، أجهزة لوحية tablets، هواتف محمولة، ووسائل محمولة أخرى.

يتم توصيل الأنظمة الفرعية المبينة في الشكل 6 بينيًا عبر ناقل نظام 75. يمكن توصيل أنظمة فرعية إضافية مثل طابعة 74، لوحة مفاتيح 78، جهاز (أجهزة) تخزين 79، شاشة 76 تقترن بموائم شاشة عرض display adapter 82، وغيرها. يمكن توصيل الأجهزة الطرفية وأجهزة الإدخال/الإخراج input/output (I/O)، التي تقترن بأداة تحكم في الإدخال/الإخراج 71، بنظام الكمبيوتر بواسطة أي

عدد من الوسائل المعروفة في المجال مثل منفذ الإدخال/الإخراج 77 (على سبيل المثال، USB، FireWire®). على سبيل المثال، يمكن استخدام منفذ الإدخال/الإخراج 77 أو الواجهة الخارجية 81 (مثل إيثرنت أو واي-فاي أو غير ذلك) لتوصيل نظام الكمبيوتر 10 بشبكة منطقة واسعة wide area network مثل الإنترنت أو جهاز إدخال الفأرة mouse input device أو ماسح ضوئي scanner.

يسمح الاتصال البيني عبر ناقل نظام system bus 75 للمعالج المركزي central processor 73 بالاتصال بكل نظام فرعي والتحكم في تنفيذ عدد وافر من التعليمات من ذاكرة النظام 72 أو جهاز (أجهزة) التخزين storage device(s) 79 (على سبيل المثال، قرص ثابت fixed disk، مثل قرص صلب hard drive، أو قرص بصري optical disk)، فضلا عن تبادل المعلومات بين النظم الفرعية. وقد تجسّد ذاكرة النظام 72 و/أو جهاز (أجهزة) التخزين 79 وسطًا قابلًا للقراءة على الكمبيوتر.

هناك نظام فرعي آخر هو جهاز جمع البيانات data collection device 85، مثل الكاميرا، الميكروفون، مقياس التسارع accelerometer، وما شابه ذلك. يمكن إخراج أي من البيانات المذكورة هنا من مكوّن إلى آخر ويمكن إخراجها إلى المستخدم.

يمكن أن يشتمل نظام كمبيوتر على عدد وافر من نفس المكونات أو الأنظمة الفرعية، على سبيل المثال، المتصلة معا بواسطة واجهة خارجية external interface 81، بواسطة واجهة داخلية internal interface، أو بواسطة أجهزة تخزين قابلة للإزالة حيث يمكن توصيلها وإزالتها من مكون إلى آخر. في بعض التجسيدات، يمكن أن تتصل أنظمة الكمبيوتر، النظام الفرعي، أو الأجهزة عبر شبكة. في مثل هذه الحالات، يمكن اعتبار جهاز كمبيوتر واحد عميلا وجهاز كمبيوتر آخر خادمًا، حيث يمكن أن يكون كل منها جزءً من نظام كمبيوتر واحد. يمكن لكل من عميل وخادم أن يتضمن أنظمة متعددة أو أنظمة فرعية أو مكونات.

يمكن تنفيذ جوانب التجسيدات في شكل منطق تحكم باستخدام العتاد (على سبيل المثال، دارة متكاملة integrated circuit خاصة بالتطبيقات أو مصفوفة بوابة للبرمجة حقليًا field programmable gate array) و/أو باستخدام برامج كمبيوتر ذات معالج قابل للبرمجة programmable processor بشكل عام بطريقة معيارية أو متكاملة. وكما هو مستخدَم هنا، يشتمل المعالج على معالج أحادي النواة single-core processor أو معالج متعدد النواة multi-core processor على شريحة متكاملة integrated chip واحدة أو وحدات معالجة processing units متعددة على لوحة دارة circuit board واحدة أو متصلة بالشبكة. استنادا إلى الكشف والتعاليم الواردة هنا، فإن أصحاب المهارة العادية في

المجال سيعرفون ويدركون طرقا و/أو أساليب أخرى لتنفيذ تجسيدات الاختراع الحالي باستخدام العتاد وتوليفة من العتاد والبرمجيات.

يمكن تنفيذ أي من مكونات أو وظائف البرامج الموضحة في هذا الطلب كشفرة برمجية software code يتم تنفيذها بواسطة معالج باستخدام أي لغة كمبيوتر مناسبة مثل جافا، C، C++، C#، Objective-C، Swift، أو لغة برمجة مثل بيرل أو بايثون باستخدام، على سبيل المثال، تقنيات تقليدية أو موجَّهة بالكائنات. يمكن تخزين الشفرة البرمجية كمجموعة من التعليمات أو الأوامر على وسط قابل للقراءة من أجل التخزين و/أو الإرسال. يمكن أن يشمل الوسط المناسب غير الانتقالي المقروء بالكمبيوتر ذاكرة الوصول العشوائي random access memory (RAM)، ذاكرة للقراءة فقط read only memory (ROM)، وسط مغناطيسي magnetic medium مثل قرص صلب أو قرص مرن floppy disk، أو وسط بصري optical medium مثل قرص مضغوط compact disk (CD) أو DVD (قرص رقمي متعدد الاستخدامات digital versatile disk)، ذاكرة فلاش flash memory، وما شابه ذلك. يمكن أن يكون الوسط المقروء بالكمبيوتر أي توليفة من أجهزة التخزين أو الإرسال هذه.

يمكن أيضًا تشفير مثل هذه البرامج وإرسالها باستخدام إشارات الموجة الحاملة carrier signals التي يتم تكييفها للإرسال عبر الشبكات السلكية wireless networks، البصرية، و/أو اللاسلكية المتوافقة مع مجموعة متنوعة من البروتوكولات، بما في ذلك الإنترنت. وعلى هذا النحو، يمكن إنشاء وسط قابل للقراءة باستخدام إشارة بيانات مشفرة بهذه البرامج. يمكن حزم الوسائط القابلة للقراءة بواسطة الكمبيوتر مع جهاز متوافق compatible device أو يتم توفيرها بشكل منفصل عن الأجهزة الأخرى (على سبيل المثال، عبر التحميل من الإنترنت). يمكن أن يستقر أي وسط قابل للقراءة كهذا على أو داخل منتج كمبيوتر واحد (على سبيل المثال قرص صلب أو قرص مضغوط أو نظام كمبيوتر كامل)، ويمكن أن يكون موجودا على أو داخل منتجات كمبيوتر مختلفة داخل نظام أو شبكة. يمكن أن يشتمل نظام الكمبيوتر على شاشة أو طابعة أو شاشة مناسبة أخرى لتوفير أي من النتائج المذكورة هنا لمستخدم.

يمكن تنفيذ أي من الطرق الموصوفة هنا كليا أو جزئيا باستخدام نظام كمبيوتر يشتمل على معالج واحد أو أكثر، يمكن تهيئته لتنفيذ الخطوات. بالتالي، يمكن توجيه التجسيدات إلى أنظمة الكمبيوتر التي يتم تهيئتها لتنفيذ خطوات وفقًا لأي من الطرق الموصوفة هنا، تتضمن بشكل محتمل مكونات

مختلفة تؤدي خطوات ذات صلة أو مجموعة ذات صلة من الخطوات. على الرغم من تقديمها كخطوات مرقمة، يمكن تنفيذ خطوات الطرق الواردة هنا في نفس الوقت أو بترتيب مختلف. بالإضافة إلى ذلك، يمكن استخدام أجزاء من هذه الخطوات مع أجزاء من خطوات أخرى من طرق أخرى. أيضًا، يمكن أن تكون كل خطوة أو أجزاء منها اختيارية. بالإضافة إلى ذلك، يمكن تنفيذ أي من الخطوات وفقًا لأي من الطرق باستخدام وحدات نمطية، وحدات، دارات، أو وسائل أخرى لتنفيذ هذه الخطوات.

يمكن الجمع بين التفاصيل المحددة لتجسيدات معينة بأي طريقة مناسبة دون الابتعاد عن روح ونطاق تجسيدات الاختراع. ومع ذلك، يمكن توجيه تجسيدات أخرى للاختراع نحو تجسيدات محددة تتعلق بكل سمة فردية، أو توليفات محددة من هذه السمات الفردية.

تم عرض الوصف السابق للتجسيدات التوضيحية لأغراض التوضيح والوصف. وليس المقصود منها أن تكون شاملة أو تقيد الاختراع بالشكل الدقيق الموصوف، ويمكن إدخال العديد من التعديلات والتغييرات في ضوء التعليمات الواردة أعلاه.

من المقرر أن يشير ذكر صيغة النكرة أو المعرفة إلى "واحد أو أكثر" ما لم يُقرَّر عكس ذلك على نحو محدد. من المقرر أن يشير استخدام لفظ "أو" إلى "شاملا أو" وليس "حصريا أو" ما لم يُقرَّر عكس ذلك على نحو محدد. إن الإشارة إلى مكون "أول" لا يتطلب بالضرورة أن يُذكر هناك مكون ثاني. علاوة على ذلك، فإن الإشارة إلى مكون "أول" أو "ثاني" لا يقيّد المكون المرجعي بموقع محدد ما لم يُنَص ذلك صراحةً.

يتم دمج كل البراءات وطلبات البراءات والمنشورات والمواصفات كمرجع في مجملها لجميع الأغراض. ولا يُصرح بأي منها كفن سابق.

9. المراجع:

1.Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, Bianchi DW, Bergmann C, Borry P, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: Challenges of responsible innovation in prenatal screening. Eur J Hum Genet 2015.

2.Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y, Lau VYM, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of dna in maternal plasma. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:20458-63.

3.Jain M, Fiddes IT, Miga KH, Olsen HE, Paten B, Akeson M. Improved data analysis for the MinION nanopore sequencer. Nat Methods 2015;12:351-6.

4.Lo YMD, Chan KCA, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FMF, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. Sci Transl Med 2010;2:61ra91-61ra91.
5.Bayley H. Nanopore sequencing: From imagination to reality. Clin Chem 2015;61:25-31.
6.Zheng YW, Chan KCA, Sun H, Jiang P, Su X, Chen EZ, et al. Nonhematopoietically derived DNA is shorter than hematopoietically derived DNA in plasma: A transplantation model. Clin Chem 2012;58:549-58.
7.Lun FMF, Chiu RWK, Sun K, Leung TY, Jiang P, Chan KCA, et al. Noninvasive prenatal methylomic analysis by genomewide bisulfite sequencing of maternal plasma DNA. Clin Chem 2013;59:1583-94.
8.Chan KCA, Jiang P, Zheng YW, Liao GJW, Sun H, Wong J, et al. Cancer genome scanning in plasma: Detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. Clin Chem 2013;59:211-24.
9.Chan KCA, Jiang P, Chan CWM, Sun K, Wong J, Hui EP, et al. Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:18761-8.
10.Chan RWY, Wong J, Chan HLY, Mok TSK, Lo WYW, Lee V, et al. Aberrant concentrations of liver-derived plasma albumin mrna in liver pathologies. Clin Chem 2010;56:82-9.
11.Chan RWY, Jiang P, Peng X, Tam LS, Liao GJW, Li EK, et al. Plasma DNA aberrations in systemic lupus erythematosus revealed by genomic and methylomic sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111:E5302-11.
12.Schreiber J, Wescoe ZL, Abu-Shumays R, Vivian JT, Baatar B, Karplus K, Akeson M. Error rates for nanopore discrimination among cytosine, methylcytosine, and hydroxymethylcytosine along individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:18910-5.

قائمة التتابع:

"أ" شظايا DNA

"ب" كونكاتيمير

"ج" ترميم طرف

"د" إلحاق طرف خامل

"هـ" تذييل A

"و" شطر مباعدة

"ز" إلحاق وترميم طرف

"ح" بلازما الأم التي بها جنين أنثى

"ط" بلازما الأنثى

"ي" بلازما الأم التي بها جنين ذكر

"ك" بلازما الذكر

"ل" تكرار

"م" الحجم

"ن" مسم نانوي

"س" وحدة إنشاء متواليات Illumina

"ع" الحجم (زوج قاعدي)

"ف" الكروموسوم

"ص" hg19

"ق" HOT530

"ر" HOT536

"ش" ذكر hg19

"ت" أنثى hg19

"ث" بلازما الأم التي بها جنين ذكر (كونكاتيمير)

"خ" شظايا حمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين خالية من الخلايا

"ذ" كونكاتيميرات أو شظايا حمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين مركزة

"ض" قراءات متوالية

"أ1" عينة حيوية

302، 352 استقبال مجموعة من شظايا حمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين

304، 354 تحويل مجموعة من شظايا حمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين للحصول على كونكاتيمير أول

306 إجراء إنشاء متواليات مفردة الجزيء للوكونكاتيمير الأول للحصول على متوالية أولى من الكونكاتيمير الأول

356 تمرير الكونكاتيكير الأول خلال مسم نانوي اول

358 الكشف عن إشارات كهربائية أولى بينما يمر الكونكاتيمير خلال المسم النانوي الأول

360 تحليل الإشارات الكهربائية الأولى لتحديد المتوالية الأولى

362 محاذاة المتواليات الفرعية للمتوالية الأولى لتحدي متواليات الشظية التي تناظر كل من المجموعة الأولى من شظايا حمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين

402 استقبال متوالية أولى لكونكاتيمير أول مولدة عن طريق تحويل مجموعة أولى من شظايا حمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين إلى كونكاتيمير

404 محاذاة المتواليات الفرعية للمتوالية الأولى لتحدي متواليات الشظية التي تناظر كل شظية من المجموعة الأولى من شظايا حمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين

502 استقبال عينة حيوية تتضمن مجموعة من شظايا حمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين

504 تركيز العينة الحيوية لتتضمن تركيزاً أعلى من شظايا حمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين

506 تمرير مجموعة شظايا حمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين خلال مسام نانونية على ركيزة

508 الكشف عن الإشارات الكهربائية بينما تمر شظية حمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين خلال مسم نانوي

510 تحليل الإشارات الكهربائية الأولى لتحديد متوالية شظية حمض ريبوزي نووي المنزوع الأكسجين

1502 المريض

1504 وسيلة استخلاص

1506 وسيلة تحضير

1508 نظام إنشاء متواليات مفردة الجزيء

1510 نظام كمبيوتر

71 وحدة تحكم في إدخال/إخراج

72 ذاكرة النظام

73 معالج مركزي

74 طابعة

	85	جهاز جمع بيانات
	82	موائم وحدة عرض
	77	منفذ إدخال/إجراج
	78	لوحة إدخال
5	79	جهاز/أجهزة تخزين
	81	واجهة بينية خارجية
	76	شاشة

عناصر الحماية

1- طريقة تشمل:

استخلاص مجموعة من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid (DNA) من عينة حيوية آتية من كائن، حيث تتضمن العينة الحيوية سائل من الجسم يشمل شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا؛

تحويل مجموعة أولى من مجموعة شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا لكونكاتيمير concatemer للحصول على كونكاتيمير concatemer أول، حيث تكون شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا من المجموعة الأولى لها متواليات مختلفة وتكون من مواقع مختلفة في چينوم genome الكائن؛ و

إنشاء متواليات لجزيء مفرد للكونكاتيمير concatemer الأول للحصول على متوالية أولى للكونكاتيمير concatemer الأول، وتتضمن المتوالية الأولى المتواليات المختلفة من المجموعة الأولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا في صورة متواليات فرعية في المتوالية الأولى.

2- الطريقة طبقًا لعنصر الحماية 1، تشمل أيضًا:

توفير الكونكاتيمير concatemer الأول إلى وسيلة إنشاء متواليات sequencing device كجزء من تنفيذ عملية إنشاء متواليات لجزيء مفردsingle-molecule sequencing؛ و

الكشف، باستخدام وسيلة إنشاء المتواليات sequencing device، عن مجموعة من الإشارات المناظرة للكونكاتيمير concatemer الأول، وتناظر مجموعة الإشارات المتوالية الأولى للكونكاتيمير concatemer الأول.

3- الطريقة طبقًا لعنصر الحماية 2، حيث تتضمن وسيلة إنشاء المتواليات sequencing device مسم نانوي أول، حيث تشتمل الطريقة أيضًا على:

تمرير الكونكاتيمير concatemer الأول خلال المسم النانوي nanopore الأول؛ و

الكشـف عن إشـارات كهربائية electrical signals أولى بينما يمر الكونكاتيمير concatemer الأول خلال المسـم النانوي nanopore الأول، تناظر الإشـارات الكهربائية electrical signals الأولى المتوالية الأولى للكونكاتيمير concatemer الأول، حيث تشـتمل مجموعة الإشـارات على الإشـارات الكهربائية electrical signals الأولى.

4- الطريقة وفقًا لعنصـر الحماية 3، حيث تشـتمل أيضًـا على تنفيذ، بواسـطة نظام كمبيوتر computer system:

تحليل الإشارات الكهربائية electrical signals الأولى لتحديد المتوالية الأولى؛ و

محاذاة متواليات فرعية للمتوالية الأولى لچينوم مرجعي reference genome لتحديد متواليات شـظية fragment sequences مناظرة لكل من المجموعة الأولى من شـظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخلية من الخلايا.

5- الطريقة وفقًا لعنصـر الحماية 3، حيث تتضـمن خطوة تمرير الكونكاتيمير concatemer الأول خلال المسم النانوي الأول:

تمرير جديلة أولى للكونكاتيمير concatemer الأول خلال المسم النانوي nanopore الأول؛ و

لاحقا، تمرير جديلة ثانية للكونكاتيمير concatemer الأول خلال المسم النانوي الأول.

6- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية 5، حيث تشتمل أيضًا على

تحليل، بواسـطة نظام كمبيوتر computer system، للإشـارات الكهربائية electrical signals الأولى للجديلة الأولى والجديلة الثانية لتحديد المتوالية الأولى.

7- الطريقة وفقًا لعنصـر الحماية 3، حيث يكون المسـم النانوي الأول عبارة عن واحد من مجموعة من المسام النانوية على ركيزة substrate.

8- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية 7، حيث تشتمل أيضًا على:

تحويل مجموعة ثانية من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا للحصول على كونكاتيمير concatemer ثاني؛

تمرير الكونكاتيمير concatemer الثاني خلال مسم نانوي ثاني لمجموعة من المسام النانوية؛ و

الكشف عن مجموعة من الإشارات الكهربائية electrical signals الثانية بينما يمر الكونكاتيمير concatemer خلال المسم النانوي الثاني، تناظر الإشارات الكهربائيةelectrical signals الثانية متوالية ثانية للكونكاتيمير concatemer الثاني.

9- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية 2، حيث تشتمل أيضًا على:

تهجين نوكليوتيد موسوم بمادة فلورية fluorescent-labeled nucleotide في الكونكاتيمير concatemer الأول، و

الكشف عن إشارة فلورية fluorescent signal، تناظر الإشارة الفلورية fluorescent signal نوكليوتيد nucleotide.

10- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية 1، حيث تشتمل أيضًا على تنفيذ، بواسطة نظام كمبيوتر computer system :

محاذاة متواليات فرعية subsequences للمتوالية الأولى لجينوم مرجعي reference genome لتحديد متواليات شظية fragment sequences مناظرة لكل من المجموعة الأولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا.

11- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية 10، حيث تشتمل أيضًا على:

تحديد حجم كل من المجموعة الأولى من العدد الوافر من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا بناءً على محاذاة المتواليات الفرعية.

12- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية 10، حيث:

تشتمل خطوة تحويل المجموعة الأولى من العدد الوافر من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا إلى كونكاتيمير concatemer على تحويل

المجموعة الأولى من العدد الوافر من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجينdeoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا ومجموعة ثانية لشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا التي تتضمن متواليات معروفة إلى كونكاتيميرات concatemers، حيث يتم نثر المجموعة الثانية من العدد الوافر من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا ضمن المجموعة الأولى من العدد الوافر من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا، و

تشتمل خطوة محاذاة متواليات فرعية للمتوالية الأولى على محاذاة متواليات فرعية بالمتواليات المعروفة لتحديد مواقع المجموعة الثانية من العدد الوافر من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا في الكونكاتيمير concatemer الأول.

13- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية 12، حيث تعمل عملية التحويل إلى كونكاتيميرات concatemers على وضع شظية واحدة من الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid للمجموعة الثانية من العدد الوافر من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا بين شظيتي الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid للمجموعة الأولى من العدد الوافر من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا.

14- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية 13، حيث تشتمل أيضًا على تنفيذ، بواسطة نظام الكمبيوتر computer system:

تحديد، بواسطة نظام الكمبيوتر computer system، قاعدة بداية لمجموعة فرعية أولى تناظر شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid أولى للمجموعة الأولى من العدد الوافر من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا بناءً على تحديد واحدة من المتواليات المعروفة للمجموعة الثانية من العدد الوافر من

شـظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسـجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا التي تكون قبل المتوالية الفرعية الأولى؛ و

تحديد، بواسـطة نظام الكمبيوتر computer system، قاعدة نهاية للمجموعة الفرعية الأولى التي تناظر شـظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسـجين deoxyribonucleic acid الأولى للمجموعة الأولى من العدد الوافر من شـظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسـجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا بناءً على تحديد واحدة من المتواليات المعروفة للمجموعة الثانية من العدد الوافر من شـظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسـجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا التي تكون قبل المتوالية الفرعية الأولى.

15- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية 12، حيث تشتمل كل شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid للمجموعة الثانية من العدد الوافر من الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسـجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا على متوالية معروفة من 1- 7 نوكليوتيدات nucleotides.

16- الطريقة وفقًا لعنصـر الحماية 12، حيث تتضـمن كل من المجموعة الثانية من العدد الوافر من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجينا deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا نفس المتوالية المعروفة.

17- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية 10، حيث تتضمن خطوة محاذاة المتواليات الفرعية:

محاذاة نوافذ منزلقة sliding windows للمتوالية الأولى بالچينوم المرجعي reference genome ، تناظر كل نافذة منزلقة sliding window متوالية فرعية subsequence تم محاذاتها بالچينوم المرجعي reference genome؛ و

تحديد متى تتحاذى النوافذ المنزلقة sliding windows بالمناطق المختلفة للچينوم المرجعي reference genome لتمييز متواليات شـظيتي الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسـجين deoxyribonucleic acid للمجموعة الأولى من العدد الوافر من شـظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا.

18- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية 17، حيث تشتمل أيضًا على تنفيذ، بواسطة نظام كمبيوتر computer system:

تحديد نهاية وبداية متوالية فرعية أولى لشظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid أولى للمجموعة الأولى من العدد الوافر من الشظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا بناءً على النافذتين المنزلقتين المتحاذيتين sliding windows مع المناطق المختلفة للچينوم المرجعي reference genome.

19- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية 17، حيث تشتمل المناطق المختلفة للچينوم المرجعي reference genome على مناطق على الكروموسومات chromosomes المختلفة.

20- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية 17، حيث يتم تحديد نافذة واحدة أو النوافذ بين نافذتين منزلقتين sliding windows على أنهما غير متحاذيتين بالچينوم المرجعي reference genome.

21- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية 20، حيث تشتمل أيضًا على تحديد حجم شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الأولى بالمجموعة الأولى من العدد الوافر من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا، حيث تشتمل خطوة تحديد حجم شظية الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الأولى على:

تحديد طول أطول متوالية فرعية تحاذي منطقة مفردة من الچينوم المرجعي reference genome.

22- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية 1، حيث تكون العينة الحيوية biological sample عبارة عن بلازما plasma أو مصل serum.

23- طريقة تشتمل على تنفيذ بواسطة نظام كمبيوتر computer system:

استقبال متوالية أولى لكونكاتيمير concatemer أول يولَّد بواسطة تحويل مجموعة أولى من عدد وافر من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا لكونكاتيمير concatemer من عينة حيوية آتية من كائن، حيث تتضمن العينة الحيوية سائل من الجسم يشمل شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا، وحيث تكون شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا من المجموعة الأولى لها متواليات مختلفة وتكون من مواقع مختلفة في چينوم الكائن؛ و

محاذاة متواليات فرعية للمتوالية الأولى لتحديد متواليات الشظية fragment sequences التي تناظر كل شظية من الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid لمجموعة أولى من مجموعة شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا.

24- الطريقة طبقًا لعنصر الحماية 23، حيث:

يتم توليد الكونكاتيمير concatemer الأول من خلال تحويل المجموعة الأولى من شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا لكونكاتيمير concatemer ومجموعة ثانية من مجموعة شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا، و

تشتمل محاذاة المتواليات الفرعية للمتوالية الأولى على محاذاة المتواليات الفرعية subsequences للمجموعة الثانية من مجموعة شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا.

25- الطريقة طبقًا لعنصر الحماية 24، حيث تشتمل كل شظية من الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid للمجموعة الثانية من مجموعة شظايا الحمض الريبوزي النووي المنزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid الخالية من الخلايا على متوالية معروفة من 1- 7 نوكليوتيدات nucleotides.

26- الطريقة طبقًا لعنصـــر الحماية 23، حيث تشـــتمل محاذاة المتواليات الفرعية subsequences للمتوالية الأولى على محاذاة المتواليات الفرعية لچينوم مرجعي reference genome.

27- الطريقة طبقًا لعنصر الحماية 26، حيث تتضمن محاذاة المتواليات الفرعية :

محاذاة نوافذ المتوالية الأولى للچينوم المرجعي reference genome؛ و

تحديد متى تتحاذى نافذتين مع المناطق المختلفة للچينوم المرجعي reference genome.

28- الطريقة طبقًا لعنصـــر الحماية 27، حيث يتم تحديد نافذة واحدة أو النوافذ بين النافذتين بأنها لا تحاذي الچينوم المرجعي reference genome.

29- منتج كمبيوتر computer product يشتمل على وسط مقروء بكمبيوتر computer readable mediumيخزن مجموعة من التعليمات للتحكم في نظام الكمبيوتر computer system لتنفيذ عملية طبقًا لأي من عناصر الحماية 23-28.

30- نظام يشتمل على:

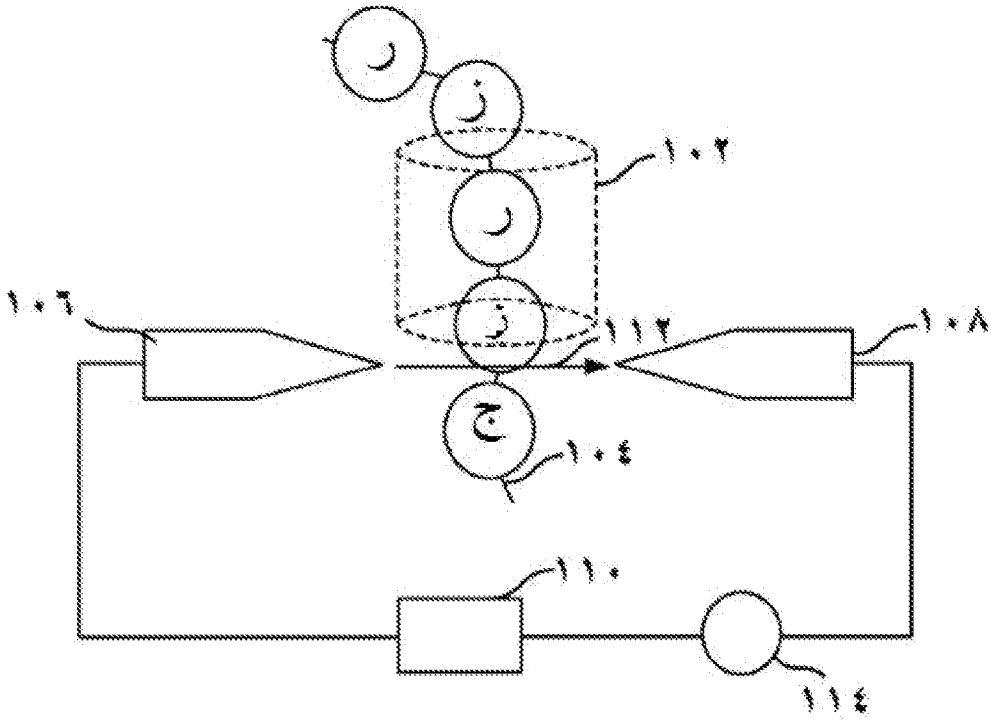
منتج الكمبيوتر وفقًا لعنصر الحماية 29؛ و

معالج أو المعالجات لتنفيذ التعليمات المخزنة على الوسط المقروء بالكمبيوتر computer readable medium.

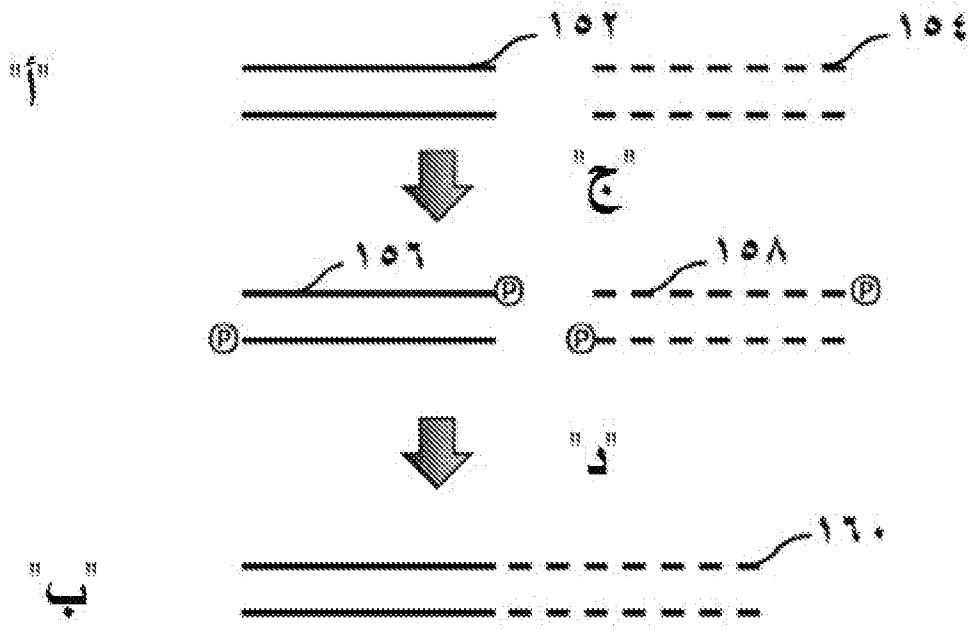
31- نظام يشتمل على وسيلة للتنفيذ طبقًا لأي من عناصر الحماية 23-28.

32- نظام مهيأ للتنفيذ طبقًا لأي من عناصر الحماية 23-28.

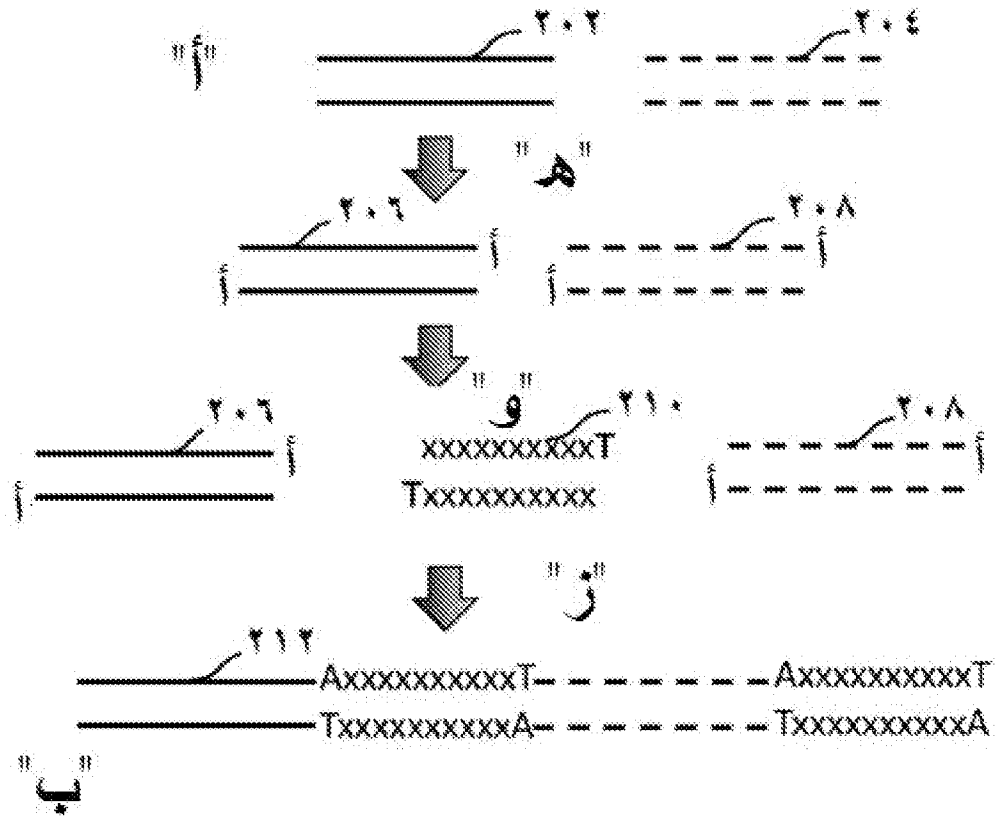
33- نظام يشتمل على وحدات نمطية تقوم على التوالي بتنفيذ الخطوات طبقًا لأي من عناصر الحماية 23-28.



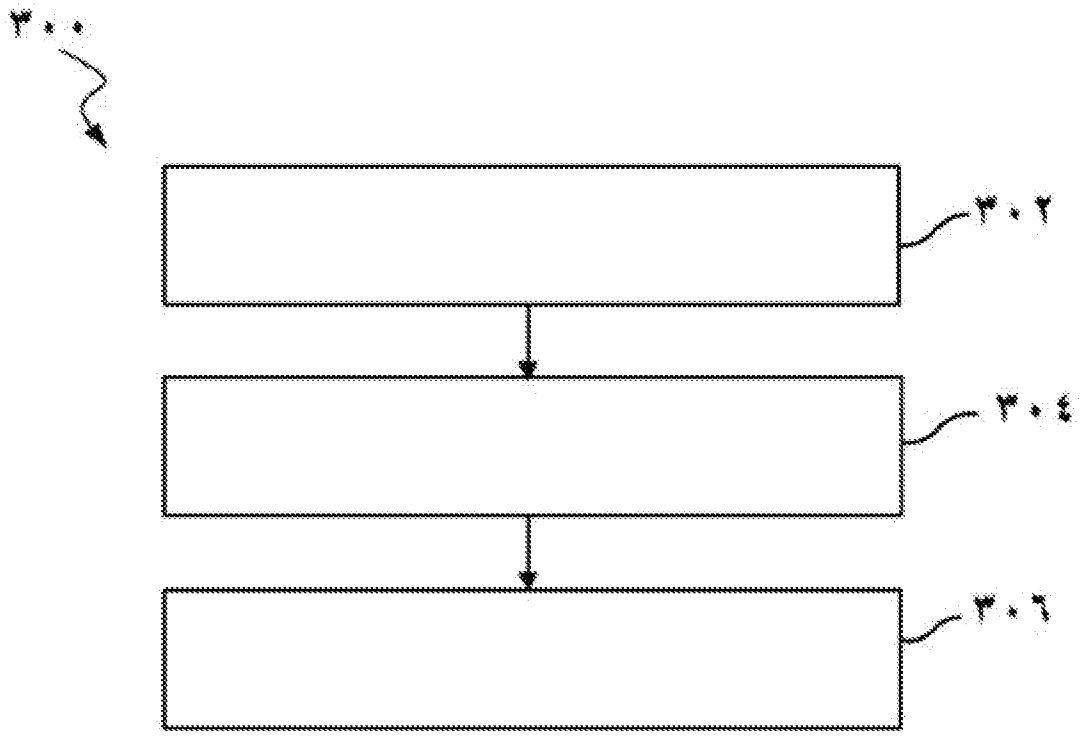
شكل ١١أ



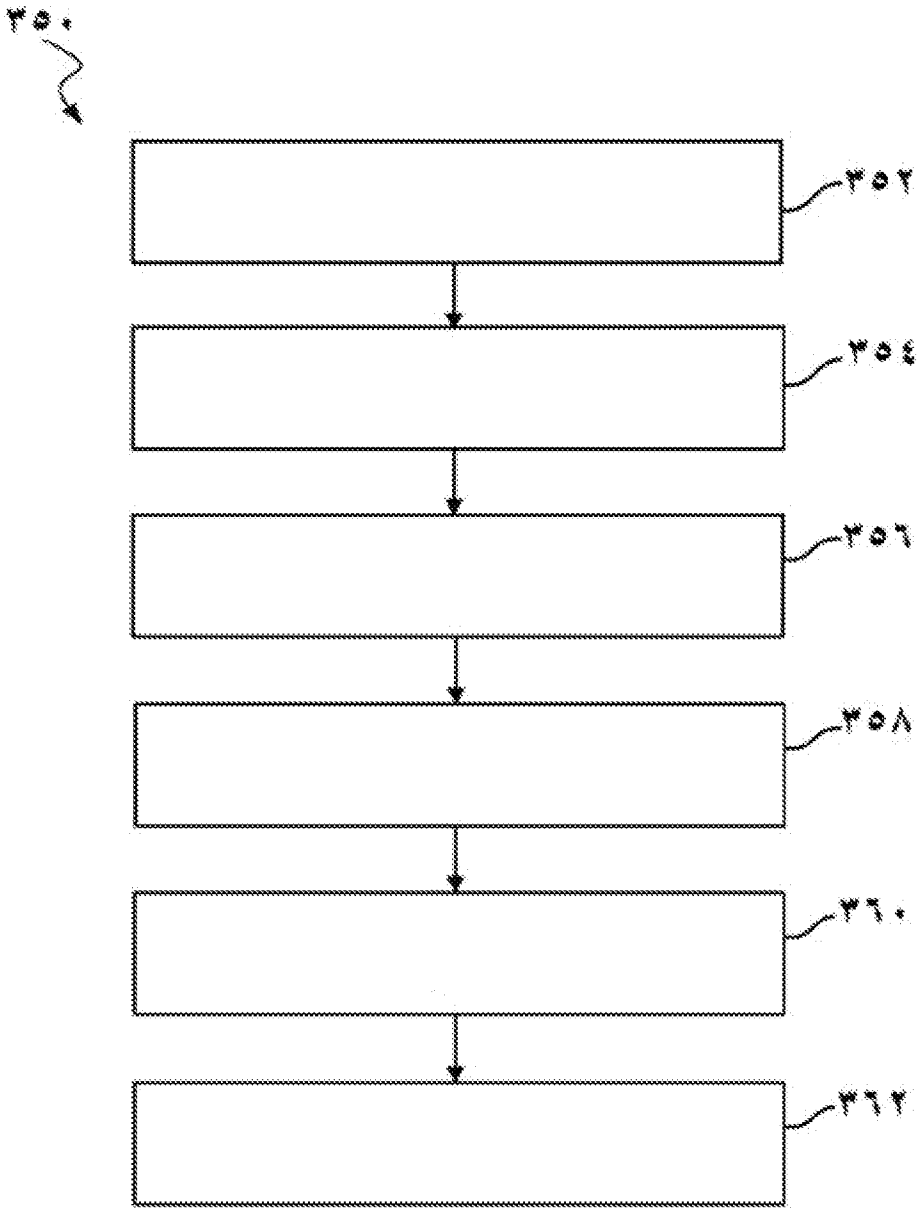
شكل ١ب


"أ"
٢٠٢
٢٠٤
"هـ"
٢٠٦
٢٠٨
أ
أ
أ
أ
"و"
٢١٠
٢٠٦
٢٠٨
xxxxxxxxxT
Txxxxxxxxx
"ز"
٢١٢
Axxxxxxxxxx
Txxxxxxxxx
"ب"

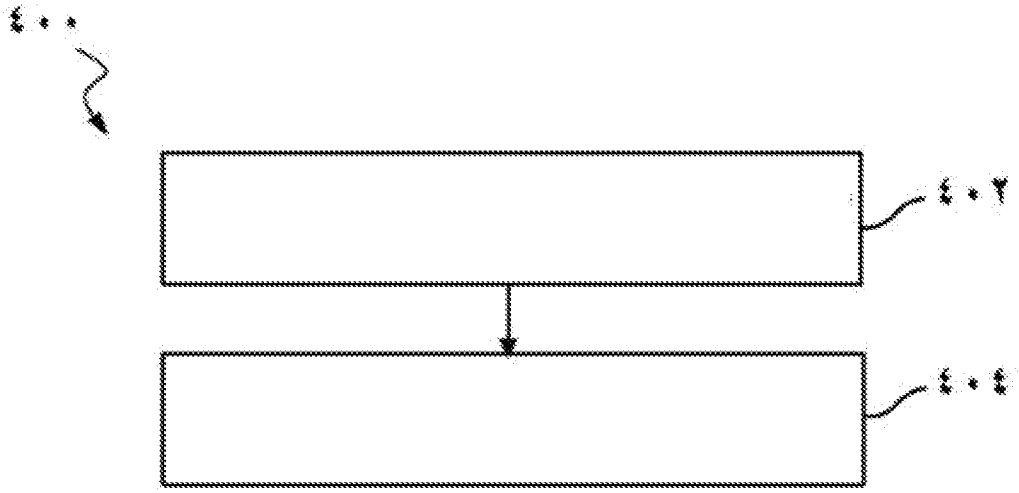
شكل ٢



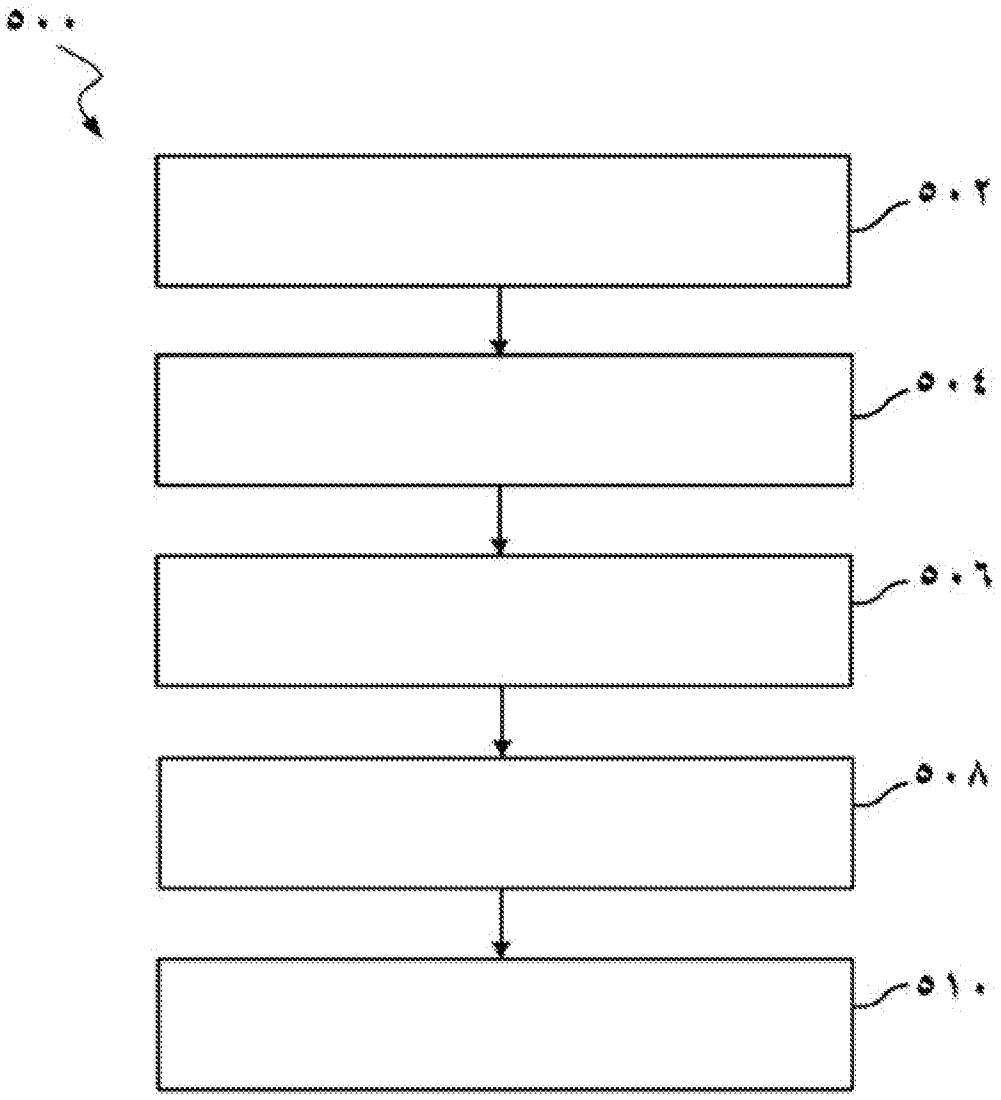
شكل ٣أ



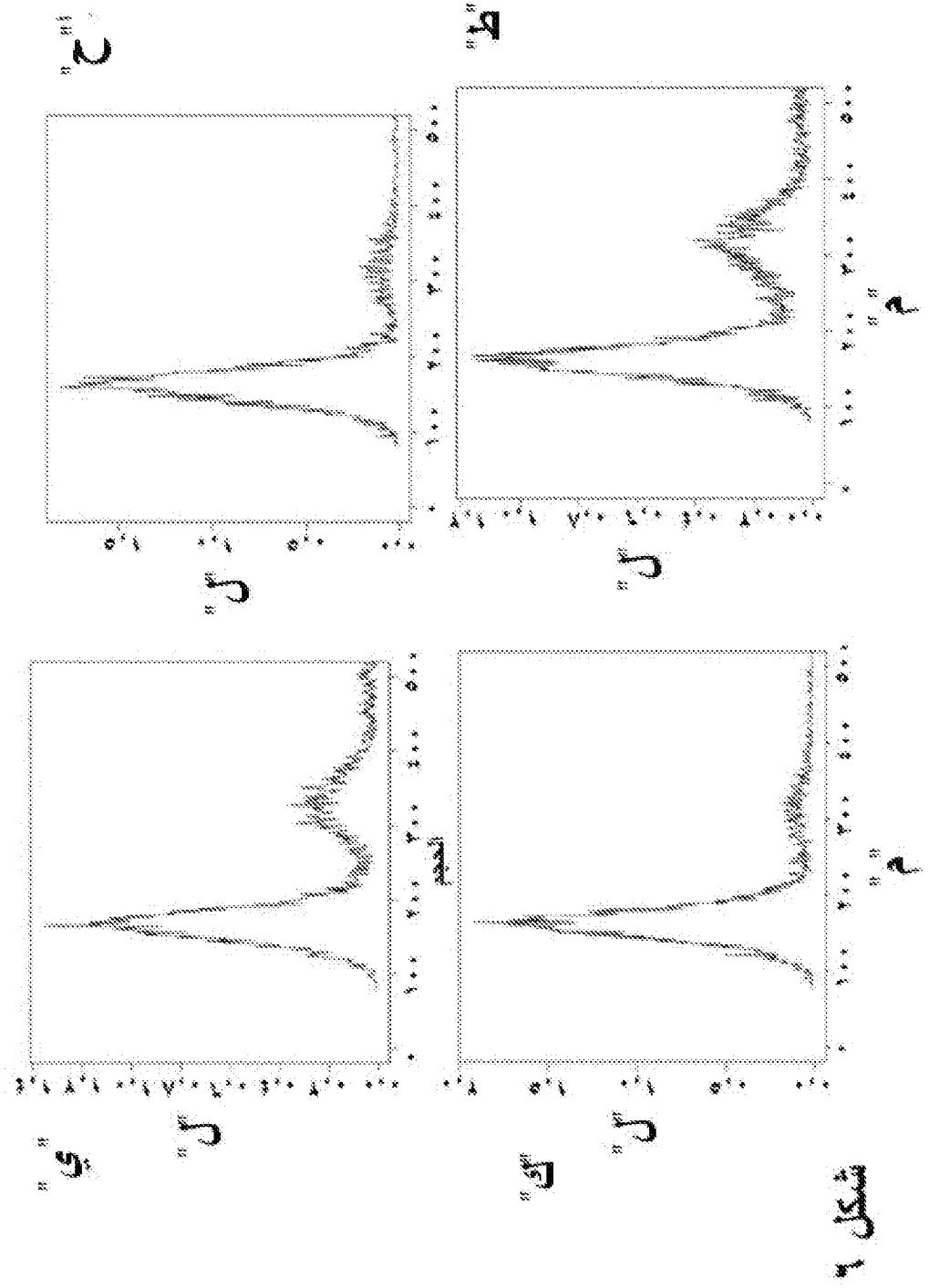
شكل ٣ب



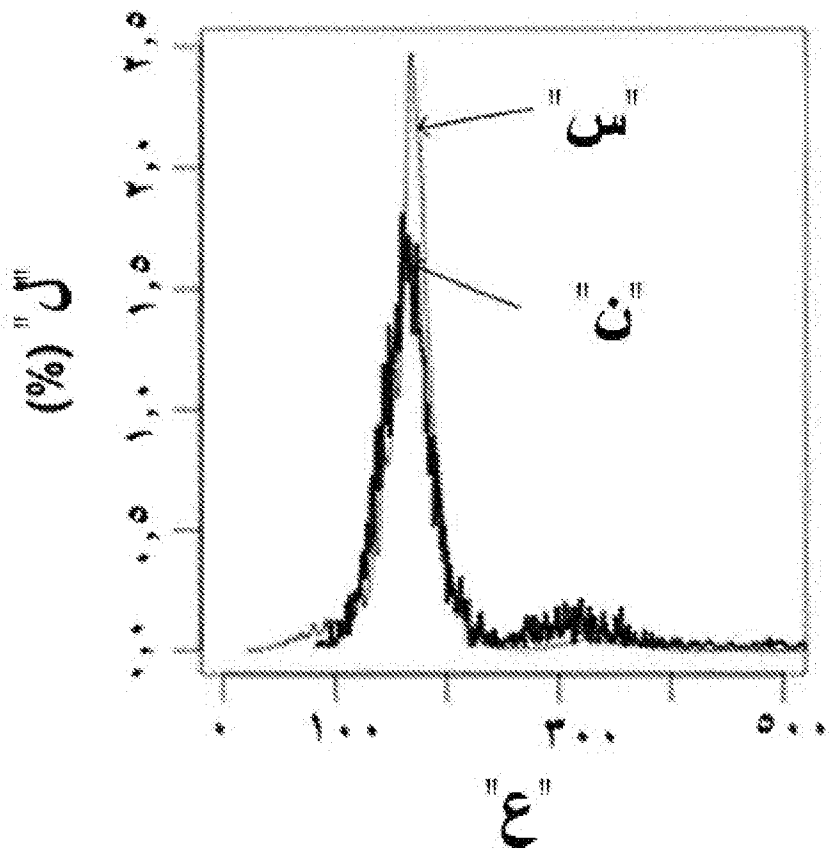
شكل ٤



شكل ٥

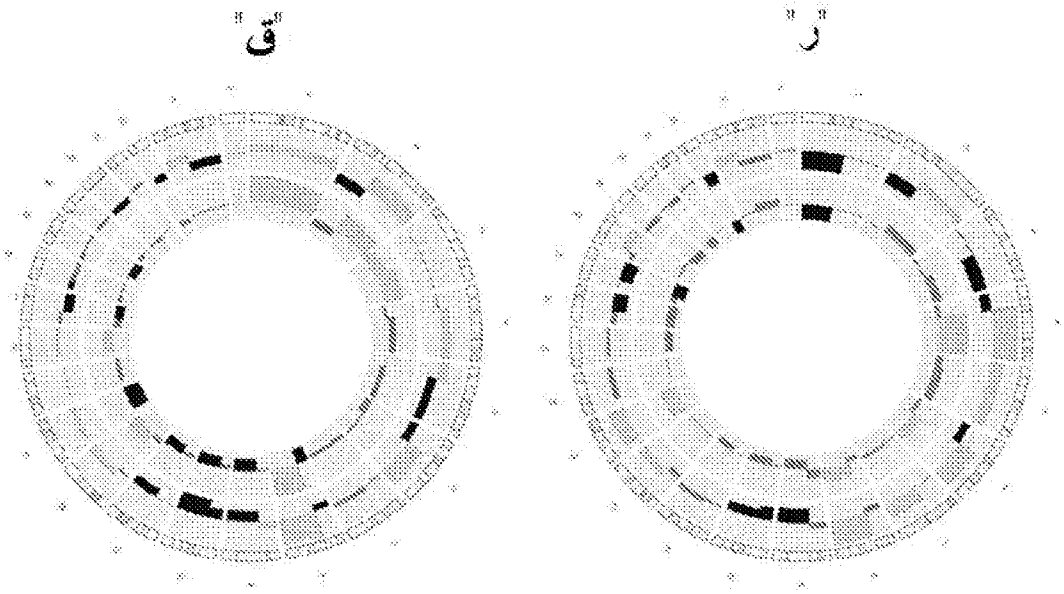


شکل ۳

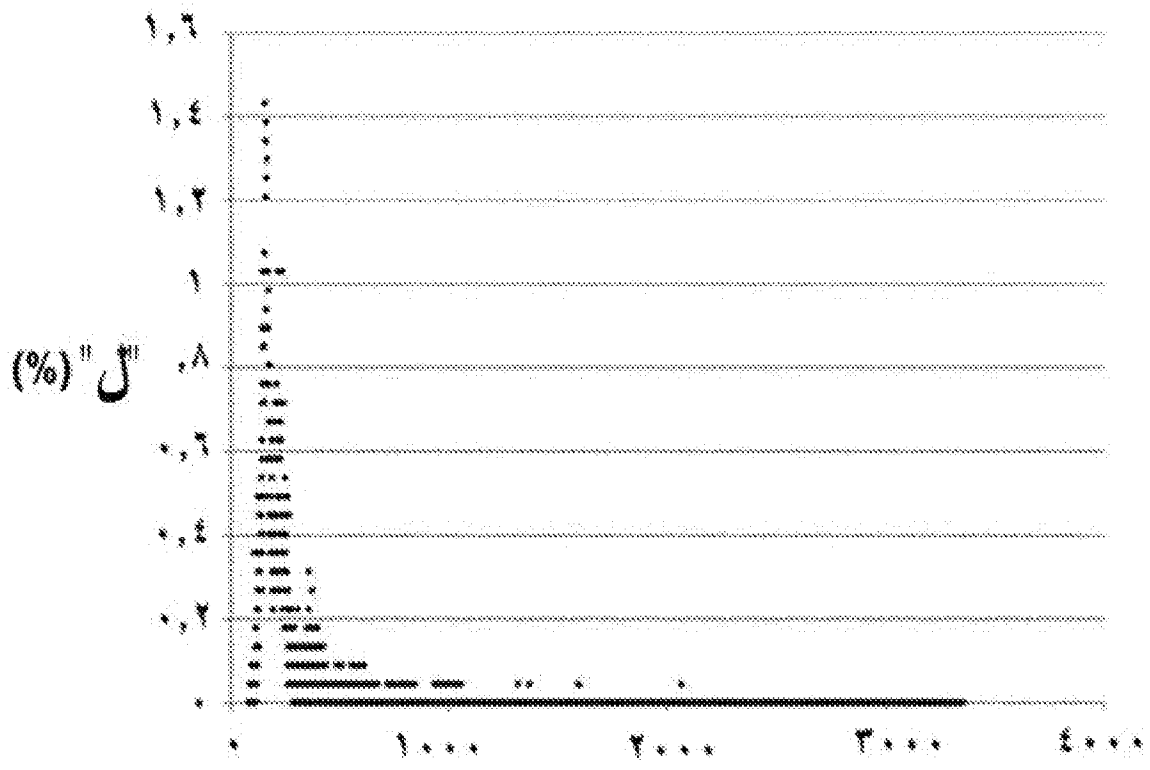


شكل ٧

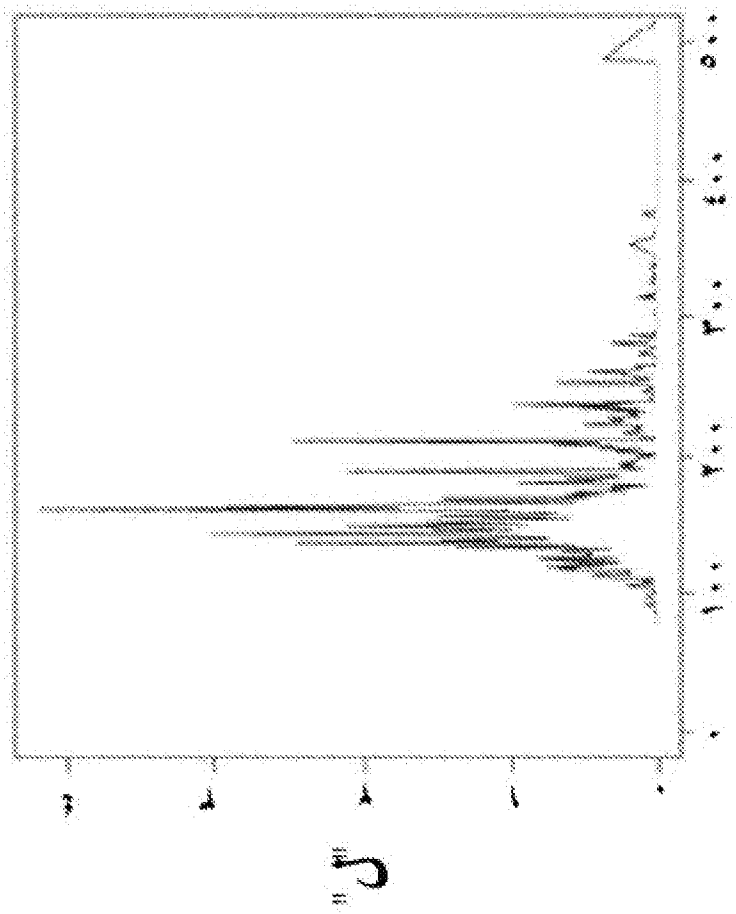
شکل ۸



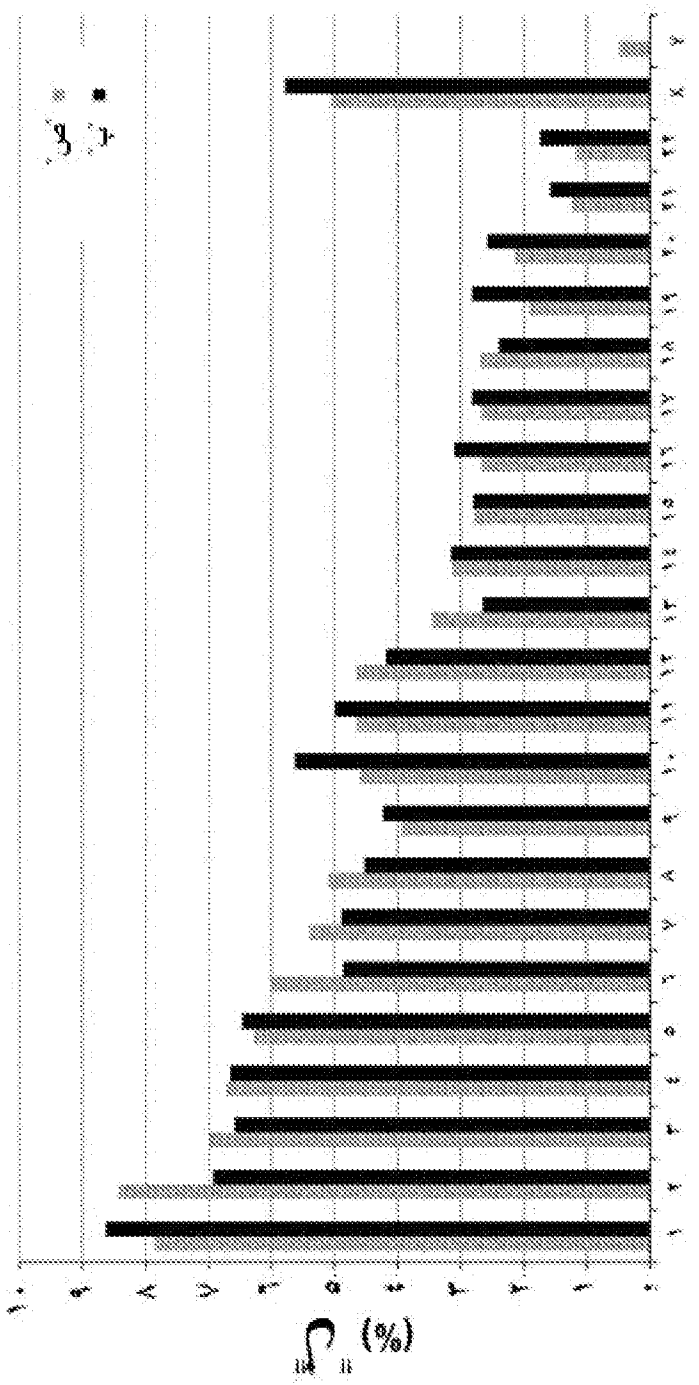
شكل ٩



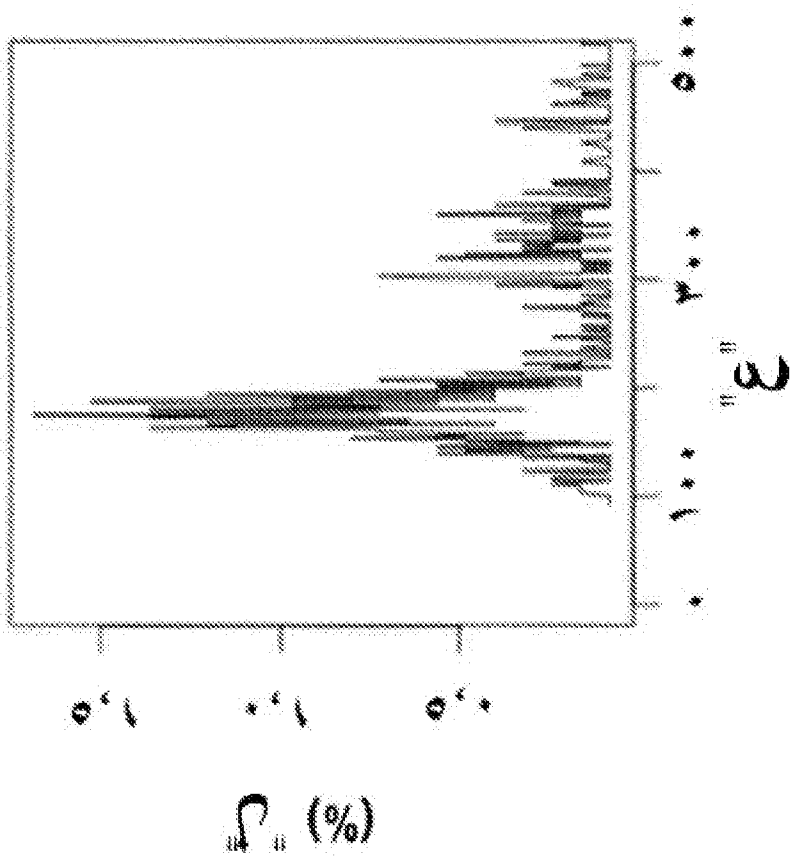
شكل ١٠



شكل ١١

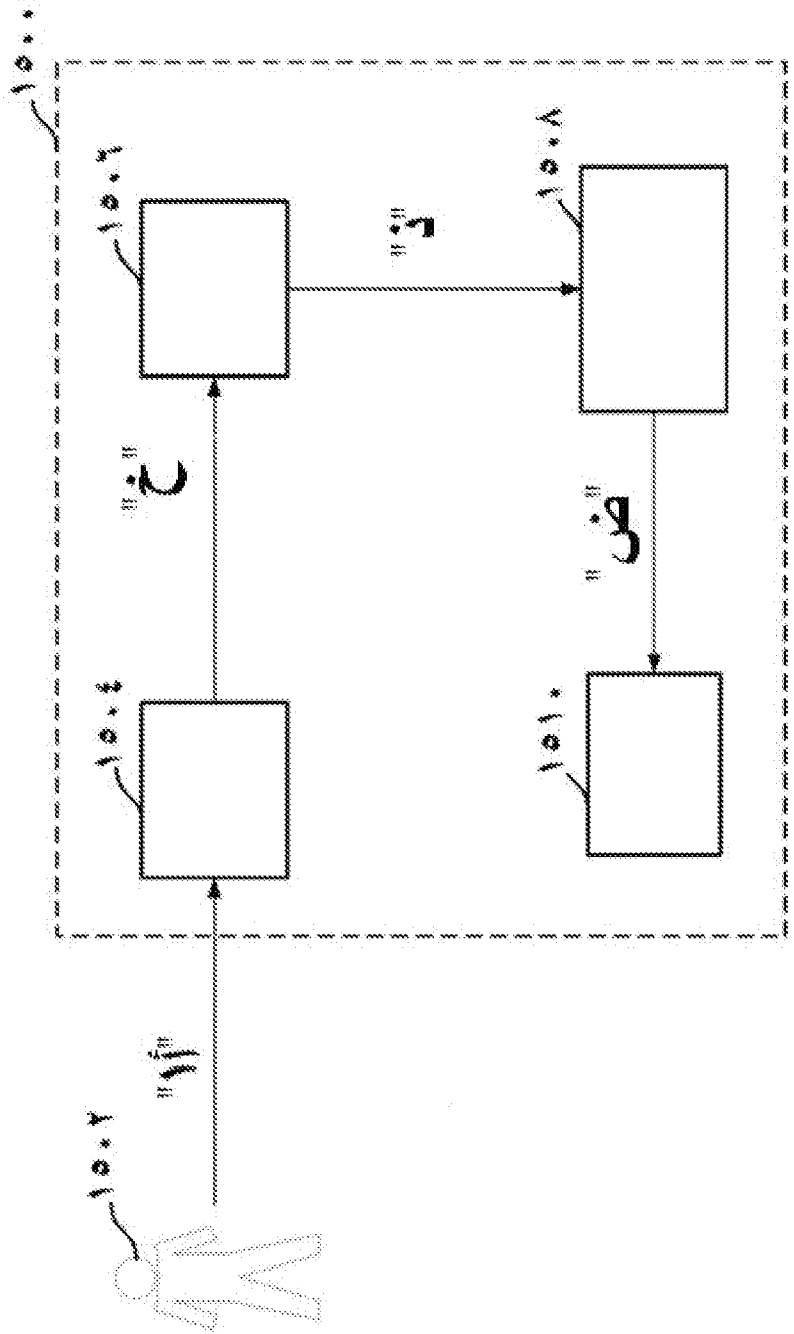


شکل ۱۲

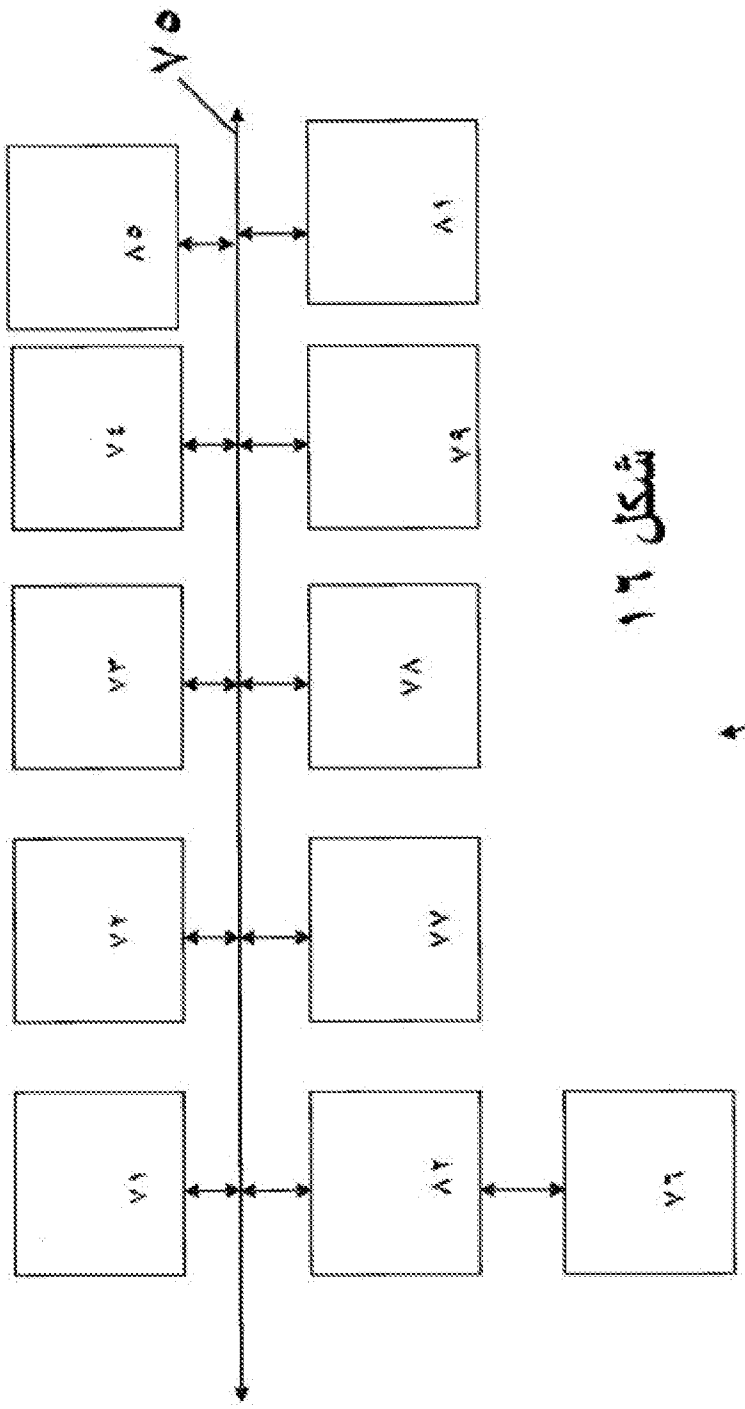


شكل ١٣

شکل ۱۴



شكل ١٥



شكل ١٢

مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشـرط تسـديد المقابل المالي السـنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سـقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية.

صادرة عن

الهيئة السعودية للملكية الفكرية

ص ب ٦٥٣١ ، الرياض ١٣٣٢١ ، المملكة العربية السعودية

SAIP@SAIP.GOV.SA