



المملكة العربية السعودية
Kingdom of Saudi Arabia



الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

براءة اختراع

إن الرئيس التنفيذي للهيئة السعودية للملكية الفكرية وبموجب أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطة للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/27 وتاريخ 1425/05/29هـ والمعدل بقرار مجلس الوزراء رقم 536 وتاريخ 1439/10/19هـ، ولأحته التنفيذية، يقرر منح:

ماست جروب ليمتد
MAST GROUP LIMITED

بتاريخ: 1442/05/28 هـ

براءة اختراع رقم: SA 7466

الموافق: 2021/01/12 م

عن الاختراع المسمى:

مسبار حمض نووي له رمز حامل للتألق مفرد مرتبط بسيتوسين داخلي للاستخدام في تضخيم ثابت درجة الحرارة ناتج عن حلقة

Nucleic Acid Probe with Single Fluorophore Label Bound to Internal Cytosine for Use in Loop Mediated Isothermal Amplification

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

مسبار حمض نووي له رمز حامل للتألق مفرد مرتبط بسيتوسين داخلي للاستخدام في تضخيم ثابت درجة الحرارة ناتج عن حلقة

Nucleic Acid Probe with Single Fluorophore Label Bound to Internal Cytosine for Use In Loop Mediated Isothermal Amplification

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع الحالي بمسبار probe لكشف حمض نووي nucleic acid ، طريقة تستخدم المسبار المذكور وطاقم من أجزاء. بشكل مفضل يكون المسبار الخاص بالاختراع مفيداً في طريقة لكشف الأحماض النووية nucleic acids المشتقة من Chlamydia trachomatis و/ أو Neisseria gonorrhoeae ويمكن الاستخدام في تشخيص إصابات Chlamydia و/ أو Gonorrhoea. 5

يكون تضخيم amplification الحمض النووي أحد أكثر الأدوات قيمة في مجال علوم الحياة، بما في ذلك مجالات موجهة للتطبيق مثل دواء سريري، حيث به يتم الاستفادة من تشخيص أمراض معدة infectious diseases ، اضطرابات وراثية genetic disorders وسمات وراثية genetic traits بشكل خاص. بالإضافة إلى كشف أساس تفاعل البوليميراز المتسلسل 10

Polymerase chain reaction (PCR) المستخدم على نطاق واسع (Saiki R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.B., Horn,G.T., Erlich,H.A. and Arnheim,N. Science, 230, 1350–1354 (1985))، تم اختراع طرق تضخيم متعددة. تشمل الأمثلة على تضخيم أساس متواليه حمض نووي nucleic acid sequence–based amplification (NASBA)، تكرار متواليه ذاتية الاستمرار sequence replication (3SR) وتضخيم ثابت درجة الحرارة ناتج عن حلقة loop–mediated isothermal amplification (LAMP). 15

يستخدم PCR التسخن بالحرارة لمنتجات مزدوجة الجديدة لتعزيز الدورة التالية من تخليق الحمض النووي. تقوم 3SR و NASBA بإزالة تسخن الحرارة باستخدام مجموعة من تفاعلات الاستنساخ والاستنساخ العكسي لتضخيم المتواليه المستهدفة amplify the target sequence.

تتعلق براءة الاختراع الأوروبية رقم 0515194 بمسبار والذي يكون تكميلي ولرصد متواليه E.coli مستهدفة. يحتوي المسبار على C مع فلوروفور fluorophore عند موقع 17 من 30 nT. وتتغير فلورية المسبار fluorescence of the probe عندما يقوم المسبار بتهجين المتواليه المستهدفة hybridises to the target sequence.

5 وثيقة IKEDA S ET AL تحت عنوان "سيتيدين مضاعف ثيازول يحمل علامة برتقالية اللون للتوسع الوظيفي لمسبار حساس للتهجين " (Doubly thiazole orange-labeled cytidine) (expansion of a hybridization-sensitive probe for functional LETTERS, PERGAMON, GB, vol. 50, no. 51 TETRAHEDRON

بتاريخ 23 ديسمبر 2009، تتعلق بعدد من المسبارات probes مع 13 نيوكليوتيد nucleotides ، فيها سيتوسين cytosine عند الموقع 7 يحمل علامة مع اثنين من جزيئات ثيازول thiazole بصبغة برتقالية. أظهرت المسبارات فلورية قوية strong fluorescence عند التهجين hybridisation مع الهدف وإطفاء في الحالة فردية الشرائط single stranded.

تتعلق براءة الاختراع الأوروبية رقم 2635560 بعدد من المجسات مع فلوروفور فردي single fluorophore مرتبط بسيتوسين cytosine عند طرف أو موقع 3 من طرف-3 لرصد طفرة V600 في BRAF (انظر المتواليه 10 رقم 10). وتم ذكر أن المتواليه المستهدفة قد يتم تضخيمها بمواد بادئة primers.

تتعلق براءة الاختراع الأوروبية رقم 2574680 بعدد من المسبارات مع فلوروفور فردي مرتبط بسيتوسين عند طرف أو مرتبطة ب TAMRA مرتبط بسيتوسين في الموقع 2 من طرف-5' للمسبار (انظر المتواليه 10 رقم: 22). ويتم استخدام المسبارات لرصد SNP في PIK3CA. وتم ذكر أن المتواليه المستهدفة من الممكن أن يتم تضخيمها بمواد بادئة.

تتعلق براءة الاختراع الأوروبية رقم 2218780 بطريقة لتحديد بنية Neisseria وحثية Chlamydia التي تستخدم تضخيم LAMP ومسبارات إطفاء quenching probes. الوسط الذي يتم فيه توفير هذه المسبارات يشتمل على 2.1 ملليمتر من كل من النيوكليوتيدات

، nucleotides ، KCl ، (NH₄hSO₄ و MgSO₄ بتركيزات تبلغ 12 أو 15 ملليمتر، Tris-HCl بتركيز 30 ملليمتر.

5 يمكن لتلك الطرق تضخيم الأحماض النووية المستهدفة إلى مقدار مشابه، وكلها بحد كشف أقل من 10 نسخ وخلال ساعة وما إلى ذلك. وتتطلب إما معدة دقيقة للتضخيم وطريقة دقيقة لكشف المنتجات المضخمة بسبب ضعف تخصيص اختيار متوالية مستهدفة. بالرغم من التبسيط ومقدار التضخيم الذي يمكن الحصول عليه، تمنع الحاجة لوحدة تدوير حرارية عالية الدقة في PCR تلك الطريقة القوية من الاستخدام على نطاق واسع، مثل في العيادات الخاصة كأداة تشخيص روتينية. وعلى النقيض، تكون تضخيم ثابت درجة الحرارة ناتج عن حلقة loop-mediated isothermal amplification (LAMP) عبارة عن طريقة يمكن أن تضخم نسخ قليلة من DNA لأكثر من 100 في أقل من ساعة تحت ظروف ثابت درجة الحرارة وبتخصيص أكبر.

كما هو الحال مع تقنيات أساس مسبار جزيئي molecular-probe أخرى معرفة أعلاه، يمكن استخدام تجارب تضخيم ثابت درجة الحرارة ناتج عن حلقة (LAMP) لكشف وجود كائنات مجهرية microorganisms خاصة في عينة. مع ذلك، تعتمد طرق الكشف على الكشف البصري المباشر، العكارة وعن طريق صبغة إقحام intercalating dye غير مخصصة. يكون القياس البصري المباشر هو قياس نقطة نهاية ولا يستطيع توفير تحليل بالزمن الفعلي. وتوفر العكارة 15 وصبغات الإقحام غير المخصصة تحليل زمن فعلي للتضخيم الذي يحدث ومع ذلك يكون غير مخصص أي يتم كشف كل التضخيمات سواء كان تضخيم إيجابي حقيقي أو تضخيم زائف بسبب فقد البادئ، التخصيص العرضي.

الوصف العام للاختراع

20 وفقاً لسمة أولى من الاختراع الحالي يتم تقديم مسبار لتضخيم حمض نووي ثابت درجة الحرارة يشتمل على متوالية مسبار أوليجونيكلو تيد oligonucleotide probe مكتملة لمنطقة متوالية حمض نووي مستهدف، حيث يكون بمتوالية مسبار الأوليجونيكلو تيد المذكورة جزء ربط حامل تألق واحد فقط وحيث يرتبط جزء الربط بقاعدة سيتوسين داخلية وحيث لا يكون بمتوالية مسبار الأوليجونيكلو تيد المذكورة فاصل طرف 3'.

في نموذج مفضل تكون متوالية مسبار أوليجونيوكلوتيد عبارة عن متوالية DNA وتكون متوالية الحمض النووي المستهدف عبارة عن متوالية DNA.

بشكل مفضل، يزيد التألق للإشارة إلى وجود الحمض النووي المستهدف في عينة.

شرح مختصر للرسومات

- 5 الشكل 1: عبارة عن رسم تخطيطي لمسبار DNA من الاختراع. يتكون المسبار من أوليجونيوكلوتيد مع سيتوسين داخلي مترافق مع حامل تألق محدد. يمكن أن يكون المسبار مكمل للمنطقة الداخلية للأمبليكون amplicon المصحح بواسطة بواى Fip و Bip ويمكن أن تكون عبارة عن بواى LoopF و LoopB معدّل مرمز داخلياً باستخدام حامل تألق.
- الأشكال 2 إلى 2و: مخططات تضخيم مولدة باستخدام بواى CT PB1.
- 10 الأشكال 3 و 3ب : عبارة عن تحليلات لمنحنى انصهار منتجات LAMP مولدة باستخدام بواى CT PB1 في وجود مسبار CT PB1 داخلي مترافق مع FAM.
- الأشكال 4 و ب : عبارة عن تحليلات لمنحنى انصهار منتج LAMP مولد باستخدام بواى GC glnA7 في وجود مسبار حلقة GC glnA7 مترافق مع JOE.
- الأشكال 5 و 5ب عبارة عن تحليلات لمنحنى انصهار منتج LAMP مولد باستخدام بواى GC PorA7 في وجود مسبار حلقة GC PorA7 مترافق مع ALEXA546.
- 15 الأشكال 6 إلى 6د : نتائج اختبار لتأكيد تخصيص منتج DNA باستخدام مسبار من الاختراع في تضخيم ثابت درجة الحرارة ناتج عن حلقة.
- الشكل 7 : مخططات التضخيم مولدة باستخدام بواى CT PB1 في محلول منظم V6.21 يحتوي على V13 ومحلول منظم V6.21p بدون صبغة V13 لكن في وجود مسبار طرف CT PB1 (مكمل لمنطقة الحلقة) باستخدام مترافق C داخلي مع FAM وفاصل 3' (3'ddC)
- 20 الأشكال 8 و 8ب: مخططات التضخيم المولدة في محلول منظم V6.21p يحتوي على ROX في وجود بواى CT PB1 ومسبار طرف CT PB1 مع سيتوسين داخلي مترافق مع FAM.

الأشكال 9 إلى 9ج: مخططات التضخيم مولدة باستخدام بواقي CT PB1 في محلول منظم V6.21p بدون V13 في وجود مسبار CT PB1 داخلي باستخدام مترافق C داخلي مع FAM وصبغة مرجعية (ROX) reference dye.

الأشكال 10 إلى 10ج: توضح التحقق من صحة تخصيص مسبار CT PB1-FAM.

5 الأشكال 11 أ و 11ب : تعرض التحقق من صحة مسبار CT PB1-FAM مقابل تجربة APTIMA CT.

الأشكال 12 أ و 12ب : تعرض مخططات التضخيم المولدة في CT/GC متعدد باستخدام مسبارات CT PB1-FAM + GC PorA7-Alexa546.

الوصف التفصيلي:

- 10 يتم تثبيت قاعدة السيتوسين بشكل مفضل مركزياً إلى حد كبير على امتداد طول الأوليجونيوكلينوتيد oligonucleotide. توجد فائدة خاصة ترتبط بترميز المسبار probe داخلياً عند قاعدة سيتوسين cytosine. يمكن تأكيد تخصيص منتج الحمض النووي المضخم في تفاعل ثابت درجة الحرارة باستخدام تحليل منحنى انصهار. مع ذلك بسبب عدد كبير من متغيرات المنتج المولدة في ذلك التفاعل ودقة منخفضة لتحليل منحنى الانصهار، باستخدام صبغات إقحام مثل V13، يكون من الصعب جداً التمييز بين منتجات الحمض النووي المخصصة وغير المخصصة المولدة تحت ظروف ثابتة درجة الحرارة. لا تتوافق المسبارات المستخدمة بشكل شائع مثل مسبار TaqMan® مع تقنية LAMP بسبب نشاط إزاحة الجديلة لبوليميراز BST polymerase. يكون المسبار الخاص بالاختراع مطولاً ويصبح مضمناً في منتج الحمض النووي أثناء التضخيم ثابت درجة الحرارة، حيث تسمح بتنفيذ تحليل منحنى انصهار على المنتج المولد. في المسبار الخاص بالاختراع، يترافق حامل التآلق fluorophore مع سيتوسين داخلي internal cytosine مكمل لجوانين guanine في الجديلة المضادة antisense لاتجاه النسخ. يؤثر الجوانين على حالة إثارة الكثير من حاملات التآلق مما يؤدي إلى تكوين توقيعات منحنى انصهار فريدة ويسمح بالتمييز بين منتجات مخصصة وغير مخصصة مولدة تحت ظروف ثابتة درجة الحرارة.

لا يحتوي الأوليجونيوكلوتيد على ddNTP عند طرفه 3' مما يتيح تضمين الأوليجونيوكلوتيد المرز في الأمبليكون amplicon. بالتالي، لا يتم "إعاقة" الطرف 3' للمسبار.

يمكن أن يشتمل حامل التآلق fluorophore على أي واحد أو أكثر منتقى مما يلي: FAM، ATTO، ALEXA، ROX، TAMRA، HEX، TET، JOE.

5 يمكن أن يشتمل المسبار على المتواليات التالية:

3' X_n C* X_m 5' (هوية متواليات رقم 1)

حيث n هي <1، m هي <3، X هي قاعدة نيوكليوتيد nucleotide base ؛ و * هي حامل تآلق. بشكل مفضل، يتم اختيار قاعدة النيوكليوتيد من A، T، C و G. بشكل مفضل، n تكون أكبر من 1 إلى 20 وأقل، بشكل مفضل أكثر أكبر من 1 إلى 10 وأقل. بشكل مفضل، m تكون أكبر من 3 إلى 20 وأقل، بشكل مفضل أكثر أكبر من 3 إلى 10 وأقل. من المتوقع الكشف عن كل التوليفات بأطوال المسبار المغطاة بواسطة العدد المتاح من النيوكليوتيدات حيث n و m يمكن أن تأتي بالنطاقات السابقة.

بشكل مفضل، يمكن أن يشتمل المسبار على متواليات منتقاة من أي من المتواليات التالية:

هوية متواليات رقم 3: TAAGATAAC[C-FAM]CCGCACGTG (CT PB1-FAM) (داخلي)

15 هوية متواليات رقم 5: GCGAACATA [C-ALEXA546] CAGCTATGATCAA (GC) أو (PorA7-joe loopF)

هوية متواليات رقم 6: GC glnA7-) ATGTTCA [C-JOE] CATGGCGGAG (ALEXA546 loopB).

20 يتم زيادة التآلق بشكل مفضل عند تضمين الأوليجونيوكلوتيد في متواليات الحمض النووي المستهدف مما يؤدي إلى تغيير في تصميم معقد الأمبليكون - المسبار amplicon-probe complex مما يؤدي إلى تبديل حالة إثارة حامل التآلق fluorophore.

لا يتم تثبيت السيتوسين المرتبط بجزء ربط حامل التآلق عند وعلى مقربة من الطرف 5' و 3'. بشكل مفضل أكثر لا يتم تثبيته في القواعد الثلاثة الأولى من أي من الطرف 5' و 3'. بشكل مفضل يتم تثبيت السيتوسين المرتبط بحامل التآلق عند القاعدة الوسطى middle base بالمسبار .

5 وفقاً لسمة أخرى من الاختراع الحالي، يتم تقديم تضخيم حمض نووي ثابت درجة الحرارة مسبار كما هو موصوف هنا أعلاه.

وفقاً لسمة أخرى من الاختراع الحالي، يتم تقديم مسبار تضخيم ثابت درجة الحرارة ناتج عن حلقة كما هو موصوف أعلاه.

تستخدم الطرق والتركيبات الخاصة بتحديد حمض نووي مستهدف على الأقل في خليط من الأحماض النووية بصفة عامة مسبار، كاشف تهجين hybridizing reagent ، وواحد أو أكثر من إنزيمات تشكل رابطة فوسفات ترتبط بأي من التراي فوسفات النيوكليوتيدية nucleotide triphosphates المطلوبة لتشكيل سلسلة حمض نووي nucleic acid chain.

تشتمل تلك الطرق على تضخيم، مثل تضمين استخدام معزز بالترافق مع بوليميراز polymerase RNA، موقع تقييد حيث يتم فقط شق جديدة واحدة وبعد ذلك إزاحتها بواسطة الإثارة باستخدام بوليميراز الحمض النووي، وكاشف تهجين دائري، حيث يتم إنتاج تكرارات متسلسلة. يمكن أن يأخذ كشف الحمض النووي المضخم صور كثيرة لكن بشكل مفضل بواسطة حامل تآلق.

وفقاً لسمة أخرى من الاختراع الحالي، يتم تقديم طريقة لكشف حمض نووي مستهدف في عينة تشتمل على:

أ. تضخيم حمض نووي مستهدف في العينة لتوفير حمض نووي مضخم؛

20 ب. التحقق من الحمض النووي المضخم باستخدام مسبار كما هو موصوف هنا أعلاه؛ و

ج. كشف وجود حمض نووي مستهدف target nucleic acids واحد ومجموعة متعددة.

يمكن أن يكون الحمض النووي المستهدف عبارة عن الحمض النووي من كائن دقيق، فطريات، خميرة، فيروس، إنسان، حيوان، نبات.. الخ. يكون الحمض النووي المستهدف لـ LAMP معروف بأنه يتيح تخليق بواقي LAMP وبشكل ملائم مسبارات مخصصة. بالتالي، يمكن تحديد وجود وغياب الكائنات المجهرية المذكورة، الفطريات، الخميرة، الفيروس، الإنسان، الحيوان والنبات في عينة. بشكل مفضل يكون الحمض النووي المستهدف من *Chlamydia trachomatis* و *Neisseria gonorrhoeae*.

بشكل مفضل، يزيد التألق للإشارة إلى وجود الحمض النووي المستهدف في عينة. تكون العملية ثابتة درجة الحرارة، وتسمح بالتضخيم في مرحلة واحدة ومرحلة متعاقبة في وعاء واحد، حيث تكون كل الكواشف متوافقة.

10 في سمة إضافية، يقدم الاختراع الحالي طريقة لتشخيص *Chlamydia* و/ أو *Gonorrhea* في مريض، يشتمل على

توفير عينة المشتقة من المريض؛

إضافة واحد أو أكثر من مسبارات الاختراع الحالي إلى العينة؛ و

كشف وجود حمض نووي مشتق من *Chlamydia trachomatis* و/ أو *Neisseria*

15 *gonorrhoeae* حيث تشير زيادة في تألق المسبار إلى وجود إصابة *Chlamydia trachomatis* و/ أو *Neisseria gonorrhoeae*.

يمكن معالجة العينة بواسطة طرق روتينية لتمكين المسبار من الارتباط بأي نيوكليوتيد مستهدف موجود في العينة. يمكن أن تشتمل تلك المعالجة على الطرد المركزي وحل العينة لتحرير أي حمض نووي مستهدف من الكائن المجهرية المصاب.

20 في أحد النماذج، يتم استخدام نوع منفرد من مسبار مخصص لحمض نووي من أي من *Chlamydia trachomatis* و *Neisseria gonorrhoeae* في الطريقة بحيث يتم كشف إما *Chlamydia trachomatis* فقط و *Neisseria gonorrhoeae* فقط في العينة.

في نموذج مفضل، يتم إضافة مسبارين مختلفين على الأقل إلى العينة حيث يتم ترميز مسبار أول باستخدام رمز تآلق أول ويكون مخصص للتحقق من حمض نووي *Chlamydia trachomatis* ويتم ترميز مسبار ثاني باستخدام رمز تآلق مختلف عن المسبار الأول ويكون مخصص للتحقق من حمض نووي *Neisseria gonorrhoeae*. في ذلك النموذج، يكون من الممكن في نفس الوقت كشف إصابة *Chlamydia* و *Gonorrhea* في عينة واحدة مشتقة من مريض. 5

في إحدى سمات طريقة الاختراع، يمكن أن تكون العينة من المريض عبارة عن عينة دم، عينة بول، عينة مصل وعينة لعاب.

وفقاً لسمة أخرى من الاختراع الحالي يتم تقديم طاقم يشتمل على مسبار كما هو موصوف هنا أعلاه، محلول منظم لتفاعل LAMP يحتوي على إنزيم بوليميراز، dNTPs و بوابدٍ LAMP للهدف. 10

في أحد النماذج يمكن تضمين عينة مقارنة موجبة وسالبة في الطاقم. يمكن أن توجد الكواشف في صورة كواشف رطبة وفي صورة مجففة بالتجميد.

يشتمل المحلول المنظم المستخدم في الطريقة والطاقم من الاختراع على dNTPs بتركيز من 1-10 مللي مولار، واحد أو أكثر من الأملاح بتركيز من 2-20 مللي مولار، تريس Tris رقم هيدروجيني 8.8 بتركيز من 10-100 مللي مولار، تيرهاالوز Trehalose بتركيز من 10-100 مللي مولار، بوليميراز BST polymerase بكمية من 1 وحدة-12 وحدة و 0.01%-1% ، 1، 2 بروبان دايلول 2-propanediol . 15

الاختصارات

Chlamydia trachomatis – CT

Neisseria gonorrhoeae – GC 20

GlnA7 – جلوتامين سينثيتاز *Glutamine synthetase*

PorA7 – بروتين بورين *A7 porin protein*

LAMP - تضخيم ثابت درجة الحرارة ناتج عن حلقة loop mediated isothermal amplification

PCR - تفاعل سلسلة بوليميراز polymerase chain reaction

سوف يتم الآن وصف الاختراع الحالي، على سبيل المثال فقط، بالإشارة إلى الأمثلة التالية والأشكال. 5

تفاعل LAMP

تم تنفيذ كشف أساس V13 ل CT المستهدف و GT DNA بواسطة LAMP باستخدام محلول منظم لتفاعل LAMP V6.21 المطور بواسطة مقدم الطلب. تم تنفيذ كشف أساس مسبار ل DNA المستهدف في V6.21p (بدون V13). كانت تركيزات بادئ LAMP كما يلي: CT PB1 - 10 0.8 ميكرو مولار بادئ FIP & BIP، 0.2 ميكرو مولار F3 & B3 و 0.4 ميكرو مولار بواذئ حلقة، GC PorA7 و GC glnA7 - 2 ميكرو مولار بادئ FIP & BIP، 0.25 ميكرو مولار F3 & B3 و 0.5 ميكرو مولار بواذئ حلقة. تم استخدام كل المسبارات بتركيز نهائي 0.625 ميكرو مولار. تم إجراء تفاعلات LAMP لمدة 60 دقيقة عند درجة حرارة ثابتة 63 درجة مئوية باستخدام ماكينة PCR في الزمن الفعلي ABI7500. تم الحصول على قراءات إشارة التآلق في قناة SybrGreen/FAM، Joe و Cy3 حسب الملائمة. 15

متواليات المسبار Probe sequences

هوية متوالية رقم 2: GTGCACGC[C-FAM]CCAATAGAAT

هوية متوالية رقم 3: TAAGATAAC[C-FAM]CCGCACGTG (CT PB1-FAM داخلي)

هوية متوالية رقم 4: TCGAGCAA[C-FAM]CGCTGTGAC[ddC] (CT PB1-FAM)

20 (طرفي)

هوية متوالية رقم 5: GCGAACATA [C-ALEXA546] CAGCTATGATCAA (GC)

(PorA7-joe loopF)

هوية متوالية رقم 6: GC glnA7-) ATGTTCA [C-JOE] CATGGCGGAG
أو (ALEXA546 loopB

هوية متوالية رقم 7: [C-FAM] CCA GGG TAT CTA ATC CTG TTT G
المتواليات المستهدفة

5 تكون متواليات DNA المستهدفة في الأمثلة هي

هوية متوالية رقم 8: متوالية Chlamydia trachomatis G/SotonG1 بلازميد pSotonG1
كاملة (GenBank: HE603235.1)

1 ttgcaactc ttggtgtag actttgcaac tcttggtggt agactttgca actcttggtg
61 gtagacttgg tcataatgga cttttgtaa aaaatttctt aaaatcttag agctccgatt
121 ttgaatagct ttggttaaga aaatgggctc gatggcttcc cataaaagta gattgttctt 10
181 aacttttggg gacgcgtcgg aaatttggtt atctacttta tctcatctaa ctgaaaaaa
241 ttatgctctt gggattaact ttctgtttc ttagagatt ctggatttat cggaaacctt
301 gataaaggct atttctcttg accacagcga atctttgttt aaaatcaagt ctctagatgt
361 tttaatgga aaagtcgttt cagaggcctc taaacaggct agagcggcat
gctacatatc 15
421 ttccacaaag tttttgtata gattgaccaa gggatatatt aaaccgcta ttccattgaa
481 agattttgga aacactacat ttttaaaat ccgagacaaa atcaaaacag
aatcgatttc
541 taagcaggaa tggacagttt ttttgaagc gctccggata gtgaattata gagactattt
601 aatcggtaaa ttgattgtac aagggatccg taagttagac gaaattttgt ctttgcgcac 20

661 agacgatcta tttttgcat ccaatcagat ttctttcgc attaaaaaa gacagaataa
721 agaaaccaa attctaata catttcctat cagcttaatg gaagagttgc
aaaaatacac
781 ttgtgggaga aatgggagag tattgtttc taaaataggg attcctgtaa
caacaagtca 5
841 ggttgcat aatttaggc ttgcagagtt ccatagtct atgaaaataa aaattactcc
901 cagagtactt cgtgcaagcg ctttgattca tttaaagcaa ataggattaa
aagatgagga
961 aatcatgctt attcctgtc tctcatcgag acaaagtgtg tgttcttatt gttctgggga
1021 agaggtaagt cctctagtagc aaacaccac aatattgga tataattaa 10
attatattca
1081 tattctgttg ccagaaaaaa caccttagg ctatattaga gccatcttct tgaagcgtt
1141 gtcttctcga gaggatttat cgtacgcaa tatcatcttt gcggtgctg gttcccgtgac
1201 cttcattatg tcggagtctg agcaccctag gcgttgtac tccgtcacag cggttgctcg
1261 aagcacgtgc ggggttatct taaaaggat tgcagcttgt agtcctgctt 15
gagagaacgt
1321 gcgggagatt tgccttaacc ccaccattt tccggagcga gttacgaaga
caaacctct
1381 tcgtgaccg atgtactctt gtagaaagt cataaacttc tgaggataag ttataataat
1441 cctctttct gtctgacggt tcttaagctg ggagaaagaa atggtagctt gttggaaca 20

1501 aatctgacta atctccaagc ttaagacttc agaggagcgt ttacctcctt
ggagcattgt

1561 ctgggcgatc aaccaatccc gggcggtgat ttttttagc tcttttagga aggatgctgt

1621 ttgcaaactg ttcatcgcat ccggttttac tattccctg gtttaaaaa atgttcgact

1681 atttcttgt ttagaagggt gcgctatagc gactattcct tgagcatcc tgttaggaa 5

1741 tcttgtaag gaaatatagc ttgctgctcg aactgttta gtacctcgg tccaagaagt

1801 ctggcagag gaaactttt taatcgcatc taggattaga ttatgattta
aaagggaaaa

1861 ctctgcaga ttcatatcca aagacaatag accaatcttt tctaaagaca
aaaaagatcc 10

1921 tcgatatgat ctacaagtat gtttggtgag tgatgcggtc caatgcataa taacttcgaa

1981 taaggagaag ctttcatgc gttccaata ggattcttg cgaatttta aaactcctg

2041 ataagacttt tcgctatatt ctaacgacat ttctgctgc aaagataaaa tcccttacc

2101 catgaaatcc ctogtgatat aacctatccg caaatgtcc tgattagtga
aataatcagg 15

2161 ttgtaacag gatagcacgc tcggtatfff ttatataaaa catgaaaact cgtccgaaa

2221 tagaaaatcg catgcaagat atcgagtatg cggtgtagg taaagctctg
atattgaag

2281 actctactga gtatattctg aggcagcttg ctaattatga gtttaagtgt tccatcata

2341 aaaacatatt catagtatff aaatacttaa aagacaatgg attacctata 20
actgtagact

2401 cggcttgga agagctttg cggcgtcga tcaaagatat ggacaaatcg
tatctcgggt

2461 taatgtgca tgatgctta tcaaatgaca agcttagatc cgtttctcat acggtttcc

2521 tcgatgatt gagcgtgtg agcgtgaag aaaattgag caatttcatt ttccgctcgt

2581 ttaatgagta caatgaaaat ccattgcgta gatctccgtt tctattgctt gagcgtataa 5

2641 agggaaggct tgatagtgt atagcaaaga cttttctat tcgcagcgt
agaggccggt

2701 ctattatga tatatttca cagtcagaaa ttggagtgt ggctcgtata
aaaaaaagac

2761 gagcagcgtt ctctgagaat caaaattctt tctttgatgg ctccaaca 10
ggatacaagg

2821 atattgatga taaaggagtt atcttagcta aaggtaatt cgtgattata gcagctaggc

2881 catctatagg gaaaacagct ttagctatag acatggcgat aaatcttgcg
gttactcaac

2941 agcgtagagt tggttccta tctctagaaa tgagcgcagg tcaaattgtt 15
gagcggattg

3001 ttgctaatt aacaggaata tctggtgaaa aattacaaag aggggatctc
tctaaagaag

3061 aattattccg agtgaagaa gctggagaaa cagttagaga atcacattt
tatatctgca 20

3121 gtgatagtca gtataagctt aattaatcg cgaatcagat ccggttgctg
agaaaagaag

3181 atcgagtaga cgtaatattt atcgattact tgcagttgat caactcatcg
gttgagagaaa

3241 atcgtcaaaa tgaatagca gatatactga gaaccttaag aggttagcc 5
tcagagctaa

3301 acattcctat agtttgttta tccaactat ctagaaaagt tgaggataga
gcaaataaag

3361 ttccatgct tcagattg cgagacagcg gtcaaataga gcaagacgca
gatgtgatt 10

3421 tgttatcaa taggaaggaa tcgtcttcta attgtgagat aactgttggg
aaaaatagac

3481 atggatcgg tttctctcg gtattacatt tcgatccaaa aattagtaaa ttctccgcta

3541 ttaaaaaagt atggtaaatt atagtaactg ccacttcac aaaagtccta
tccacctga 15

3601 aaatcagaag ttggaagaa gacctgtca atctattaag atatctcca
aattggctca

3661 aaatgggatg gtagaagtta taggtcttga tttctttca tctcattacc atgcattagc

3721 agctatccaa agattactga ccgcaacgaa ttacaagggg aacacaaaag
gggtgtttt 20

3781 atccagagaa tcaaatagtt ttcaattga aggatggata ccaagaatcc
gttttcaaaa

3841 aactgaattc ttagaggctt atggagttaa gcggtataaa acatccagaa
ataagtatga

3901 gtttagtgga aaagaagctg aaactgcttt agaagccttg taccatttag
gacatcaacc

3961 gttttaata gtggcaacta gaactcgatg gactaatgga acacaaatag 5
tagaccgta

4021 ccaaactctt tctccgatca ttaggattta cgaaggatgg gaaggtttaa
ctgacgaaga

4081 aaatatagat atagacttaa caccttttaa ttcaccatct acacggaaac
ataaaggatt 10

4141 cgttgtagag ccatgtccta tcttggtaga tcaaatagaa tctactttg taatcaagcc

4201 tgcaaatgta taccaagaaa taaaatgcg ttcccaaac gcatcaaagt
atgcttacac

4261 atttatcgac tgggtgatta cagcagctgc gaaaaagaga cgaaaattaa
ctaaggataa 15

4321 ttcttgcca gaaaacttgt tattaaacgt taacgttaa agtcttgcat atattttaag

4381 gatgaatcgg tacatctgta caaggaactg gaaaaaatc gagttagcta
tcgataaatg

4441 tatagaaatc gccattcagc ttggctgggt atctagaaga aaacgcattg
aatttctgga 20

4501 ttcttctaaa ctctctaaaa aagaaattct atatctaaat aaagagcgct
ttgaagaaat

4561 aactaagaaa tctaaagaac aaatggaaca agaacttatt aattaatagc
aggcttgaaa

4621 ctaaaaacct aatttattta aagctcaaaa taaaaaagag ttttaaatg
ggaaattctg

4681 gtttttattt gtataacact gaaaactgcg tctttgctga taatatcaaa gttgggcaaa 5

4741 tgacagagcc gctcaaggac cagcaaataa tccttgggac aaaatcaaca
cctgtcgcag

4801 ccaaaatgac agcttctgat ggaatatctt taacagtctc caataattca
tcaaccaatg

4861 cttctattac aattggtttg gatgcggaag aagcttacca gcttattcta gaaaagttgg 10

4921 gaaatcaaat tcttgatgga attgctgata ctattgttga tagtacagtc caagatattt

4981 tagacaaaat cacaacagac ccttctctag gtttgttgaa agcttttaac
aactttccaa

5041 tcactaataa aattcaatgc aacgggttat tcaactccag taacattgaa actttattag

5101 gaggaactga aataggaaaa ttcacagtca cacccaaaag ctctgggagc 15
atgttcttag

5161 tctcagcaga tattattgca tcaagaatgg aaggcggcgt tgttctagct
ttggtacgag

5221 aaggtgattc taagccctgc gcgattagtt atggatactc atcaggcgtt cctaatttat

5281 gtagtctaag aaccagcatt actaatacag gattgactcc aacaacgtat 20
tcattacgtg

5341 taggcggttt agaaagcggg gtggatggg ttaatgccct ttctaattggc aatgatattt
5401 taggaataac aaatacttct aatgtatctt tttggaagt aatacctcaa acaaacgctt
5461 aaacaatttt tattggattt ttcttatagg ttttatattt agagaaaaca gttcgaatta
5521 cggggtttgt tatgcaaaat aaaagaaaag tgaggggacga tttattaaa
attgtaaag 5
5581 atgtgaaaa agatttccc gaattagacc taaaaatcg agtaaacaag
gaaaaagtaa
5641 ctttctaaa ttctccctta gaactctacc ataaaagtgt ctactaatt ctaggactgc
5701 ttcaacaaat agaaaactct ttaggattat tcccagactc tctgttctt gaaaaattag
5761 aggataacag tttaaagcta aaaaaggctt tgattatgct tatcttgtct 10
agaaaagaca
5821 tgtttccaa ggctgaatag acaactact ctaacgttgg agttgattg cacaccttag
5881 tttttgctc ttttaaggga ggaactggaa aaacaacact ttctctaaac gtgggatgca
5941 acttgccca attttaggg aaaaagtgt tacttgctga cctagacccg
caatccaatt 15
6001 tatcttctgg attgggggct agtgtcagaa ataaccaaaa aggcttcac
gacatagtat
6061 acaaatcaaa cgatttaaaa tcaatcattt gcgaaacaaa aaaagatagt
gtggacctaa
6121 ttctgcatc attttatcc gaacagtta gagaattgga tattcataga ggacctagta 20
6181 acaactaaa gttattctg aatgagtact gcgctcctt ttatgacatc tgcataatag

6241 acactccacc tagcctagga gggtaacga aagaagcttt tgtgcagga
gacaaattaa

6301 ttgcttggtt aactccagaa ccttttcta ttctagggtt acaaaagata cgtgaattct

6361 taagtcggt cggaaaacct gaagaagaac acattcttg aatagctttg
tcttttggg 5

6421 atgacgtaa ctgactaac caaatgtata tagacattat cgagtctatt
tacaanaaca

6481 agctttttc aacaaaaatt cgtcgagata tttctctcag ccgttctct ctaaagaag

6541 attctgtagc taatgtctat ccaaattcta gggccgcaga agatattctg
aagttaacgc 10

6601 atgaaatagc aaatatttg catatcgaat atgaacgaga ttactctcag
aggacaacgt

6661 gaacaaacta aaaaaagaag cggatgtctt ttttaaaaaa aatcaaactg
ccgcttctct

6721 agattttaag aagacacttc ctccattga actatttca gcaacttga attctgagga 15

6781 aagtcagagt ttggatcgat tattttatc agagtcccaa aactattcgg atgaagaatt

6841 ttatcaagaa gacatcctag cggtaaaact gcttactggg cagataaaat
ccatacagaa

6901 gcaacacgta cttcttttag gagaaaaat ctataatgct agaaaaatcc
tgagtaagga 20

6961 tcacttctcc tcaacaactt ttcatcttg gatagagtta gttttagaa ctaagtcttc

7021 tgcttacaat gctcttgcatt attacgagct tttataaac ctcccccaacc aaactctaca

7081 aaaagagttt caatcgatcc cctataaatc cgcatatatt ttggccgcta
gaaaaggcga

7141 ttataaaacc aaggctgatg tgatagggaa agtatgtgga atgtcgaact
catcggcgat 5

7201 aagggtgttg gatcaattc ttccttcac tagaaacaaa gacgttagag
aaacgataga

7261 taagtctgat ttagagaaga atcgccaatt atctgattc ttaatagaga tacttcgcat

7321 catatgttcc ggagtttctt tgcctccta taacgaaaat ctctacaac agcttttga

7381 actttttaag caaaagagct gatcctccgt cagctcatat atatattat tatatatata 10

7441 ttatttagg gatttgatt tacgagagag a

هوية متوالية رقم 9: جين *Neisseria gonorrhoeae porA* جزئي للفئة 1 خارج بروتين
الغشاء، عزل GC3 (GenBank: HE681886.1)

1 gccggcggcg gcgacccg ttggggcaat agggaatcct ttgtcggctt
ggcaggcgaa 15

61 ttccggcagc tgcgcccgg ccgcttgcg aatcagttg acgatccag
ccaagccatt

121 gatccttggg acagcaaaa tgatgtggct tcgcaattgg gtattttcaa
acgccacgac

181 gatatgccgg ttccgtacg ctacgactcc ccgactttt ccggttcag 20
cggcagcgtc

241 caattcgttc cggctcaaaa cagcaagtcc gcctatacgc cggctcattg
gactactgtg

301 tataacacta acggtactac tactactttc gttccggctg ttgtcggcaa gcccggatcg

361 gatgtgtatt atgccggtct gaattacaaa aatggcgggtt ttgccgggaa ctatgccttt

421 aaatatgca gacacgcaa tgtcggacgt aatgctttg agttgttctt gctcggcagt 5

481 gggagtgatg aagccaaagg taccgatccc ttgaaaaacc atcaggtaca
ccgcctgacg

541 ggcggctatg gggaaggcgg cttgaatctc gccttggcgg ctcaattgga
tttgtctgaa

601 aatgccgaca aaaccaaaaa cagtacgacc gaaattgccg ccactgcttc 10
ctaccgcttc

661 ggtaatacag tcccgcgcat cagctatgcc catggtttcg actttgtcga
acgcagtcag

721 aaacgcgaac ataccagcta tga

glutamine هوية متوالية رقم 10: جين Neisseria gonorrhoeae جلوتامين سينثيتاز 15
جزئية cds، glnA-14، (glnA) synthetase
(GenBank: AF520262.1)

1 cccgctttgt cgatttgcgc tcaccgata ccaaaggcaa gcagcaccac
tttaccgtgc

61 ctgcgcgcat cgtgttgaa gaccccgaag agtggtttga aaacggaccg 20
gcgtttgacg

121 gctcgtccat cggcggctgg aaaggcattg aggcttccga tatgcagctg
cgccccgatg

181 cgtccacagc cttcgtcgat ccttttatg atgatgttac cgtcgtcatt acctgcgacg

241 tcatcgacct tgccgacggt cagggttacg accgcgacct gcgctccatc
gcacgccgcg 5

301 ccgaagccta ttgaaatct tccggtatcg gcgacaccgc ctatttcggc
cccgaaaccg

361 aattcttcgt cttcgcgaggc gtagaatttg aaaccgacat gcacaaaacc
cgttacgaaa

421 tcacgtccga aagcggcgcg tgggcaagcg gcctgcatat ggacggtaa 10
aacaccggcc

481 accgccccgc cgtcaaaggc ggctacgcgc cgtcgcgcc gattgactgc
ggtaagatt

541 tgcgctccgc catggtgaac atttggaag gactcggcat cgaagtcgaa
gtccaccaca 15

601 gcgaagtcgg taccggcagc caaatggaaa tcggcaccgg tttcgccact
ttgtcaaac

661 gcgccgacca aaccaagat atgaaatcgc tcatcaaaa cgttgccac
aatttcggca

721 aaaccgccac ctttatgccc aaaccgatta tgggcgacaa cggcagcggg 20
atgcacgtcc

781 accaatccat ttggaaagac ggtcaaaacc tgttcgcagg cgacggctat
gccggtttgt

841 ccgataccgc gctctactac atcggcggca tcatcaaaca cgccaaagcc
ctgaacgcga

901 ttaccaatcc gtccaccaac tctacaaac gctcgtgcc gcactttgaa 5
gcaccgacca

961 aattggccta ttccgcaaa aaccgttccg ctccatccg tatcccgtct
gtgaacagca

1021 gcaaggcgcg ccgcatcgaa gcgcgttcc ccgacccgac cgccaaccg
tattggcat 10

1081 ttgccccct gctgatggcc ggttggacg gcattcaaaa caaatccat
ccgggcgacc

1141 ctgccgataa aaacctgtac gacctgccgc cggaagaaga cgcgctcgtc
ccgaccgtct

1201 gcgcttcttt ggaagaagca ctgcccgcc tcaaggtcga ccacgaattc 15
ctgctgcgcg

1261 gcggcgtgtt cagcaaagac tggatcgaca gctacatcgc cttaaagag
gaagatgtcc

1321 gccgatccg tatggcgccg caccgctgg aatttg

تكون متواليات البادئ المستخدمة في تفاعل LAMP كما يلي: 20

CT بلازميد

TCTACAAGAGTACATCGGTCA (هوية متوالية رقم 11)	F3
TGAAGCGTTGTCTTCTCG (هوية متوالية رقم 12)	B3
GCAGCTTGTAGTCCTGCTTGAGTCTTCGTAACCTCGCTCC (هوية متوالية رقم 13)	FIP
TCGAGCAACCGCTGTGACCCTTCATTATGTCCGAGTCTG (هوية متوالية رقم 14)	BIP
CGGGCGATTTGCCTTAAC (هوية متوالية رقم 15)	LF1
TACAAACGCCTAGGGTGC (هوية متوالية رقم 16)	LB1

GC PorA7

AAGTGCGCTTGGAAAAATCG (هوية متوالية رقم 18)	B3
FIPATGGGCATAGCTGATGCGCGAATTGCCGCCACT GCTTC (هوية متوالية رقم 19)	
TCGACTTTGTCTGAACGCAGTCAAATCGACACCGGC GATGA (هوية متوالية رقم 20)	BIP
GCGAACATACCAGCTATGATCAA (هوية متوالية رقم 21)	LoopF 1

GC glnA7

TCATATCTTGGGTTTGGTTCG (هوية متوالية رقم 22)	F3
CTGCATATGGACGGTCAAA (هوية متوالية رقم 23)	B3
CGAAGTCCACCACAGCGAATTTGACCAAAGTGGCGAA	FiP

(هوية متوالية رقم 24)	
CTTCGATGCCGAGTCCTTCCGATTGACTGCGGTCAAGAT (هوية متوالية رقم 25)	BiP
CAAATGGAAATCGGCACCC (هوية متوالية رقم 26)	LF
ATGTTCCACCATGGCGGAG (هوية متوالية رقم 27)	LB

المحلول المنظم

طوّر مقدم الطلب نظام محلول منظم للاستخدام مع المسبارات من الاختراع وتم تميزه بـ V6.21 (أو V6.21p بدون وجود صبغة V13) في الأمثلة التالية. تكون تركيزات مكونات المحلول المنظم بعد إعادة تكوين المحلول المنظم:

V6.21 5

4-10 مللي مولار dNTP's، 10 مللي مولار ملح، 30 مللي مولار تريس Tris رقم هيدروجيني 8.8، 30 مللي مولار تيرهاالوز Trehalose، U8-1 بوليميراز BST polymerase، صبغة و 0.05% بروبان دايلول propanediol.

V6.21p

4-10 مللي مولار dNTP's، 10 مللي مولار ملح، 30 مللي مولار تريس رقم هيدروجيني 8.8، 30 مللي مولار تيرهاالوز، U8-1 بوليميراز BST، و 0.05% بروبان دايلول.

PCR

تم تنفيذ كشف CT/GC في عينة سريرية بواسطة PCR بالزمن الفعلي باستخدام APTIMA CT/GC متعدد (مسبار - Gen) وفقاً لتعليمات المصنّع.

15 استشراد كهربائي لجل أجاروز Agarose Gel Electrophoresis

تم تنفيذ استشراد كهربي للحمض النووي في 1% جل أجاروز من محلول منظم 1xTAE عند 100 فولط. تم تنشيط منتجات LAMP DNA باستخدام GelRed (إنفيتروجين Invitrogen) باستخدام ناقل تالو transilluminator.

تم تطوير محلول منظم V6.21 و V6.21p بواسطة مقدم الطلب. تم الحصول على بوادئ LAMP من Eurofins. تم شراء أوليجونيوكلويدات مرمزة بحامل تالو Fluorophore- 5 labelled oligonucleotides من Integrated DNA technologies. تم شراء محلول منظم Tris buffer ، جل أجاروز agarose gel وماء بدرجة PCR من Sigma. تم الحصول على معايير CT و GC DNA من ATCC.

الأمثلة

10 المثال 1

تعرض الأشكال 2أ إلى 2و مخططات تضخيم مولدة باستخدام بوادئ CT PB1 (الشكل 2أ والشكل 2د)، GC glnA7 (الشكل 2ب والشكل 2هـ) و GC PorA7 (الشكل 2ج والشكل 2و) في محلول منظم V6.21 يحتوي على V13 (الأشكال 2أ، 2ب و 2ج) ومحلول منظم V6.21p بدون صبغة V13 (الأشكال 2د، 2هـ و 2و). تكون المتواليات المستهدفة موضحة في هويات متوالية أرقام 8 إلى 10 باستخدام مسبار CT PB1 داخلي مترافق مع FAM، مسبار حلقة GC glnA7 مترافق مع Joe ومسبار حلقة GC PorA7 مترافق مع Alexa546 على التوالي. تم تنفيذ كل التفاعلات لمدة 60 دقيقة عند درجة حرارة ثابتة 63 درجة مئوية باستخدام ماكينة ABI7500.

المثال 2

تكون الأشكال 3أ و 3ب عبارة عن تحليلات لمنحنى انصهار melt curve analyses منتجات LAMP مولدة باستخدام بوادئ CT PB1 primers في وجود مسبار CT PB1 داخلي مترافق مع FAM. تم استخدام 100 بيكوجرام لكل تفاعل من معيار ATTC CT DNA على هيئة عينة مقارنة موجبة. A - مخطط مراسل مطبوع، B - مخطط مراسل مشتق. تم توليد مخططات منحنى الانصهار بناءً على القراءات في قناة FAM باستخدام ماكينة ABI7500.

المثال 3

تكون الأشكال 4أ وب عبارة عن تحليلات لمنحنى انصهار منتج LAMP مولد باستخدام بوادئ GC glnA7 في وجود مسبار حلقة GC glnA7 مترافق مع JOE. تم استخدام 100 بيكوجرام لكل تفاعل من معيار ATTC GC DNA على هيئة عينة مقارنة موجبة. يعرض الشكل 4أ مخطط مراسل مطبع ويعرض الشكل 4ب مخطط مراسل مشتق. تم توليد مخططات منحنى الانصهار بناءً على القراءات في قناة JOE باستخدام ماكينة ABI7500.

5

المثال 4

تكون الأشكال 5أ و5ب عبارة عن تحليلات لمنحنى انصهار منتج LAMP مولد باستخدام بوادئ GC PorA7 في وجود مسبار حلقة GC PorA7 مترافق مع ALEXA546. تم استخدام 100 بيكوجرام لكل تفاعل من معيار ATTC GC DNA على هيئة عينة مقارنة موجبة. يعرض الشكل 5أ مخطط مراسل مطبع، يعرض الشكل 4ب مخطط مراسل مشتق. تم توليد مخططات منحنى الانصهار بناءً على القراءات في قناة Cy3 باستخدام ماكينة ABI7500.

10

المثال 5 :

توضح الأشكال 6أ إلى 6د نتائج اختبار لتأكيد تخصيص منتج DNA باستخدام مسبار من الاختراع في تضخيم ثابت درجة الحرارة ناتج عن حلقة. يشير زمن التضخيم السابق للإيجابيات الزائفة (أكبر من 30 دقيقة) بعد تركيز DNA المستهدف الأدنى القابل للكشف في تفاعل LAMP (100fg GC DNA) إلى أن التضخيم غير المخصص يمكن أن يكون نتيجة لتكوين دايمير بادئ. لا يسمح تحليل منحنى الانصهار القياسي بالتمييز بين المنتج المخصص وغير المخصص في تفاعل LAMP هذا، ولكن يمكن التعرف على المنتج غير المخصص باستخدام المسبار الخاص بالاختراع. تم تضخيم GC DNA باستخدام بوادئ GC PorA7 والتوضيح للرؤية باستخدام صبغة V13 ومسبار GC PorA7-ALEXA546 حسب الملائمة.

15

20

المثال 6 : يعرض الشكل 7 مخططات التضخيم مولدة باستخدام بوادئ CT PB1 primers في محلول منظم V6.21 يحتوي على V13 ومحلول منظم V6.21p بدون صبغة V13 لكن في وجود مسبار طرف CT PB1 (مكمل لمنطقة الحلقة complementary to loop region)

باستخدام مترافق C داخلي وفاصل 3' terminator (3' ddC). بالرغم من تأكيد التضخيم الناجح لـ DNA المستهدف عن طريق إثارة صبغة V13 في تفاعل التحكم، لا يولد مسبار CT PB1 مع فاصل 3' إشارة موجبة positive signal .

المثال 7

5 تعرض الأشكال 8 وأ و8ب مخططات التضخيم المولدة في محلول منظم V6.21p يحتوي على ROX في وجود بواقي CT PB1 ومسبار طرف CT PB1 مع سيتوسين داخلي internal cytosine مترافق مع FAM (الشكل 8أ)، وبواقي عامة ومسبار 3'UP مع سيتوسين طرفي terminal cytosine 3' مترافق مع FAM (الشكل 8ب). يمثل الخط الأول إشارات مولدة بواسطة ROX، ويقابل الخط الثاني الإشارة المولدة في قناة FAM. يؤدي ربط المسبار مع C مرمزة داخلياً بـ DNA المستهدف إلى إثارة FAM. لا يستبدل ربط المسبار مع طرف 3' المرمز بـ C بالهدف حالة إثارة FAM.

المثال 8

15 توضح الأشكال 9أ إلى 9ج مخططات التضخيم مولدة باستخدام بواقي CT PB1 في محلول منظم V6.21p بدون V13 في وجود مسبار CT PB1 داخلي باستخدام مترافق C داخلي مع FAM وصبغة مرجعية (ROX) reference dye. يعرض الشكل 9أ بيانات خام، قراءات من قناة FAM في الخط الأول ومن القناة ROX في خط ثاني. يعرض الشكل 9ب مخططات تضخيم (مولدة في قناة FAM) معادلة مع ROX. يعرض الشكل 9ج مخططات منحنى انصهار مراسل مشتق.

المثال 9

20 توضح الأشكال 10أ إلى 10ج التحقق من صحة تخصيص مسبار CT PB1-FAM. يعرض الشكل 10أ مخططات تضخيم مولدة باستخدام مسبار CT PB1-FAM في وجود CT DNA وبواقي CT. للمقارنة، تم تنفيذ مجموعتين من التفاعلات حيث تم تضخيم جينات غير مخصصة، GC glnA7 و GC PorA7 باستخدام بواقي LAMP المقابلة في وجود مسبار CT PB1-FAM. في محلول منظم V6.21p تم توليد مخططات التضخيم في وجود مسبار CT PB1 في

قناة FAM فقط عندما توجد CT DNA في التفاعل ولم يتم توليد أي إشارة عند تضخيم الجينات غير المخصصة (GC glnA7 و GC PorA7). لم يتم توليد أي إشارة أيضاً عند استخدام مسبار غير مخصص في تفاعل حيث يتم تضخيم CT DNA باستخدام بواقي CT primers. يعرض الشكل 10 ج بيانات تم الحصول عليها في تجربة مناظرة ولكن تم تنفيذها في محلول منظم 5 V6.21 يحتوي على صبغة إقحام V31. يعرض الشكل 10 ج منتجات DNA مولدة في التجربة الموصوفة في الشكل 10 أ.

المثال 10

تعرض الأشكال 11 أ و 11 ب التحقق من صحة مسبار CT PB1-FAM مقابل تجربة APTIMA CT. تم اختبار خمسون عينة سريرية أكدت أنها موجبة (n=29) (الشكل 11 أ) وسالبة (n=21) (الشكل 11 ب) في محلول منظم V6.21p باستخدام مسبار CT PB1-FAM. من 50 عينة كانت 24 عينة مختبرة سالبة (الشكل 11 أ) و 26 عينة مختبرة موجبة (الشكل 11 ب) CT باستخدام مسبار CT PB1-FAM. يوجد 86% اتفاق بين اختبارات Aptima و CT PB-FAM.

المثال 11

تعرض الأشكال 12 أ و 12 ب مخططات التضخيم المولدة في CT/GC متعدد باستخدام مسبارات CT PB1-FAM + GC PorA7-Alexa546. تم تضخيم CT و GC DNA في تفاعلات منفصلة ومترافقة في محلول منظم V6.21p في وجود مسبارات CT PB1-FAM و GC PorA7-Alexa546. تم تسجيل القراءات في قنوات Cy3 (الشكل 12 أ) و FAM (الشكل 12 ب). أوضحت التجربة أنه يمكن تضخيم وكشف أهداف DNA في تفاعل متزامن مع مسبارات FAM و Alexa546 مرمزة ولا يوجد أي تفاعلية عرضية بين CT PB1 و GC PorA7 والمسبارات.

المثال 12

الجدول 1 يعرض مقارنة بين V13 LAMP و CT و GC، و CT/GC Aptima و CT/GC متعدد (CT PB1-FAM + GC PorA7-Alexa546). تم اختبار DNA المستخرجة من 136 عينة

سريرية باستخدام CT/GC Aptima متعدد، وبتادئ GC PorA7 في محلول منظم V6.21 يحتوي على V13 وفي تفاعل متعدد في محلول منظم V6.21p في وجود CT PB1 وبتادئ GC PorA7 ومسبارات CT PB1-FAM وGC PorA7-Alexa546. في تجربة مقارنة تم اختبار العينات أيضاً في تفاعل بسيط باستخدام مسبار GC glnA7-joe. يعرض الجدول درجات الاتفاق بين الاختبارات. 5

جدول 1

اختبارات مقارنة	درجة الإتفاق
CT LAMP مقابل CT PB1-FAM في المتعدد	%92
LAMP مقابل CT porA7-Alexa546 في المتعدد	%95
CT في متعدد مقابل CT Aptima	%83
GC في متعدد مقابل GC Aptima	%86

قائمة المتواليات

SEQUENCE LISTING

<110> Mast Group Limited

<120> Nucleic Acid Probe 10

<130> KER/P442807WO

<140> PCT/GB2014/053238

<141> 2014-10-30

<150> GB1319180.4

<151> 2013-10-30

<160> 26

<170> 5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 10

<221> Modified Base

<222> 9

<223> Designed DNA probe with a labelled cytosine at position 9

<400> 1

gtgcacgccc caatagaat 19 15

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Modified Base

<222> 9

<223> Designed DNA probe with a labelled cytosine at position 9

<400> 2 5

taagataacc cgcacgtg

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 10

<220>

<221> Modified Base

<222> 9

<223> Designed DNA probe with a labelled cytosine at position 9

<400> 3 15

tcgagcaacc gctgtgac

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Modified Base

<222> 10

<223> Designed DNA probe with a labelled cytosine at position 10 5

<400> 4

gcgaacatac cagctatgat caa

<210> 5

<211> 18

<212> DNA 10

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Modified Base

<222> 8

<223> Designed DNA probe with a labelled cytosine at position 8 15

<400> 5

atgttcacca tggcggag

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<221>

<221> Modified Base

<222> 23 5

<223> Designed DNA probe with a labelled cytosine at position 23

<400> 6

ccagggtatc taatcctggt tgc

<210> 7

<211> 7471 10

<212> DNA

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 7

ttgcaactc ttgggtgtag actttgcaac tcttggtggt agactttgca actccttggtg 60

gtagactgg tcataatgga cttttgtaa aaaatttctt aaaatcttag agctccgatt 120 15

ttgaatagct ttggtaaga aaatgggctc gatggctttc cataaaagta gattgttctt 180

aactttggg gacgcgctcg aaatttggtt atctacttta tctcatctaa ctagaaaaaa 240

ttatgcgtct gggattaact ttctgtttc ttagagatt ctggatttat cggaacactt 300

gataaaggct atttctcttg accacagcga atctttgttt aaaatcaagt ctctagatgt 360

tttaaatgga aaagtcgttt cagaggcctc taaacaggct agagcggcat gctacatc 420
ttcacaaag ttttgata gattgaccaa gggatatatt aaacccgcta ttccattgaa 480
agatttgga aacactacat ttttaaaat ccgagacaaa atcaaaacag aatcgattc 540
taagcaggaa tggacagttt ttttgaagc gctccggata gtgaattata gagactattt 600
aatcggtaaa ttgattgtac aagggatccg taagttagac gaaatttgt cttgvcgac 660 5
agacgatcta tttttgcat ccaatcagat ttctttcgc attaaaaaaa gacagaataa 720
agaaacaaa attctaatac catttctat cagcttaatg gaagagttgc aaaaatacac 780
ttgtgggaga aatgggagag tattgtttc taaaataggg attcctgtaa caacaagtca 840
ggtvcgcat aatttaggc ttgcagagtt ccatagtgc atgaaaataa aaattactcc 900
cagagtactt cgtgcaagcg cttgattca ttaaagcaa ataggattaa aagatgagga 960 10
aatcatcgt atttctgtc tctatcag acaaagtgtg tgttcttatt gttctgggga 1020
agaggaagt ccttagtac aaacaccac aatattgtga tataattaa attatattca 1080
tattctgtg ccagaaaaa caccttagg ctatattaga gccatctct ttgaagcgtt 1140
gtctctcga gaggattat cgtacgcaa tatcatctt gcggttgcgt gtcccgtgac 1200
cttcattatg tcggagtctg agcaccctag gcgttgtac tccgtcacag cggttgctcg 1260 15
aagcacgtgc ggggttatct taaaaggat tgcagctgt agtctgctt gagagaacgt 1320
gcgggagatt tgccttaacc ccaccattt tccggagcga gttacgaaga caaacctct 1380
tcgtgaccg atgtactct gtagaaagt cataaactt ttaggataag ttataaat 1440
cctctttct gtctgacggt tcttaagctg ggagaaagaa atggtagctt gttgaaaca 1500

aatctgacta atctccaagc ttaagacttc agaggagcgt ttacctcctt ggagcattgt 1560
ctgggcgatc aaccaatccc gggcgtgat ttttttagc tcttttagga aggatgctgt 1620
ttgcaaactg ttcacgcat ccgttttac tatttcctg gtttaaaaa atgttcgact 1680
atcttctgt ttagaaggtt gcgctatagc gactattcct tgagtcaccc tgtttaggaa 1740
tcttgtaag gaaatatagc ttgctgctcg aactgttta gtacctcgg tccaagaagt 1800 5
ctggcagag gaaactttt taatcgcatc taggattaga ttatgattta aaagggaaaa 1860
ctctgcaga ttcatatcca aagacaatag accaatcttt tctaaagaca aaaaagatcc 1920
tcgatatgat ctacaagtat gtttggtgag tgatgcggtc caatgcataa taactcgaa 1980
taaggagaag ctttcatgc gttccaata ggattcttg cgaatttta aaactcctg 2040
ataagacttt tcgctatatt ctaacgacat ttctgctgc aaagataaaa tcccttacc 2100 10
catgaaatcc ctctgatat aacctatccg caaatgtcc tgattagtga aataatcagg 2160
ttgtaacag gatagcacgc tcggtatfff ttatataaa catgaaaact cgttccgaaa 2220
tagaaaatcg catgcaagat atcgagtatg cgttgtagg taaagctctg atatttgaag 2280
actctactga gtatattctg aggcagcttg ctaattatga gtttaagtgt tcccatcata 2340
aaaacatatt catagtatff aaatacttaa aagacaatgg attacctata actgtagact 2400 15
cggctggga agagctttg cggcgtcgt tcaaagatat ggacaaatcg tatctcgggt 2460
taatgtgca tgatcttta tcaaagaca agcttagatc cgtttctcat acggtttcc 2520
tcgatgattf gagcgtgtgt agcgctgaag aaaattgag caatttcatt ttccgctcgt 2580
ttaatgagta caatgaaaat ccattgcgta gatctccgtt tctattgctt gagcgtataa 2640

aggaaggct tgatagtct atagcaaaga cttttctat tgcagcgcct agaggccggt 2700
ctattatga tatattctca cagtcagaaa ttggagtgcct ggctcgtata aaaaaagac 2760
gagcagcgtt ctctgagaat caaaattctt tctttgatgg ctcccaaca ggatacaagg 2820
atattgatga taaaggagtt atcttagcta aaggtaattt cgtgattata gcagctaggc 2880
catctatagg gaaaacagct ttagctatag acatggcgat aaatcttgcg gttactcaac 2940 5
agcgtagagt tggtttccta tctctagaaa tgagcgcagg tcaaattggt gagcggattg 2300
ttgctaattt aacaggaata tctggtgaaa aattacaaag aggggatctc tctaaagaag 2360
aattattccg agtgaagaa gctggagaaa cagttagaga atcacatttt tatactgca 2420
gtgatagtca gtataagctt aattaatcg cgaatcagat ccggttgctg agaaaagaag 2480
atcgagtaga cgtaatattt atcgattact tgcagttgat caactcatcg gttggagaaa 2540 10
atcgcaaaa tgaaatagca gatatatcta gaaccttaag aggttagcc tcagagctaa 2600
acattcctat agttgttta tccaactat ctagaaaagt tgaggataga gcaaataaag 2660
ttccatgct tcagatttg cgagacagcg gtcaaataga gcaagacgca gatgtgattt 2720
tgttatcaa taggaaggaa tcgtcttcta attgtgagat aactgttggg aaaaatagac 2780
atggatcggg tttctctcg gtattacatt tcgatccaaa aattagtaaa ttctccgcta 2840 15
ttaaaaaagt atggtaaatt atagtaactg ccacttcac aaaagtccta tccacctga 2900
aatcagaag ttggaagaa gacctggtca atctattaag atatctcca aattggctca 2960
aatgggatg gtagaagta taggtcttga tttctttca tctcattacc atgcattagc 3020
agctatcaa agattactga ccgcaacgaa ttacaagggg aacacaaaag ggggtgtttt 3080

atccagagaa tcaaatagtt ttcaattga aggatggata ccaagaatcc gttttacaaa 3140
aactgaattc ttagaggctt atggagttaa gcggtataaa acatccagaa ataagtatga 3200
gtttagtga aaagaagctg aaactgcttt agaagccttg taccatttag gacatcaacc 3260
gttttaata gtggcaacta gaactcgatg gactaatgga acacaaatag tagaccgta 3320
ccaaactctt tctccgatca ttaggattta cgaaggatgg gaaggtttaa ctgacgaaga 3380 5
aaatatagat atagacttaa caccttttaa tccacctct acacggaaac ataaaggatt 3440
cgttgtagag ccatgtccta tcttggtaga tcaaatagaa tcctacttg taatcaagcc 3500
tgcaaatgta taccaagaaa taaaatgcg ttcccaaac gcatcaaagt atgcttacac 3560
atttatcgac tgggtgatta cagcagctgc gaaaaagaga cgaaaattaa ctaaggataa
3620 10
ttcttgcca gaaaacttgt tattaacgt taacgttaa agtcttgc atattttaag 3680
gatgaatcgg tacatctgta caaggaactg gaaaaaaatc gagttagcta tcgataaatg 4740
tatagaaatc gccattcagc ttggctggtt atctagaaga aaacgcattg aatttctgga 4800
ttcttctaaa ctctctaaaa aagaaattct atatctaaat aaagagcgt ttgaagaaat 4860
aactaagaaa tctaaagaac aaatggaaca agaattctatt aattaatagc aggcttgaaa 15
4920
ctaaaaacct aattattta aagctcaaaa taaaaaagag tttaaaatg ggaaattctg 4980
gttttattt gtataacact gaaaactgcg tcttgctga taatatcaaa gttgggcaaa 5040
tgacagagcc gctcaaggac cagcaaataa tccttgggac aaaatcaaca cctgtcgcag
5100 20

ccaaaatgac agcttctgat ggaatatctt taacagtctc caataattca tcaaccaatg 5160
cttctattac aattggttg gatgcggaaa aagctacca gcttattcta gaaaagttgg 5220
gaaatcaaat tcttgatgga atgctgata ctattgttga tagtacagtc caagatattt 5280
tagacaaaat cacaacagac ccttctctag gttgttgaa agctttaac aactttcaa 5340
tcactaataa aattcaatgc aacgggttat tcactcccag taacattgaa actttattag 5400 5
gaggaactga aataggaaaa ttcacagtca cacccaaaag ctctgggagc atgttcttag
5460
tctcagcaga tattattgca tcaagaatgg aaggcggcgt tgttctagct ttgtacgag 5520
aaggatgc taagccctgc gcgattagtt atggatactc atcaggcgtt cctaatttat 5580
gtagtctaag aaccagcatt actaatacag gattgactcc aacaacgtat tcattacgtg 5640 10
taggcggttt agaaagcggg gtggtatggg ttaatgccct ttctaagtc aatgatattt 5700
taggaataac aaatacttct aatgtatctt tttggaagt aatacctcaa acaaacgctt 5760
aaacaatttt tattggattt ttcttatagg ttttatattt agagaaaaca gttcgaatta 5820
cggggtttgt tatgcaaaaat aaaagaaaag tgagggacga tttattaaa attgttaaag 5880
atgtgaaaaa agattcccc gaattagacc taaaatacag agtaaacaag gaaaaagtaa 15
5940
ctttctaaa ttctccctta gaactctacc ataaaagtgt ctactaatt ctaggactgc 6000
ttcaacaaat agaaaactct ttaggattat tcccagactc tctgttctt gaaaaattag 6060
aggataacag tttaaagcta aaaaaggctt tgattatgct tatctgtct agaaaagaca 6120

tgtttccaa ggctgaatag acaacttact ctaacgttgg agttgattg cacacctag 6180
tttttgctc tttaaggga ggaactggaa aaacaacact ttctctaaac gtgggatgca 6240
actggccca attttaggg aaaaaagtgt tacttgctga cctagaccgg caatccaatt 6300
tatctctgg attgggggct aggtcagaa ataaccaaaa aggctgcac gacatagat 6360
acaaatcaaa cgatttaaaa tcaatcattt gcgaaacaaa aaaagatagt gtggaccta 6420 5
ttctgcatc attttatcc gaacagtta gagaattgga tattcataga ggacctagta 6480
acaacttaa gttattctg aatgagtact gcgctcctt ttatgacatc tgcataatag 6540
acactccacc tagcctagga gggtaacga aagaagctt ttgtgcagga gacaaataa 6600
ttgctgttt aactccagaa ctttttcta ttctagggtt acaaaagata cgtgaattct 6660
taagttcggc cgaaaacct gaagaagaac acattcttg aatagcttg tcttttggg 6720 10
atgatcgtaa ctcgactaac caaatgtata tagacattat cgagtctatt taaaaaaca 6780
agctttttc aacaaaaatt cgtcgagata ttctctcag ccgttctct ctaaagaag 6840
attctgtagc taatgtctat ccaaattcta gggccgcaga agatattctg aagttaacgc 6900
atgaaatagc aaatatttg catatcgaat atgaacgaga ttactctcag aggacaacgt 6960
gaacaaacta aaaaaagaag cggatgtctt ttttaaaaaa aatcaaactg ccgcttctct 7020 15
agatttaag aagacacttc ctccattga actatttca gcaacttga attctgagga 7080
aagtcagagt ttgatcgat tttttatc agagtcccaa aactattcgg atgaagaatt 7140
ttatcaagaa gacatcctag cggtaaaact gcttactggc cagataaaat ccatacagaa 7200
gcaacacgta ctcttttag gagaaaaaat ctataatgct agaaaaatcc tgagtaagga 7260

tcacttctcc tcaacaactt tttcatcttg gatagagtta gtttttagaa ctaagtcttc 7320
tgcttacaat gctcttgcac attacgagct tttataaac ctccccaacc aaactctaca 7380
aaaagagttt caatcgcacc cctataaatc cgcatatatt ttggccgcta gaaaaggcga 7440
tttaaaaacc aaggtcgcag tgatagggaa agtatgtgga atgtcgaact catcggcgat 7500
aagggtgttg gatcaattc ttccttcac tagaaacaaa gacgtagag aaacgataga 7560 5
taagtctgat ttagagaaga atcgccaatt atctgattc ttaatagaga tacttcgcat 7620
catatgttcc ggagtttctt tgcctccta taacgaaaat cttctacaac agcttttga 7680
acttttaag caaaagagct gatcctccgt cagctcatat atatattat tatatatata 7740
7771 ttatttagg gatttgattt tacgagagag a
<210> 8 10
<211> 743
<212> DNA
<213> Neisseria gonorrhoeae
<400> 8
gccggcggcg gcgcgaccg ttggggcaat agggaaatcct ttgtcggcct ggcaggcgaa 60 15
ttcggcacgc tgcgcgccg ccgcgttgcg aatcagtttg acgatgccag ccaagccatt 120
gatccttggg acagcaaaa tgatgtggct tcgcaattgg gtattttcaa acgccacgac 180
gatatgccg tttccgtacg ctacgactcc ccggactttt ccggtttcag cggcagcgtc 240
caattcgttc cggctcaaaa cagcaagtcc gcctatacgc cggctcattg gactactgtg 300

tataacacta acggtactac tactactttc gttccggctg ttgtcggcaa gcccgatcg 360
gatgtgtatt atgccgtct gaattacaaa aatggcggtt ttgccgggaa ctatgccttt 420
aaatatgca gacacgcaa tgcggacgt aatgctttg agttgttctt gctcggcagt 480
gggagtgatg aagccaaagg taccgatccc ttgaaaaacc atcaggtaca ccgcctgacg
540 5
ggcggctatg gggaaggcgg ctgaaatctc gccttggcgg ctcagttgga tttgtctgaa 600
aatgccgaca aaaccaaaaa cagtacgacc gaaattgccg cactgcttc ctaccgcttc 660
ggtaatacag tccgcgcat cagctatgcc catggtttcg actttgtcga acgcagtcag 720
743 aaacgcgaac ataccagcta tga
<210> 9 10
<211> 1356
<212> DNA
<213> Neisseria gonorrhoeae
<400> 10
cccgtttgt cgatttgcgc ttcaccgata ccaaaggcaa gcagcaccac ttaccgtgc 60 15
ctgcgcat cggttgaa gacccgaag agtggttga aaacggaccg gcgttgacg 120
gctcgtccat cggcggctgg aaaggcattg aggctccga tatgcagctg cgtcccgatg 180
cgtccacagc cttcgtcgt ccttttatg atgatgttac cgtcgtcatt acctgcgacg 240
tcatcgacc tgccgacggt cagggttacg accgcgacc gcgctccatc gcacgccgcg 300

ccgaagccta ttgaaatct tccggtatcg gcgacaccgc ctatttcggc cccgaaccg 360
aattcttctgt cttcgacggc gtagaatttg aaaccgacat gcacaaaacc cgttacgaaa 420
tcacgtccga aagcggcgcg tgggcaagcg gcctgcatat ggacgggtcaa aacaccggcc
480
accgccccgc cgtcaaaggc ggctacgcg ccgctcgcc gattgactgc ggtcaagatt 540 5
tgcgctccgc catggtgaac atttggaag gactcggcat cgaagtcgaa gtccaccaca 600
gccaagtcgg taccggcagc caaatggaaa tcggcaccg ttcgccact ttggtcaaac 660
gcgccgacca aaccaagat atgaaatcg tcatcaaaa cgttgccac aatttcggca 720
aaaccgccac ctttatgcc aaaccgatta tgggcgacaa cggcagcgg atgcacgtcc 780
accaatccat ttgaaagac ggtcaaaacc tgctcgagg cgacggctat gccggtttgt 840 10
ccgataccgc gctctactac atcggcgcca tcatcaaca cgccaaagcc ctgaacgcca 900
ttaccaatcc gtccaccaac tctacaaac gcctcgtgcc gcactttgaa gcaccgacca 960
aattggccta ttccgcaaaa aaccgttccg cttccatccg tatcccgtct gtgaacagca 1020
gcaaggcgcg ccgcatcgaa gcgcgttcc ccgaccggac cgccaaccg tatttggcat
1080 15
ttgccccct gctgatggcc ggtttgacg gcattcaaaa caaatccat ccgggacgacc 1140
ctgccgataa aaacctgtac gacctgccg cggaagaaga cgcgctcgtc ccgaccgtct
1200
gcgctctttt ggaagaagca cttgccgccc tcaaggtcga ccacgaattc ctgctgcgcg 1260
gcggcgtgtt cagcaaagac tggatcgaca gctacatcgc cttaaagag gaagatgtcc 1320 20

1356

gccgcatccg tatggcgccg cacccgctgg aatttg

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 5

<400> 10

tctacaagag tacatcggtc a 21

<210> 11

<211> 18

<212> DNA 10

<213> Artificial Sequence

<400> 11

tgaagcgttg tcttctcg 18

<210> 12

<211> 39 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

gcagcttgta gtcctgcttg agtcttcgta actcgctcc 39

<210> 13

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13 5

tcgagcaacc gctgtgaccc ttcattatgt cggagtctg 33

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 10

<400> 14

cgggcgattt gcctaac 14

<210> 15

<211> 18

<212> DNA 15

<213> Artificial Sequence

<400> 15

tacaaacgcc tagggtgc 18

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

accaaaaaca gtacgaccga 20 5

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17 10

aagtgcgctt ggaaaaatcg 20

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 15

<400> 18

atgggcata gctgatgcdc gaattgccgc cactgcttc 39

<210> 19

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

tcgactttgt cgaacgcagt caaatcgaca ccggcgcgatga 40

<210> 20 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

gcgaacatac cagctatgat caa 23 10

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21 15

tcatatcttg ggtttggtcg 20

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

ctgcatatgg acggtcaaa 19

<210> 23

<211> 37 5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

cgaagtccac cacagcgaat ttgaccaaag tggcgaa 37

<210> 24 10

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

cttcgatgcc gagtccttc gattgactgc ggtcaagat 39 15

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

caaatggaaa tcggcaccc 25

<210> 26

<211> 18

<212> DNA 5

<213> Artificial Sequence

<400> 26

atgttcacca tggcggag 18

عناصر الحماية

- 1- طريقة لكشف متواليه حمض نووي nucleic acid مستهدف في عينة تشتمل على:
تضخيم حمض نووي nucleic acid مستهدف في العينة عن طريق تضخيم ثابت درجة الحرارة
ناتج عن حلقة loop؛
التحقق من الحمض النووي nucleic acid المضخم باستخدام مسبار probe يشتمل على،
5 متواليه مسبار أوليجونيكلو تيد oligonucleotide probe مكمله لمنطقة متواليه حمض نووي
nucleic acid مستهدف، حيث يكون لمتواليه مسبار probe الأوليجونيكلو تيد
oligonucleotide probe المذكورة رمز حامل تآلق واحد فقط وحيث يرتبط الرمز بقاعدة
سيتوسين cytosine base داخلية وحيث لا يكون بمتواليه مسبار probe الأوليجونيكلو تيد
probe oligonucleotide المذكورة فاصل طرف 3، حيث يتم تثبيت قاعدة السيتوسين مركزياً
10 إلى حد كبير على امتداد طول الأوليجونيكلو تيد oligonucleotide باستثناء للمواضع 1-3
عند الطرف 3، والموضع 1 عند الطرف 5، و كشف وجود الحمض النووي nucleic acid
المستهدف، حيث تشير الزيادات في تآلق المسبار probe إلى وجود الحمض النووي nucleic
acid المستهدف في العينة.
- 15 2- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 1، حيث تكون متواليه مسبار أوليجونيكلو تيد
oligonucleotide probe هي متواليه DNA وتكون متواليه الحمض النووي nucleic acid
المستهدف عبارة عن متواليه DNA
- 20 3- الطريقة وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة، حيث يشتمل حامل التآلق على أي واحد أو
أكثر منتقى مما يلي: FAM، JOE، TET، HEX، TAMRA، ROX، ALEXA و ATTO.
- 4- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 3، حيث يكون حامل التآلق هو FAM، Joe و Alexa546.
- 25 5- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 1، حيث تشتمل متواليه مسبار أوليجونيكلو تيد
oligonucleotide probe على المتواليه التالية:

3' X_m C * X_n 5' (هوية متوالية رقم 1)

حيث n هي < 1، 3 < m، X هي قاعدة نيوكليوتيد nucleotide base ؛ و * هي حامل تألق

و

يتم اختيار قاعدة النيوكليوتيد nucleotide base من A، T، C و G،

5 n تكون أكبر من 1 إلى 20 ، بشكل مفضل أكثر من 1 إلى 10 و

m تكون أكبر من 3 إلى 20 وأقل، بشكل مفضل أكبر من 3 إلى 10.

6- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 1، حيث تشتمل متوالية مسبار أوليجونيكلو تيد

oligonucleotide probe على واحدة أو أكثر من المتواليات التالية:

10 هوية متوالية رقم 3: TAAGATAAC[C-FAM]CCGCACGTG

هوية متوالية رقم 5: GCGAACATA [C-ALEXA546] CAGCTATGATCAA

أو

هوية متوالية رقم 6: .ATGTTCA [C-JOE] CATGGCGGAG.

15 7- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 1، حيث يكون الحمض النووي nucleic acid المستهدف من

كائن دقيق micro-organism ، فطريات fungi ، خميرة yeast أو فيروس virus.

8- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 1، حيث يكون الحمض النووي nucleic acid المستهدف من

Chlamydia trachomatis و Neisseria gonorrhoeae.

20

9- طريقة في المختبر لتشخيص عدوى Chlamydia و/ أو Gonorrhoea في مريض، تشتمل

على

توفير عينة مشتقة من المريض؛

تنفيذ طريقة وفقاً لأي من عناصر الحماية 1-8، و

كشف وجود حمض نووي nucleic acid مشتق من Chlamydia trachomatis و/ أو Neisseria gonorrhoeae، حيث تشير زيادة في تآلق المسبار probe إلى وجود عدوى Chlamydia trachomatis و/ أو Neisseria gonorrhoeae.

5 10- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 9، حيث يتم إضافة نوع منفرد من مسبار probe مخصص لحمض نووي nucleic acid من أي من Chlamydia trachomatis و Neisseria gonorrhoeae إلى العينة.

10 11- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 9، حيث يتم إضافة مسبارين مختلفين على الأقل إلى العينة حيث يتم ترميز مسبار probe أول باستخدام رمز تآلق أول ويكون مخصص للتحقق من حمض نووي Chlamydia trachomatis nucleic acid ويتم ترميز مسبار ثاني باستخدام رمز تآلق مختلف عن المسبار الأول ويكون مخصص للتحقق من حمض نووي nucleic acid Neisseria gonorrhoeae.

15 12- الطريقة وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة، حيث يتم تزويد المسبارات probes في نظام محلول منظم يشتمل على dNTPs بتركيز من 1-10 مللي مولار، واحد أو أكثر من الأملاح بتركيز كل ملح من 2-20 مللي مولار، تريس Tris رقم هيدروجيني 8.8 بتركيز من 10-100 مللي مولار، تيرهالوز Trehalose بتركيز من 10-100 مللي مولار، بوليميراز polymerase BST بكمية من 1 وحدة-12 وحدة و 0.01%-1% ، 1، 2 بروبان دايلول 1,2 propanediol.

20 13- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 12، حيث يتم اختيار واحد أو أكثر من الأملاح من المجموعة التي تشتمل على KCl، (NH₄)₂SO₄ و MgSO₄.

25 14- مسبار probe لتضخيم حمض نووي nucleic acid ثابت درجة الحرارة يشتمل على متوالية مسبار أوليجونيكلو تيد oligonucleotide probe مكتملة لمنطقة متوالية حمض نووي nucleic acid مستهدف، حيث يكون لمتوالية مسبار probe الأوليجونيكلو تيد المذكورة رمز

حامل تآلق واحد فقط وحيث يرتبط الرمز بقاعدة سيتوسين cytosine base داخلية وحيث لا يكون بمتواليه مسبار الأوليجونيكلو تيد المذكورة فاصل طرف 3، حيث يتم تثبيت قاعدة السيتوسين مركزياً إلى حد كبير على امتداد طول الأوليجونيكلو تيد oligonucleotide باستثناء للمواضع 3-1 عند الطرف 3، والموضع 1 عند الطرف 5، وحيث يشتمل المسبار probe على واحدة أو أكثر من المتواليات التالية:

هوية متواليه رقم 3: TAAGATAAC[C-FAM]CCGCACGTG

هوية متواليه رقم 5: GCGAACATA [C-ALEXA546] CAGCTATGATCAA
أو

هوية متواليه رقم 6: .ATGTTCA [C-JOE] CATGGCGGAG

10

15- طاقم للكشف عن حمض نووي nucleic acid مستهدف طبقاً لطريقة وفقاً لعنصر الحماية 1 حيث يشتمل على مسبار probe طبقاً لعنصر الحماية 14، محلول منظم كاشف تضخيم ثابت درجة الحرارة ناتج عن حلقة loop، إنزيم، dNTPs وواحد أو أكثر من بوادئ تضخيم ثابتة درجة الحرارة ناتجة عن حلقة.

15

16- الطاقم وفقاً لعنصر الحماية 15، يشتمل أيضاً على عينة مقارنة موجبة وسالبة.

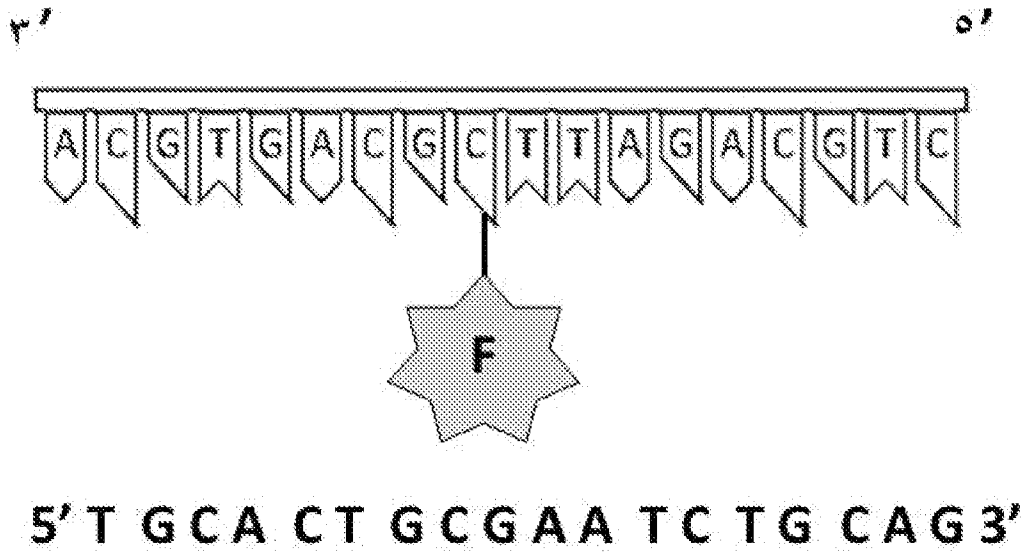
17- الطاقم وفقاً لعنصر الحماية 16، حيث يشتمل محلول منظم الكاشف على dNTPs بتركيز من 1-10 مللي مولار، واحد أو أكثر من الأملاح بتركيز من 2-20 مللي مولار، تريس Tris رقم 20 هيدروجيني 8.8 بتركيز من 10-100 مللي مولار، تيرهاالوز Trehalose بتركيز من 10-100 مللي مولار، بوليميراز BST polymerase بكمية من 1 وحدة-12 وحدة و0.01%-1% 1، 2 بروبان دايلول 1,2 propanediol.

18- الطاقم وفقاً لعنصر الحماية 17، حيث يتم اختيار واحد أو أكثر من الأملاح من المجموعة

25 التي تشتمل على KCl، (NH₄)₂SO₄ وMgSO₄.

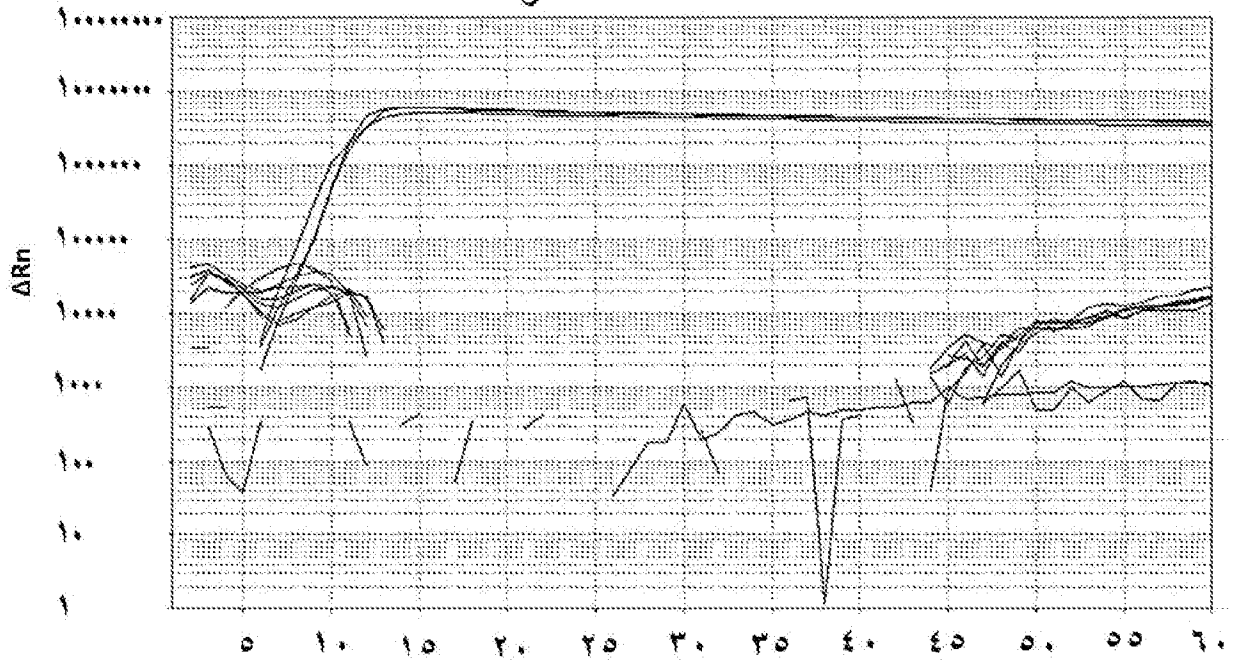
شكل ١

صورة تخطيطية لمسبار MAST DNA



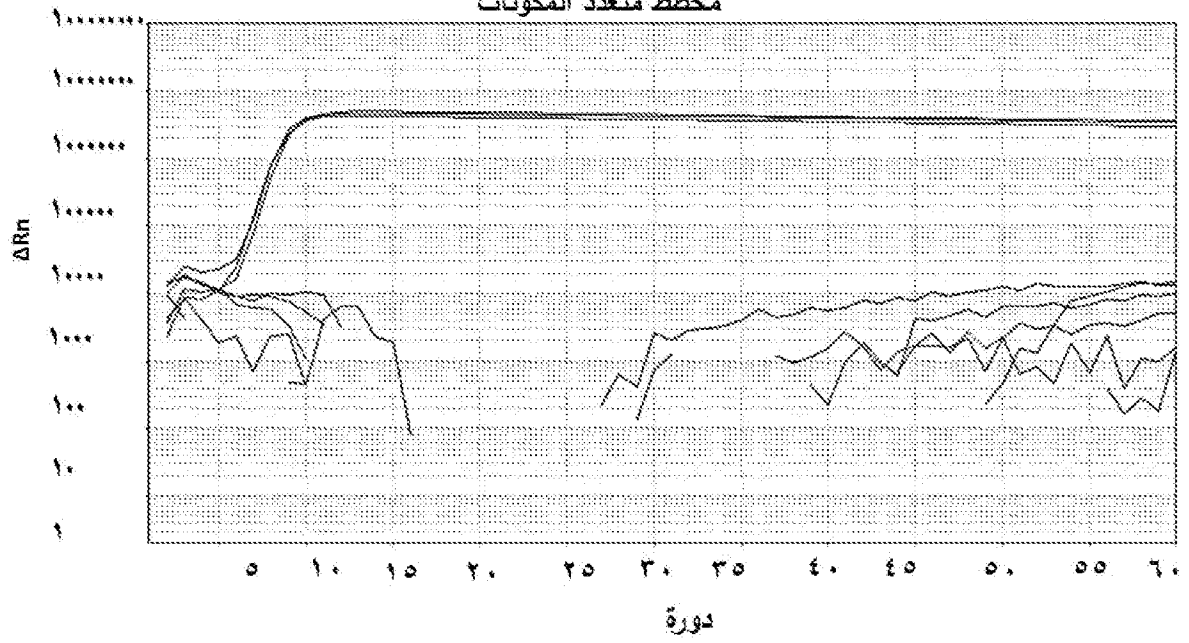
شكل ٢ أ

مخطط متعدد المكونات



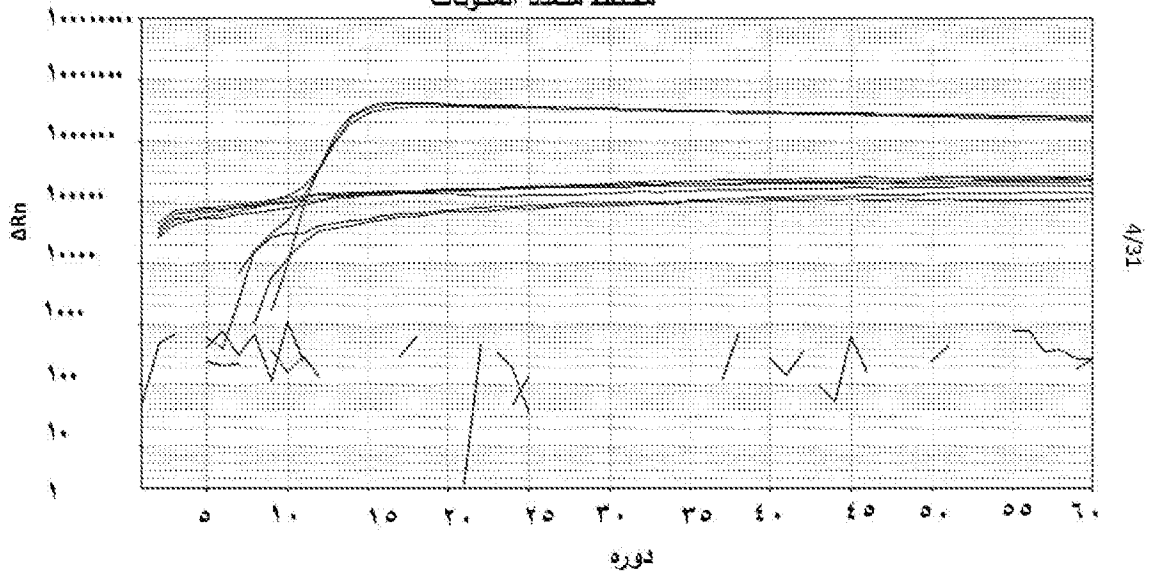
شكل ٢ ب

مخطط متعدد المكونات



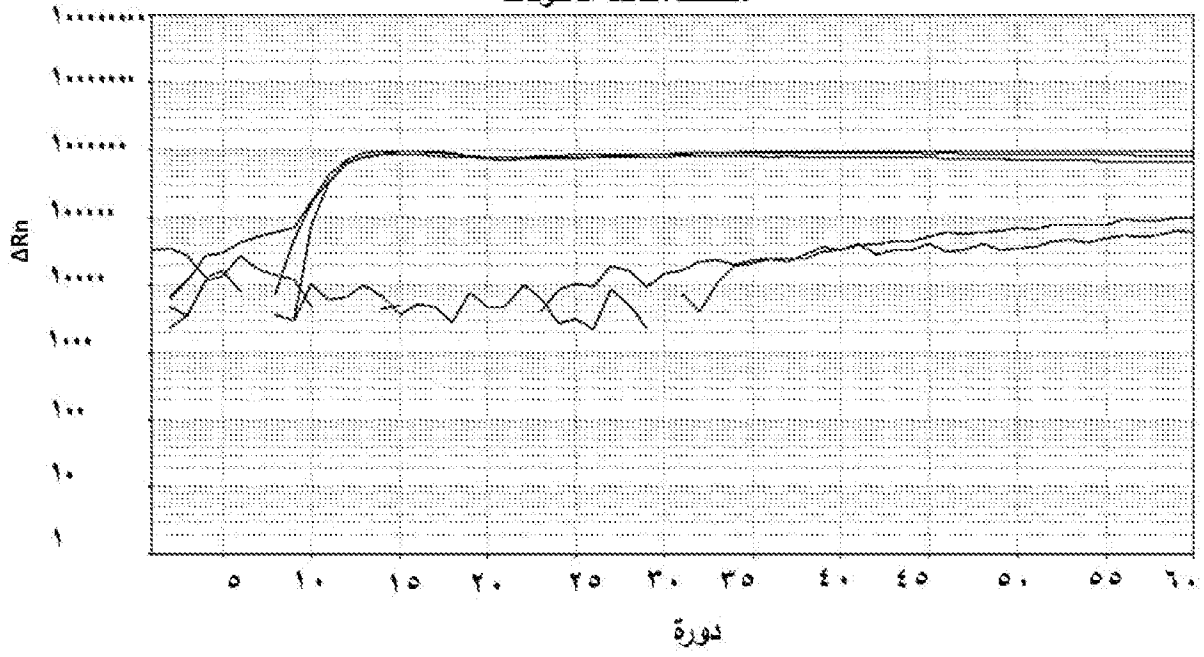
شكل ٢ ج

مخطط متعدد المكونات



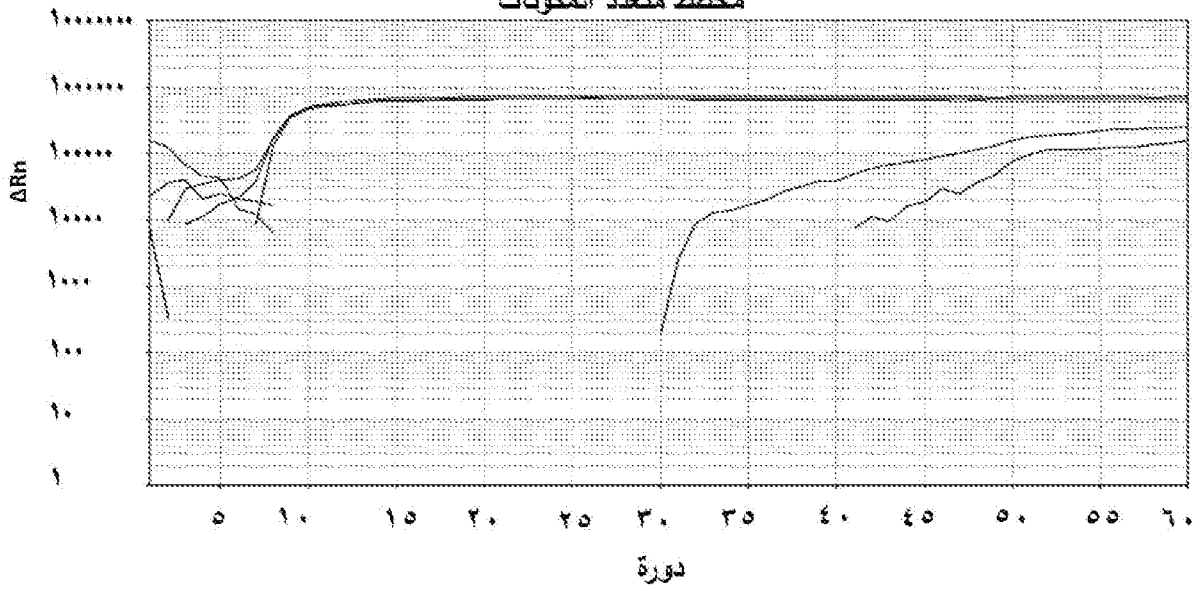
شكل ٢ د

مخطط متعدد المكونات



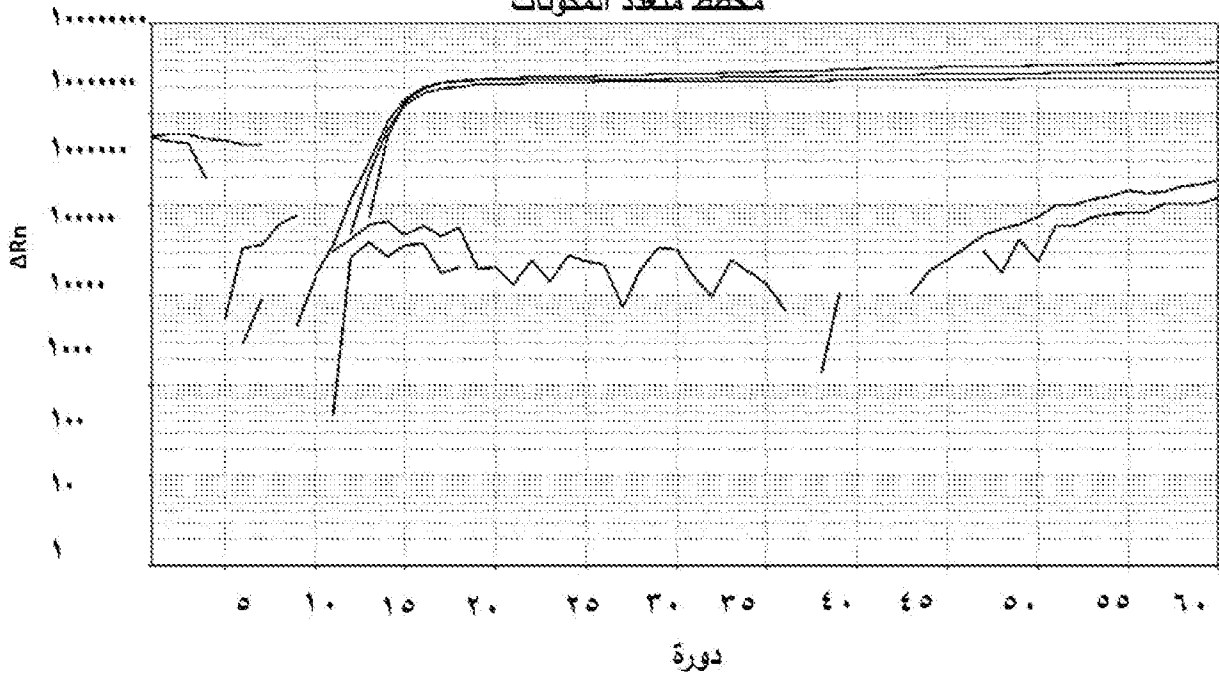
شكل ٢٨

مخطط متعدد المكونات

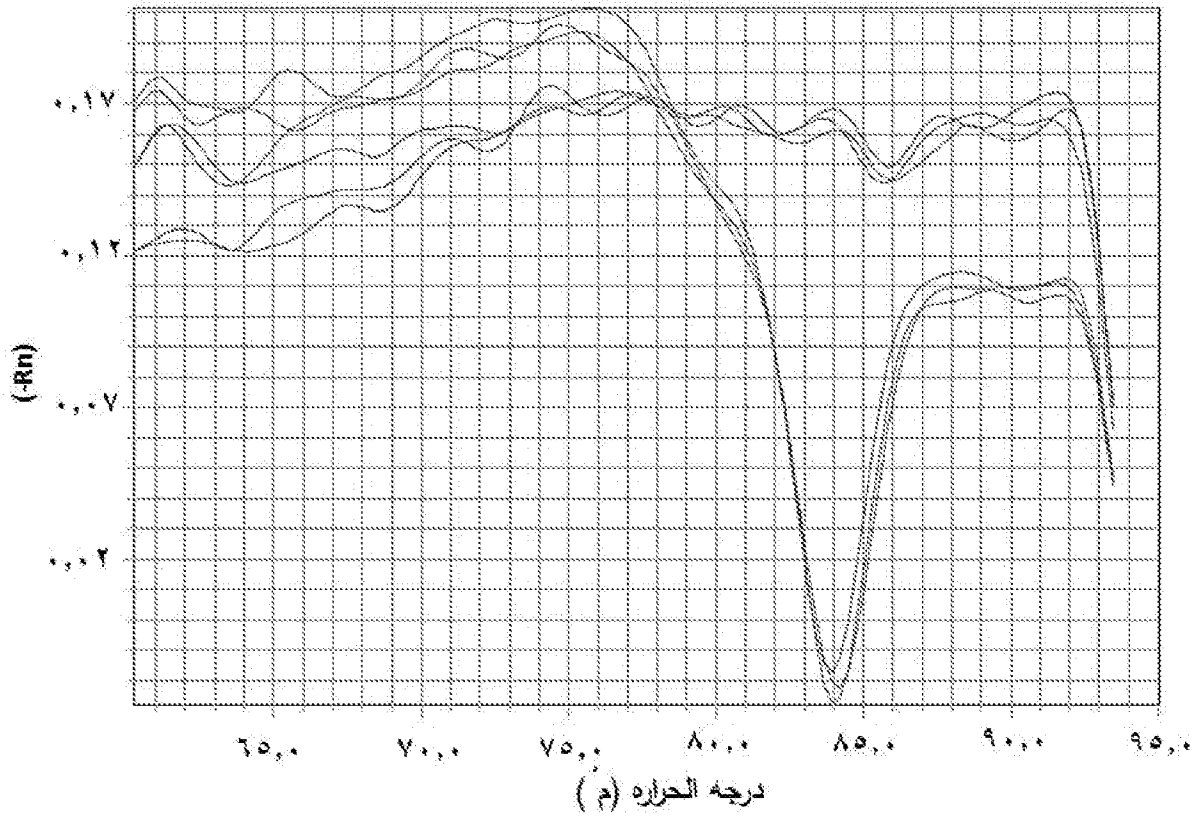


شكل ٢ و

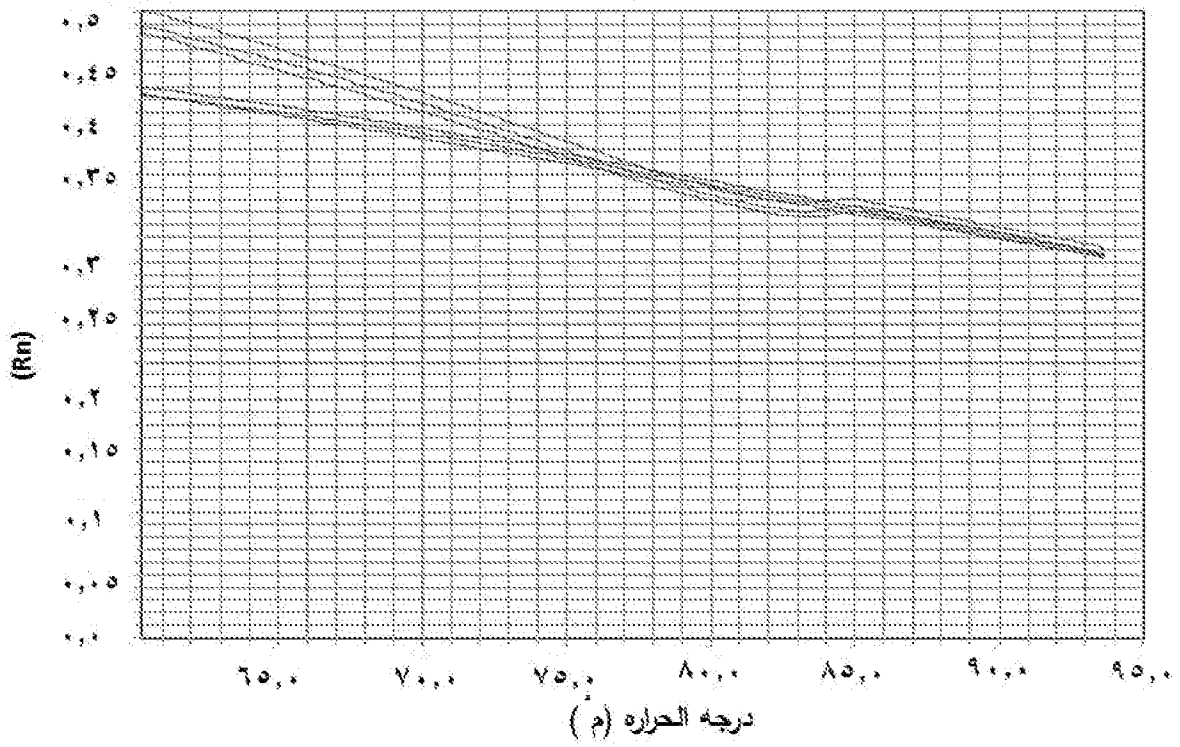
مخطط متعدد المكونات



شكل ٣ أ
متحني الإصهار

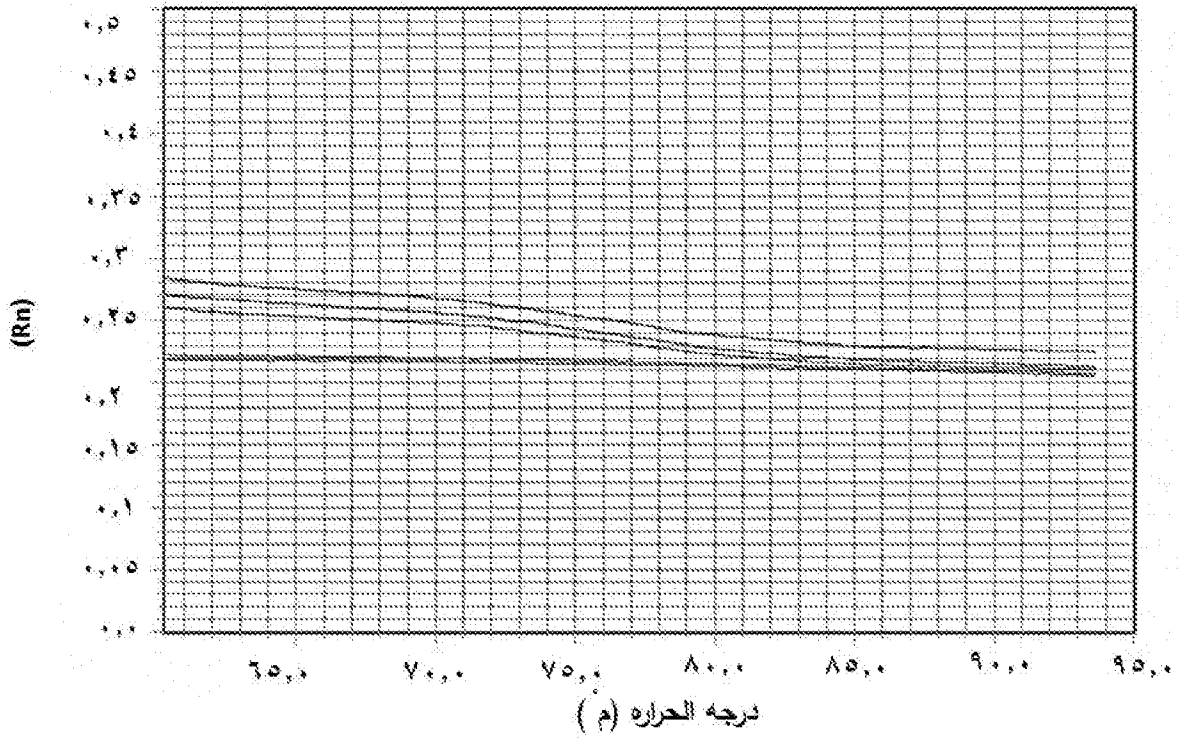


شكل ٣ ب
منحنى الإنصهار



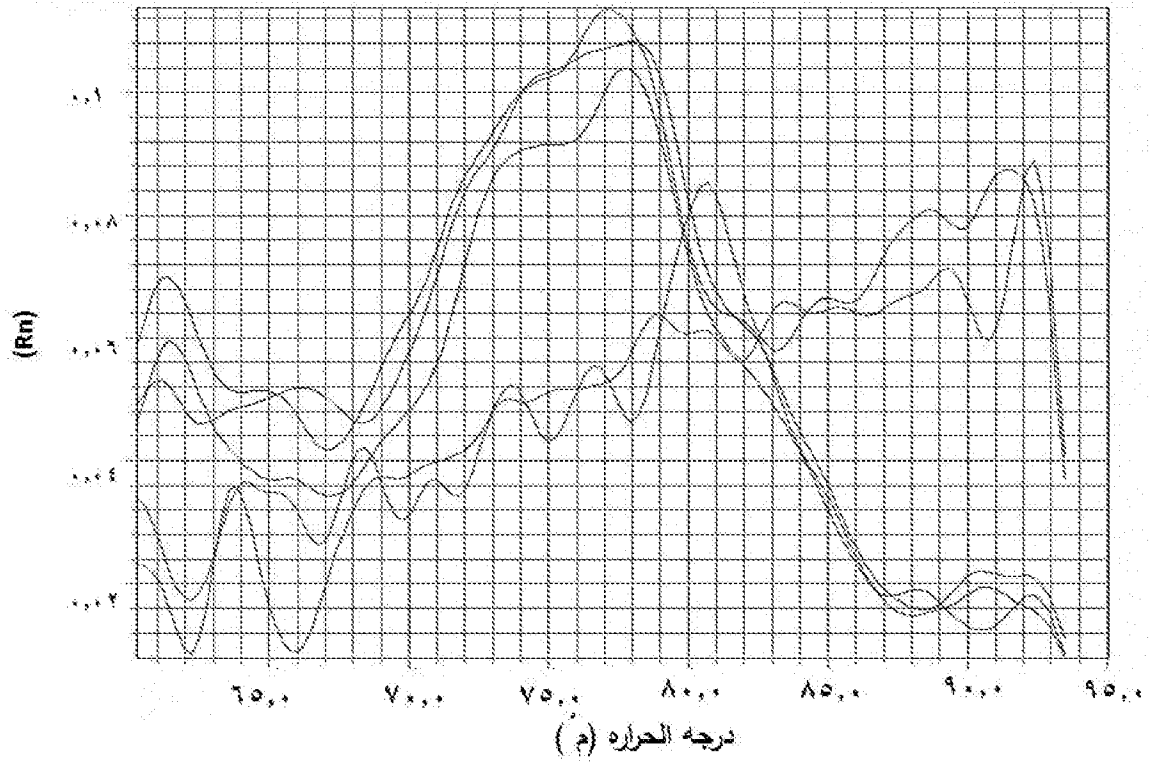
شكل ٤ أ

منحنى الإنصهار

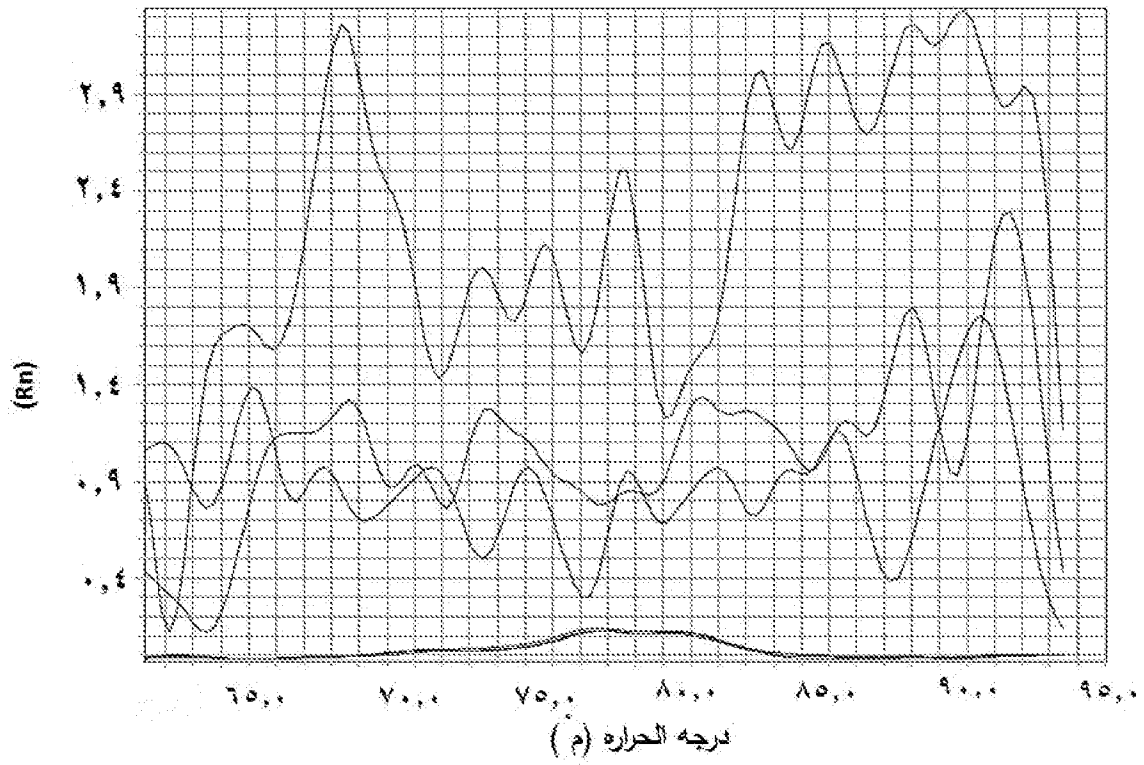


شكل ٤ ب

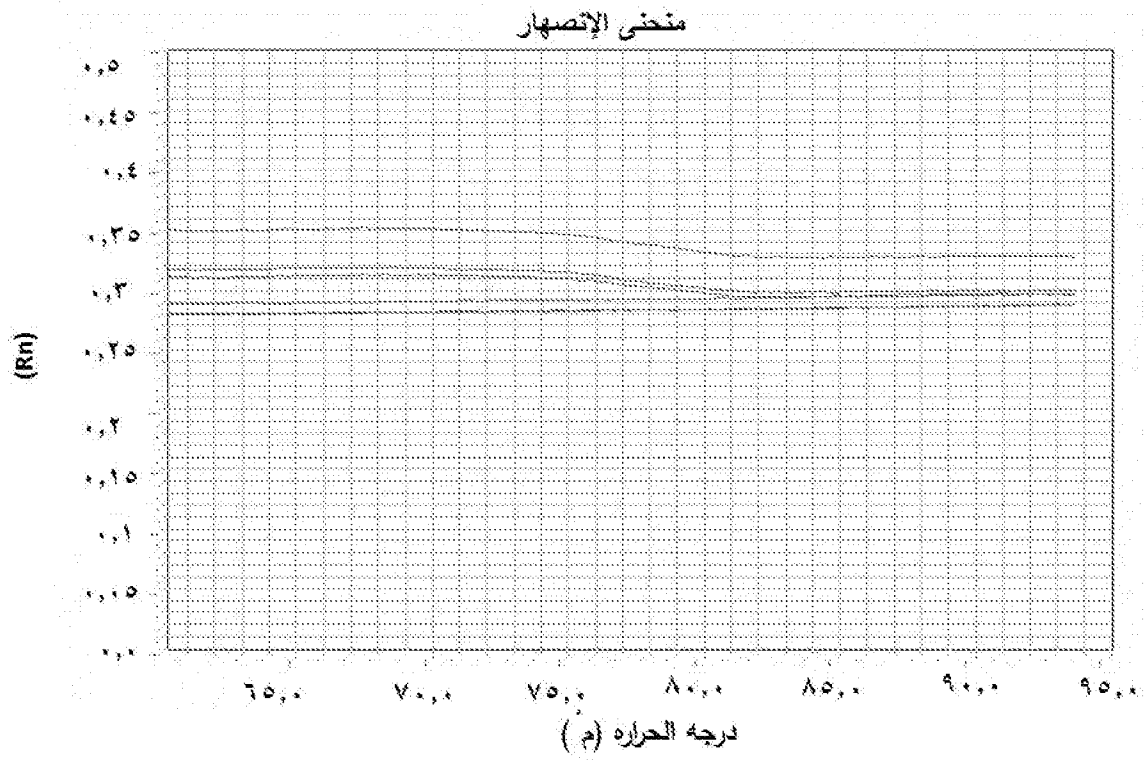
منحنى الإنبهار



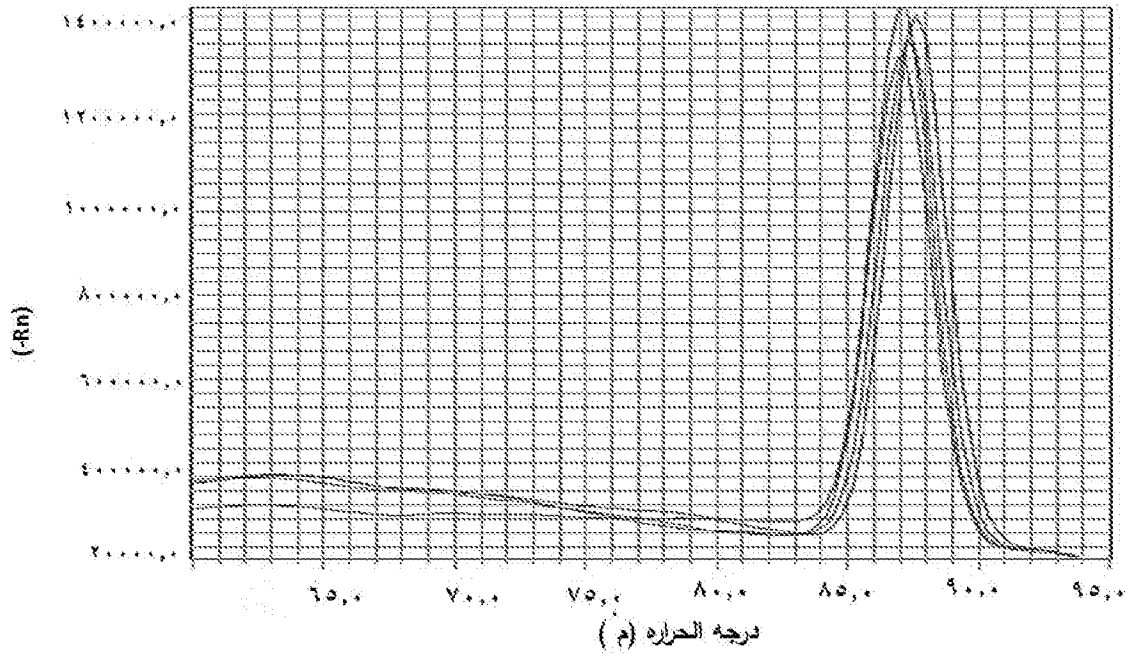
شكل ٥
منحنى الإصهار



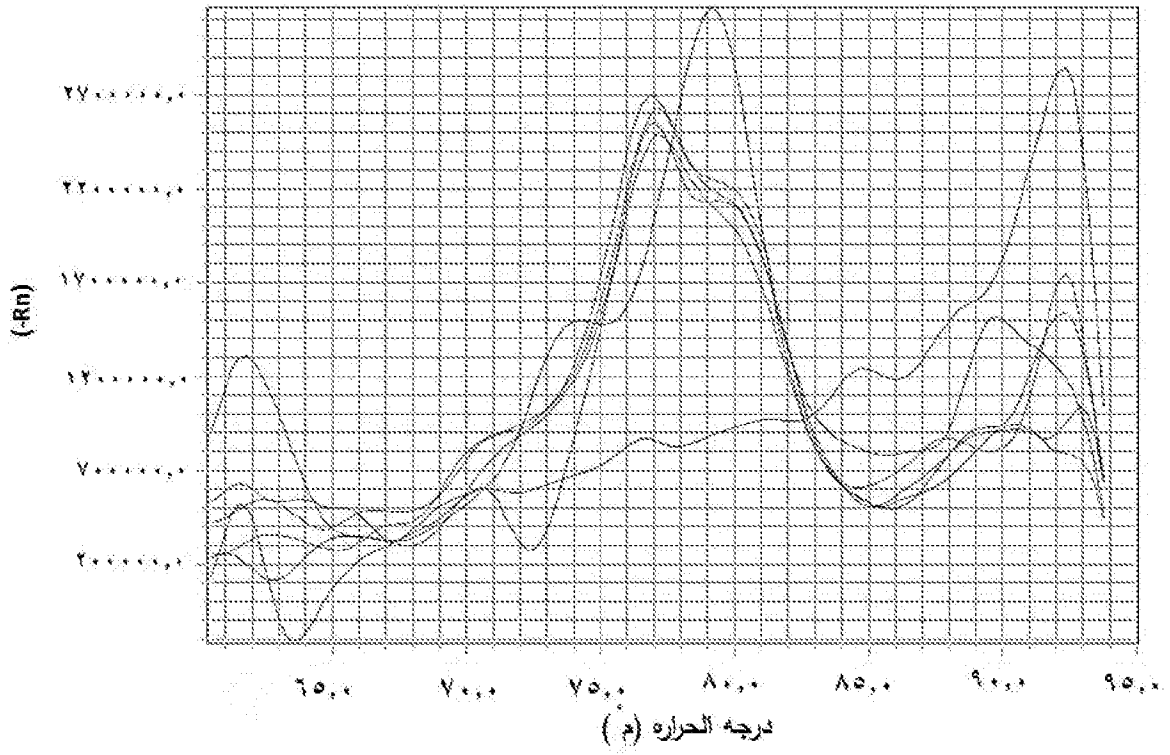
شكل ٥ب

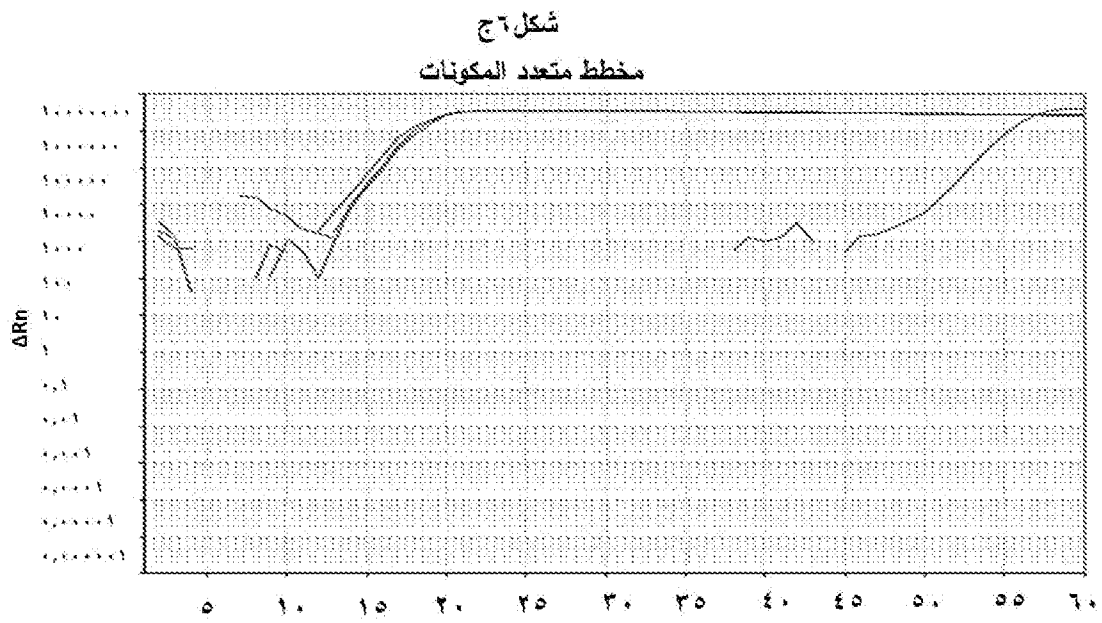


شكل ١٦
منحنى الإصهار

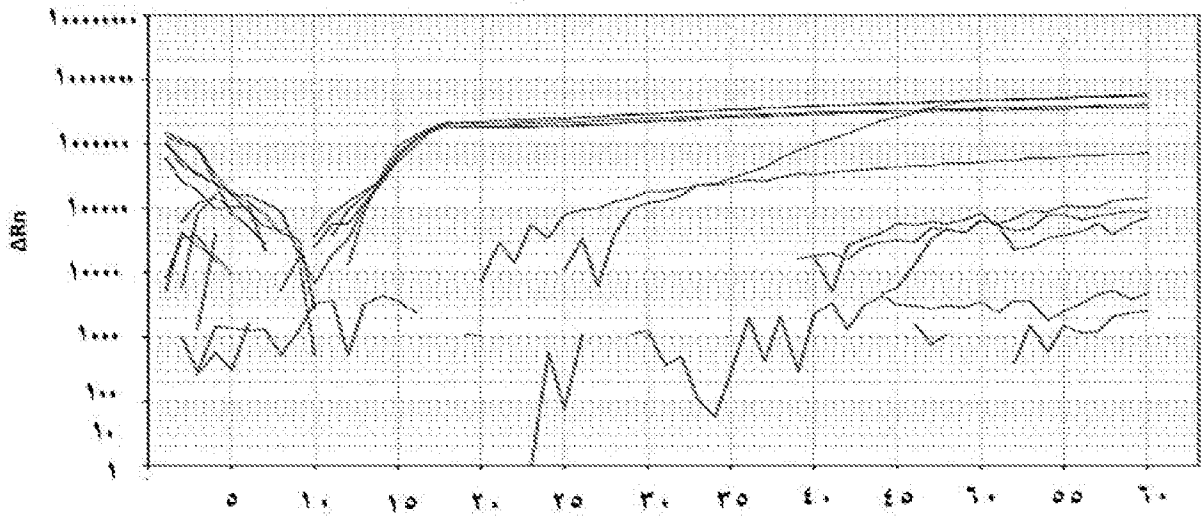


شکل ٦ ب
منحنی الإنصهار

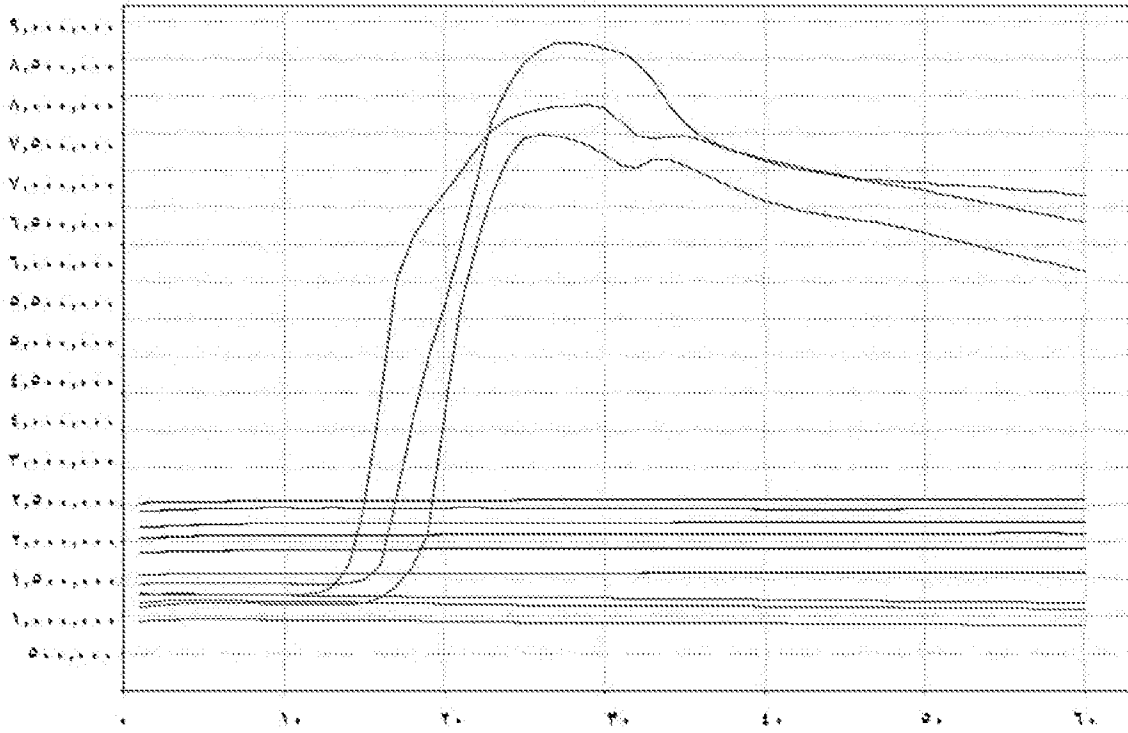




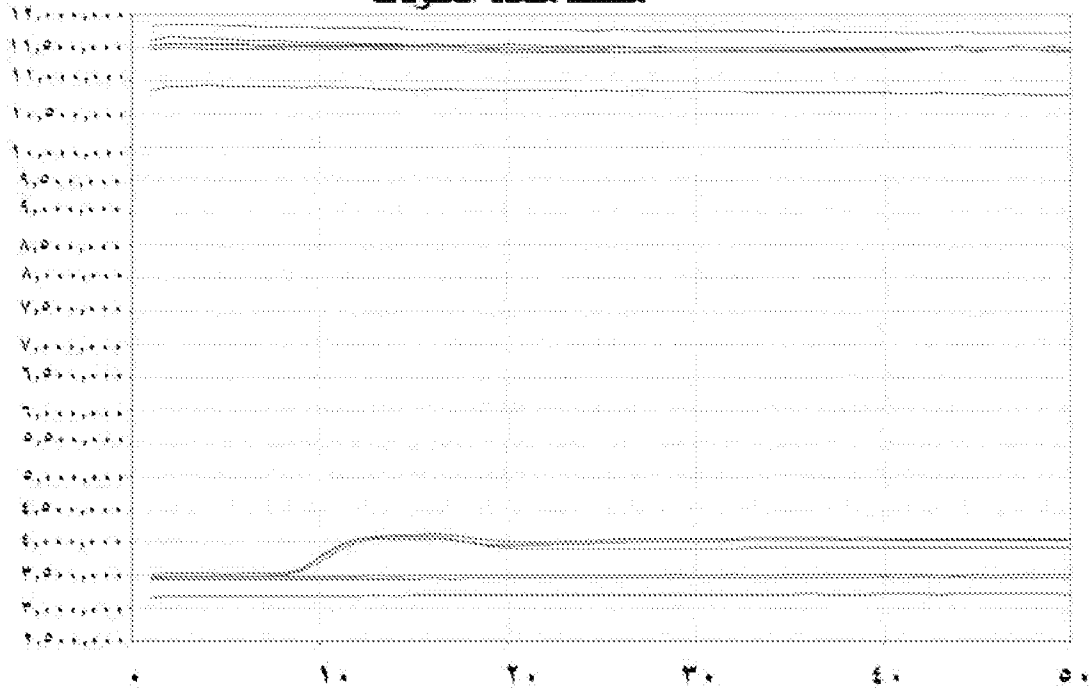
شكل ٦
مخطط متعدد المكونات



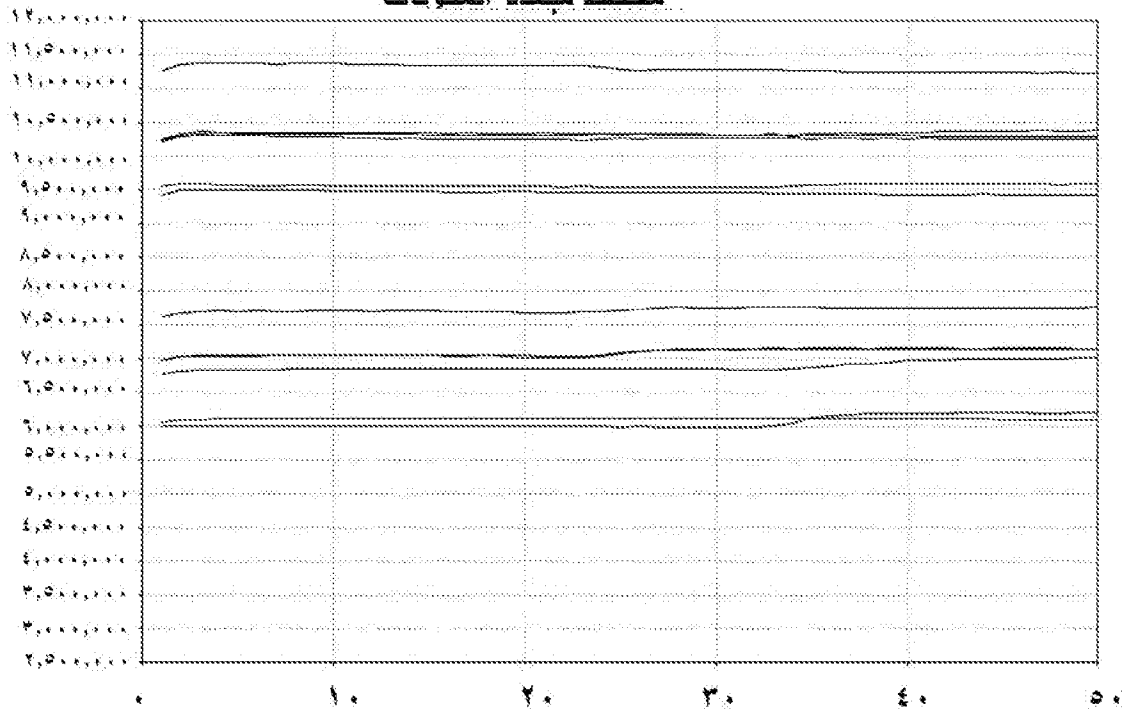
شكل ٧
مخطط متعدد المكونات



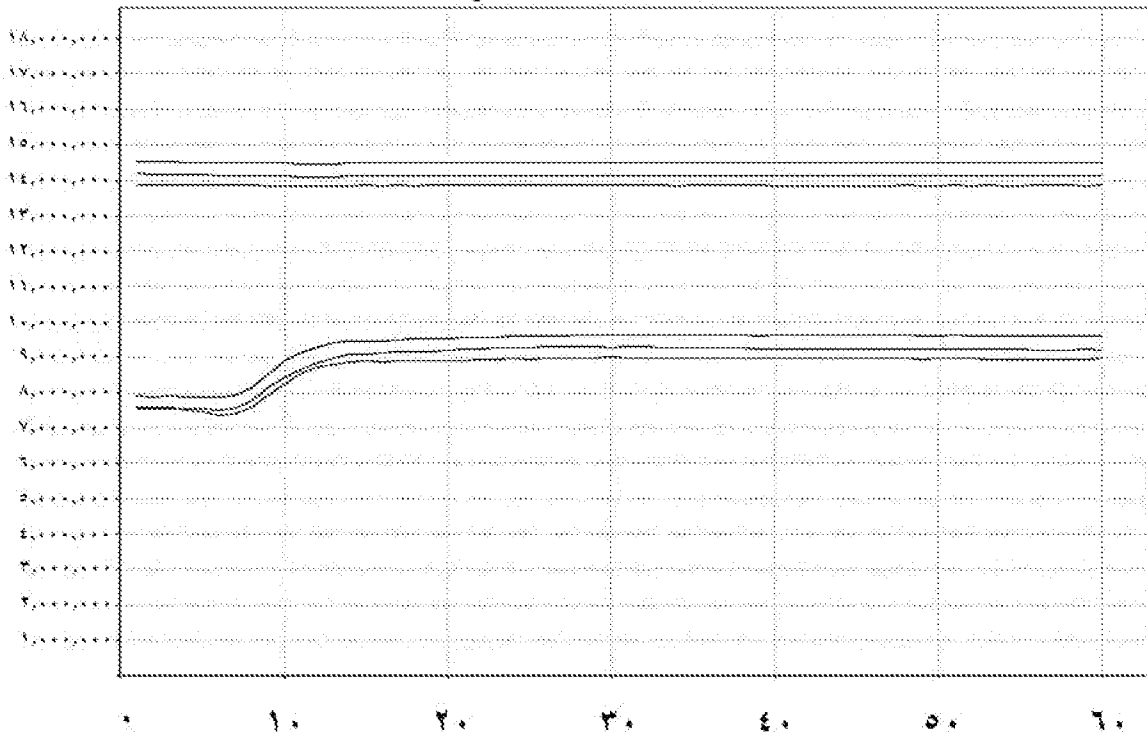
شكل ١٨
مخطط متعدد المكونات



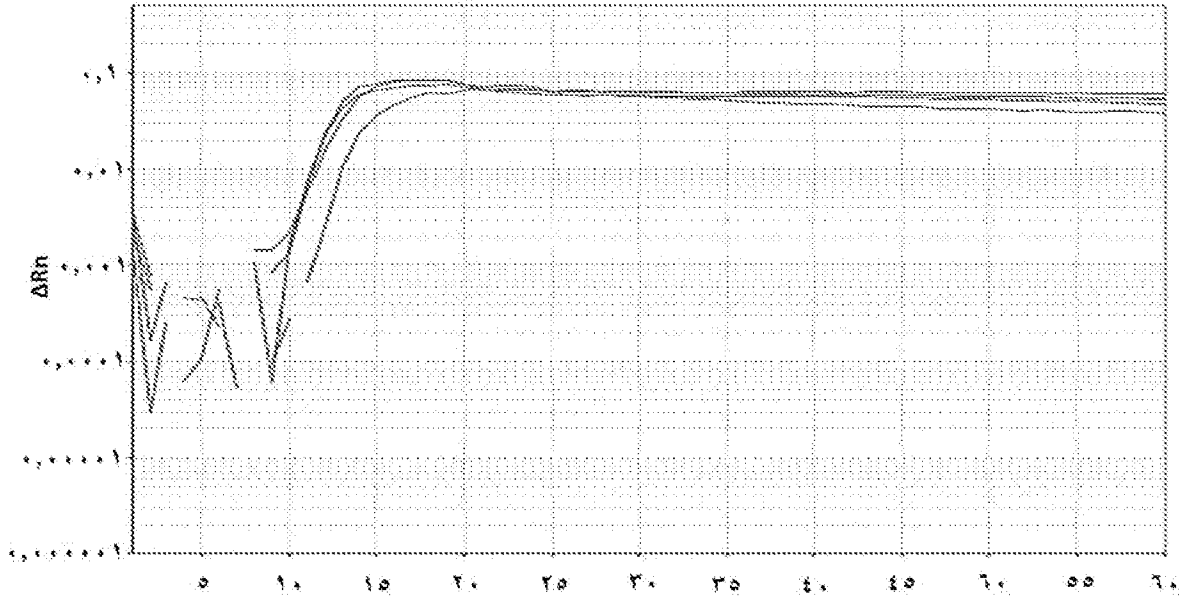
شكل ٨ ب
مخطط متعدد المكونات



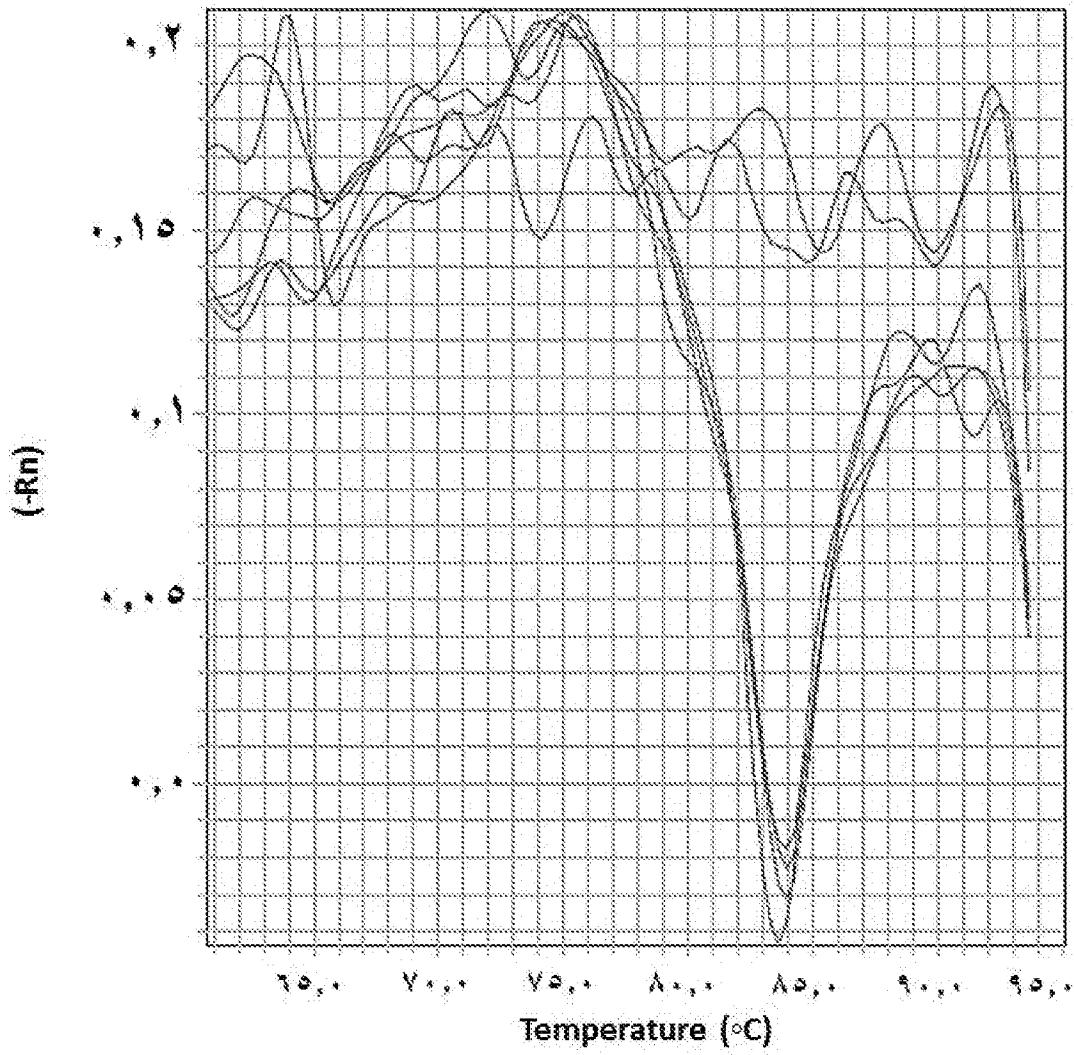
شكل ١٩
مخطط متعدد المكونات



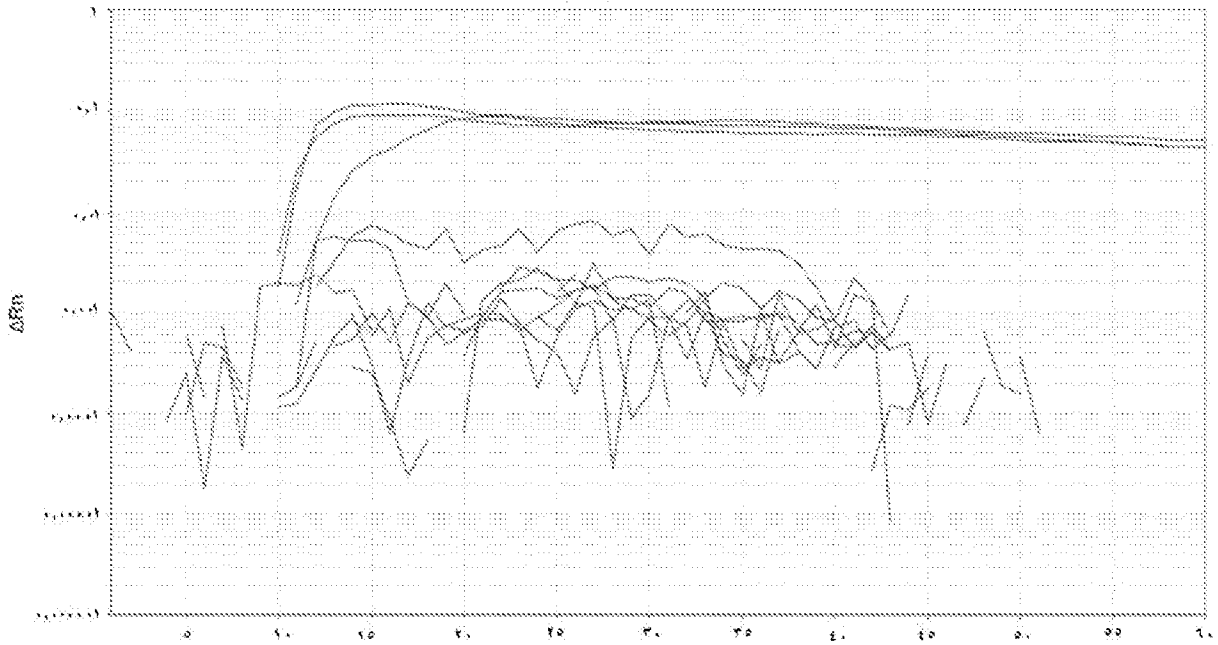
شكل ٩ ب
مخطط متعدد المكونات



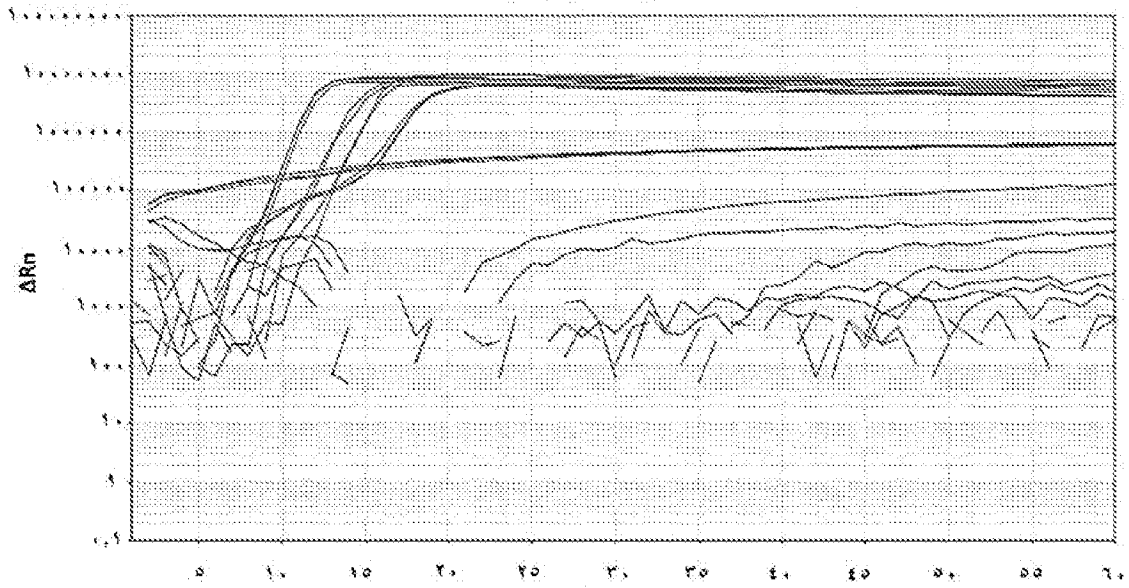
شكل ٩ ج
منحنى الإنصهار



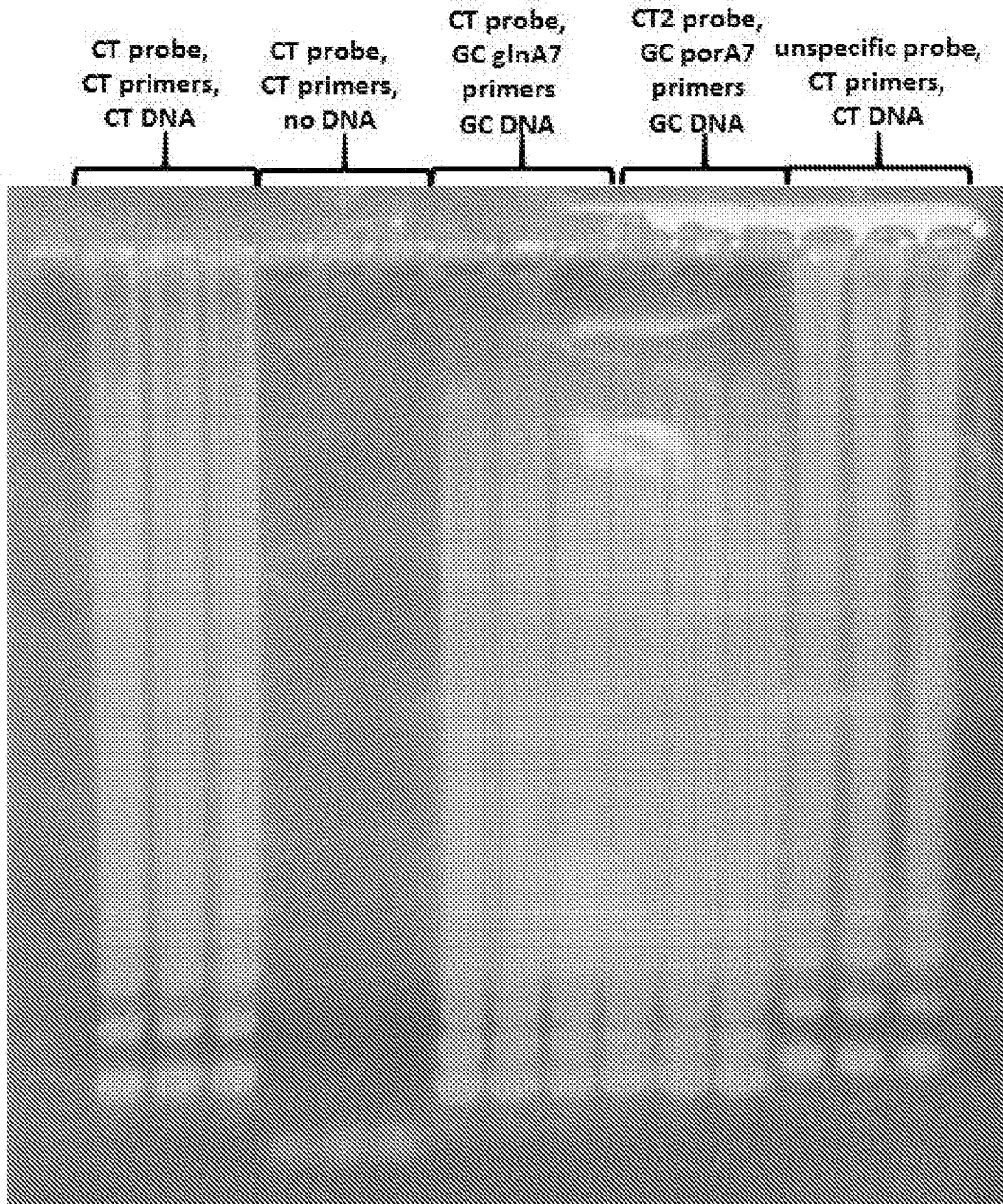
شكل ١٠
مخطط متعدد المكونات



شكل ١٠ ب
منحط متعدد المكونات

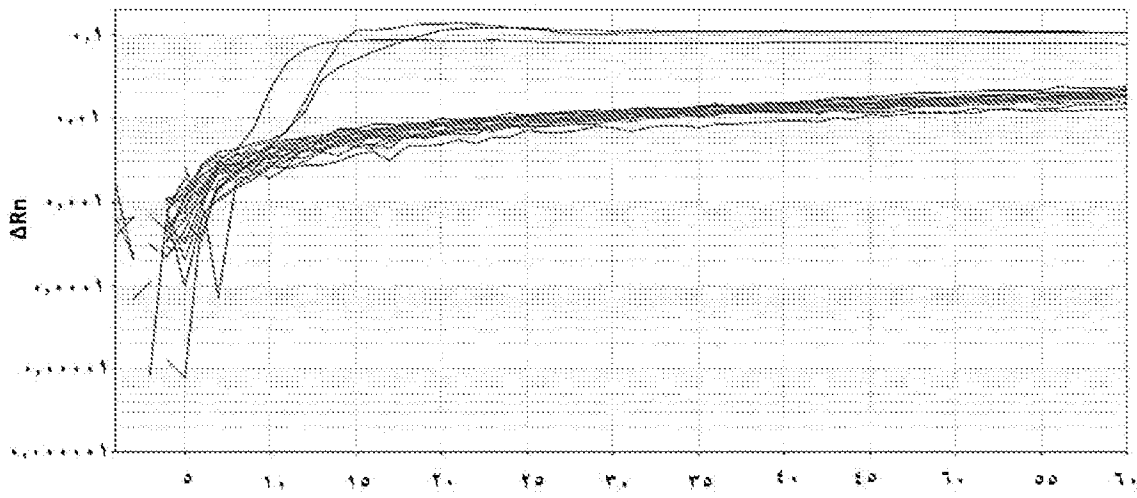


شکل ۱۰ ج



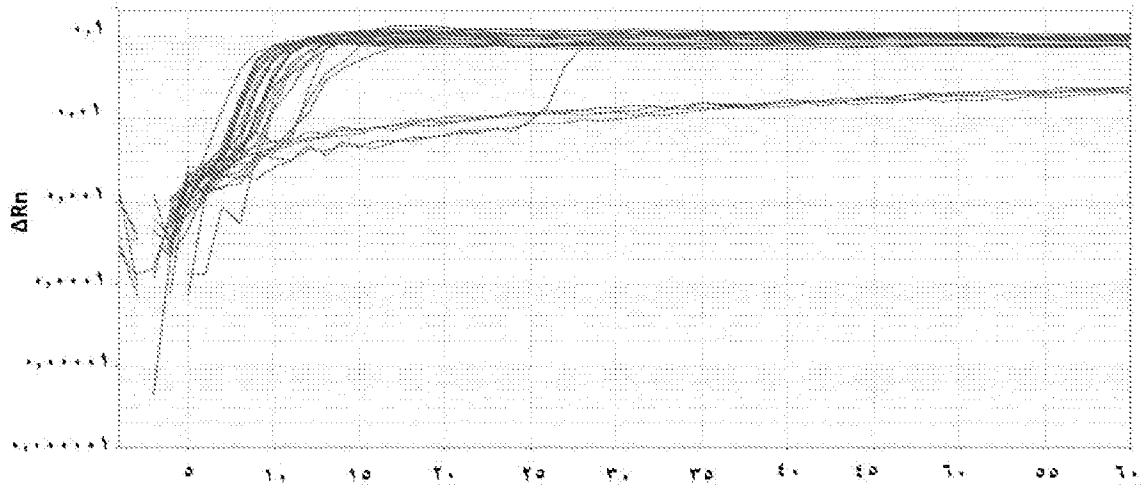
شكل ١١ أ

مخطط متعدد المكونات

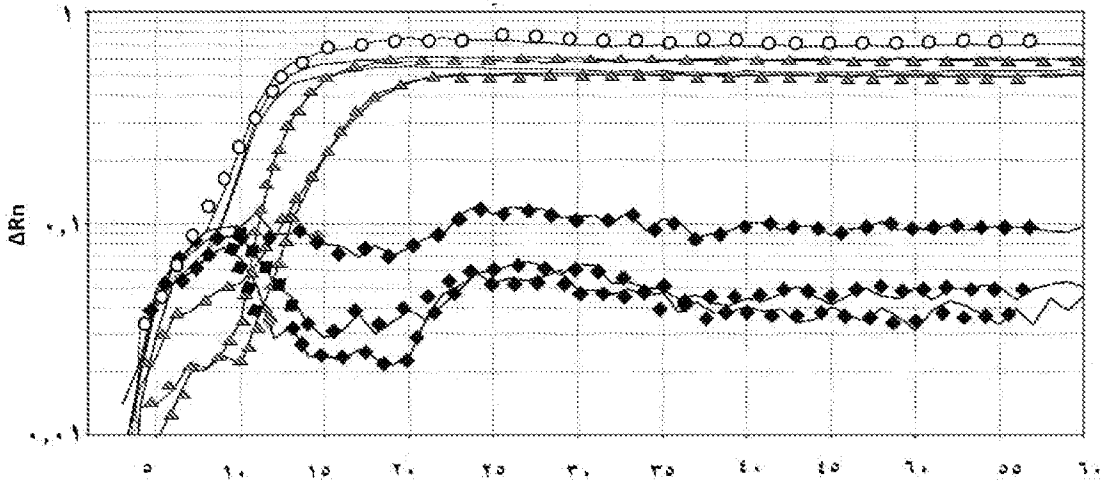


شكل ١١ب

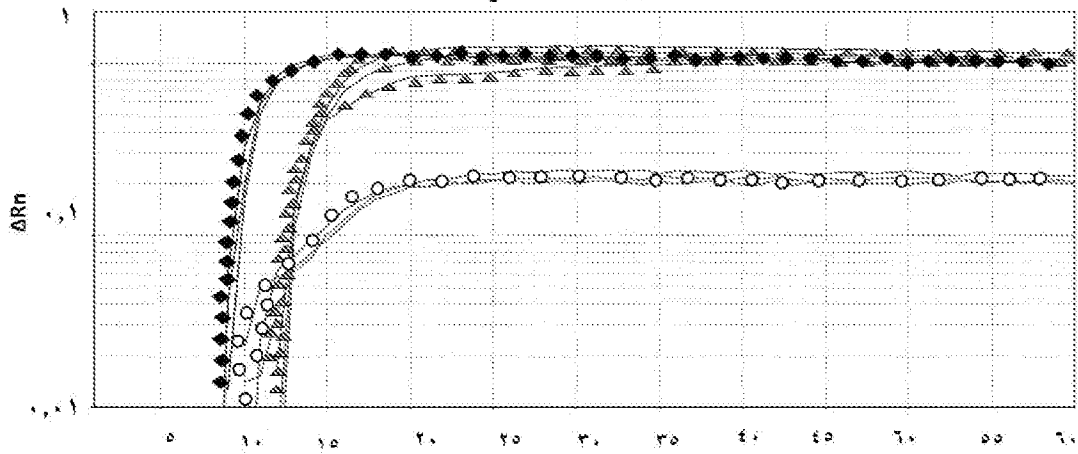
مخطط متعدد المكونات



شكل ١٢
مخطط متعدد المكونات



شكل ٢ ب
مخطط متعدد المكونات





مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشرط تسديد المقابل المالي السنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سقوطها 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