



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102985566 B

(45) 授权公告日 2015. 06. 17

(21) 申请号 201180032676. 3

(22) 申请日 2011. 06. 30

(30) 优先权数据

61/360, 296 2010. 06. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 12. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/042549 2011. 06. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/003289 EN 2012. 01. 05

(73) 专利权人 简·探针公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S. A. 朱 J. M. 多克特

(74) 专利代理机构 北京市嘉元知识产权代理事

务所(特殊普通合伙) 11484

代理人 张永新

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

(56) 对比文件

EP 0875584 A2, 1998. 11. 04, 说明书第 16-18 页实施例 6.

EP 1045036 A2, 2000. 10. 18, 摘要和说明书 第 11-12 栏第 42-46 段、第 9 栏第 36 段.

EP 0875584 A2, 1998. 11. 04, 说明书第 16-18 页实施例 6.

审查员 朱晓乐

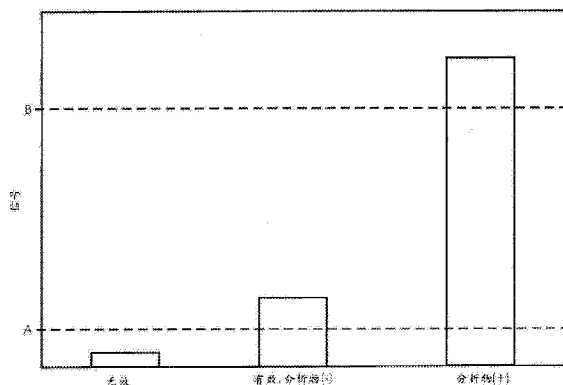
权利要求书3页 说明书25页 附图2页

(54) 发明名称

使用分析物和过程控制信号的单次读取确定而鉴定含分析物的样品的方法和设备

(57) 摘要

本发明公开了用于检测含内控的反应混合物中的分析物的设备和方法。使用核酸的扩增和检测阐述了本发明,其中扩增反应包含外源性内控。检测信号的幅度用作鉴定无效试验、鉴定分析物阴性的有效试验以及鉴定分析物阳性的试验的变量。对表明探针杂交的信号进行检测可用于在只使用单个可检测标记物的验证反应中指定分析物核酸的存在与否,并且不用区分由内控探针结合和分析物探针结合所贡献的信号的比例。



1. 一种采用过程控制确定包含内控的样品中第一分析物存在与否的方法,所述方法用于非诊断和非治疗目的且包括以下步骤:

(a) 制备待测试所述第一反应物的存在的反应混合物,所述反应混合物包含:

所述样品

接触所述内控后生成内控信号的内控探针,

如果第一分析物存在于所述样品中,则在接触所述第一分析物后生成第一分析物信号的第一分析物探针,以及

任选地如果第二分析物存在于所述样品中,则在接触第二分析物后生成第二分析物信号的第二分析物探针;

(b) 测量

(i) 所述内控探针和所述第一分析物探针所产生的组合信号而不用区分所述内控信号与所述第一分析物信号,并且

(ii) 任选地如果所述第二分析物存在于所述反应混合物中则测量所述第二分析物信号;以及

(c) 在没有独立测量贡献所述组合信号的内控信号和第一分析物信号任一的情况下确定以下哪一情形适用,

(i) 所述样品不含所述第一分析物,条件是所述组合信号的幅度小于第一分析物截止值并且

所述组合信号的幅度大于有效性截止值,或

所述第二分析物探针包含在所述反应混合物中,在步骤 (b) 中测量所述第二分析物信号,而在步骤 (b) 中测量的所述第二分析物信号的幅度大于第二分析物截止值,从而确立所述样品包含所述第二分析物;

(ii) 所述样品包含所述第一分析物,条件是所述组合信号的幅度大于所述第一分析物截止值,以及

(iii) 无法确定所述样品是否包含所述第一分析物,条件是所述组合信号的幅度小于所述有效性截止值,并且所述第二分析物探针包含在所述反应混合物中,在步骤 (b) 中测量所述第二分析物信号,而在步骤 (b) 中测量的所述第二分析物信号的幅度小于所述第二分析物截止值,

其中所述第一分析物截止值的信号量大于所述有效性截止值的信号量,

其中所述内控信号的可检测最大值不能超过所述第一分析物截止值,

其中所述内控探针和所述第一分析物探针各自用相同的可检测标记物进行可检测地标记,使得所述内控信号和所述第一分析物信号是由相同的可检测标记物发射的,

其中步骤 (a) 的反应混合物中内控和第一分析物每一项的存在与它们的缺失相比独立提高步骤 (b) 中测量的组合信号的幅度,并且

其中该方法不包括测量与组合信号分开的第一分析物信号或内控信号。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中步骤 (b) 包括在恒定温度下测量,并且其中通过计算机自动进行步骤 (c)。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在步骤 (a) 中制备的所述反应混合物包含所述第二分析物探针,其中步骤 (b) 包括在恒定温度下测量,并且其中通过计算机自动进行步骤

(c)。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中步骤 (b) 包括光学测量。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中步骤 (b) 包括通过选自光度计和荧光计的装置进行光学测量。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述装置为光度计。

7. 根据权利要求 4 所述的方法,其中所述第二分析物探针进行可检测地标记。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述内控探针和所述第一分析物探针各自用相同的化学发光标记物进行可检测地标记。

9. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述内控探针和所述第一分析物探针各自用相同的吡啶酯进行可检测地标记。

10. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在步骤 (a) 中制备的所述反应混合物不含所述第二分析物探针,其中步骤 (b) 包括在恒定温度下测量,并且其中通过计算机自动进行步骤 (c)。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中步骤 (b) 包括光学测量。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中步骤 (b) 包括通过选自光度计和荧光计的装置进行光学测量。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述装置为光度计。

14. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述内控探针和所述第一分析物探针各自用相同的化学发光标记物进行可检测地标记。

15. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述内控探针和所述第一分析物探针各自用相同的吡啶酯进行可检测地标记。

16. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在步骤 (a) 中制备的所述反应混合物包含所述第二分析物探针。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中在步骤 (b) 中测量所述第二分析物信号,其中在步骤 (b) 中测量的所述第二分析物信号的幅度小于第二分析物截止值,其中在步骤 (b) 中测量的所述组合信号的幅度大于有效性截止值,从而确定所述样品不含所述第二分析物。

18. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在步骤 (a) 中制备的所述反应混合物不含所述第二分析物探针。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中在步骤 (b) 中测量的所述组合信号的幅度小于所述第一分析物截止值但大于所述有效性截止值,并且其中在步骤 (c) 中确定所述样品不含所述第一分析物。

20. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述第一分析物、所述内控和所述第二分析物各自都包含核酸。

21. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在步骤 (a) 中制备的所述反应混合物包含所述第二分析物探针且其中所述第二分析物探针进行可检测地标记。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述内控探针和所述第一分析物探针各自用相同的化学发光标记物进行可检测地标记。

23. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述内控探针和所述第一分析物探针各自用相同的吡啶酯进行可检测地标记。

24. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中在步骤 (a) 中制备的所述反应混合物包含所述第二分析物探针且其中所述内控探针、所述第一分析物探针和所述第二分析物探针各自包含化学发光标记物。

25. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中步骤 (b) 包括光学测量。

26. 根据权利要求 25 所述的方法, 其中步骤 (b) 包括通过选自光度计和荧光计的装置进行光学测量。

27. 根据权利要求 26 所述的方法, 其中所述装置为光度计。

28. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中步骤 (c) 包括通过含有软件查表的计算机进行确定。

29. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中每个所述探针都包含核酸。

使用分析物和过程控制信号的单次读取确定而鉴定含分析物的样品的方法和设备

[0001] 相关申请案

[0002] 本申请要求于 2010 年 6 月 30 日提交的美国临时申请 No. 61/360, 296 的权益。此在先申请的全部公开内容据此以引用方式并入。

发明领域

[0003] 本发明涉及关于诊断测定法的生物技术子领域。更具体地讲,本发明涉及在包括内控的测定法中进行分析物检测,其中使用不同的探针检测分析物和内控。在一个高度优选的实施方案中,使用具有相同可检测标记物的不同杂交探针检测单一混合物中的核酸分析物。

[0004] 发明背景

[0005] 检测分析物(如核酸、蛋白质、脂质、碳水化合物等)的存在的现代测定法依赖于使用阳性对照来确认过程可靠性。例如,测定法可能力图使用核酸扩增和随后通过探针杂交和检测来测定靶核酸。经过扩增的样品可包含与分析物核酸共扩增的内控(下文称为“IC”)核酸。扩增产物可有利地具有可使用不同的杂交探针检测的非相同序列。检测 IC 扩增产物将确认测定程序的扩增和检测组成部分的完整性。该信息在未能检出分析物扩增产物时很有用。在这种情况下检出 IC 信号可验证分析物阴性结果。分析物扩增子及 IC 扩增子的特异性杂交探针通常通过它们所具有的标记物或通过空间分离而区分。

[0006] 包括内部过程控制的基于探针的测定法(包括蛋白和核酸测定法)对于 IC 和分析物的检测通常有以下区别之一:(1) 独立于分析物来检测 IC;以及(2) 独立于分析物加 IC 的组合来检测分析物。美国专利 No. 6, 586, 234 使用检测 IC 和分析物核酸的两次读取系统阐述了这两种可能性。当独立于 IC 加分析物的组合来检测分析物核酸时,可针对所产生的分析物杂交信号落在阳性评分所需的阈值截止值之下的样品而评估后者的杂交信号。例如,低于分析物检测的阈值截止值的信号作为另外一种选择可表明不存在分析物或测定法失效。如果在代表 IC 加分析物的组合的第二次读取中检出信号,则将该结果解释为验证分析物阴性结果。换句话说,检出 IC 加分析物的足够信号表明必须已经检出 IC,并因此可验证分析物阴性结果。应当显而易见的是,这样的系统要获得成功取决于从代表 IC 和分析物的杂交信号的组合中分离分析物杂交信号的能力。

[0007] 在分析物检测领域中遇到的一个难题涉及:当不同探针(例如,流体连通且在溶液中游离而非固定的不同探针)之间无空间分离而进行检测时,分析多重反应所需的不同标记物的数量。这可以在共扩增 IC 核酸和两种不同的靶核酸的测定法的背景下加以理解。通过具有一个标记物的 IC 探针,用于检测其余两个靶标的一套探针可用第二标记物进行标记。第二标记物的阳性检测信号表明存在两种分析物之一,但不能将一者与另一者进行区分。随着分析物数量的增加,解析反应性物质所需的再次测试的次数也相似地增加。换句话说,在阳性评分多重测定法中用于鉴定反应性物质的再次测试负担是不利的,尤其是当阳性样品所占的分数变得很大时。

[0008] 本发明解决了对简化的分析物鉴定系统的需求。

[0009] 发明概述

[0010] 在一个方面,本发明涉及通过过程控制确定包含内控的样品中第一分析物存在与否的设备。一般而言,本发明的设备包括:(a) 被构造成容纳样品的支架;(b) 被布置成当样品容纳在支架中时接收来自样品的光学信号的光学检测机构;以及(c) 与光学检测机构通信的处理器(如计算机),该处理器被编程为执行确定多种情形中的哪一种情形适用的步骤。根据本发明,除了内控外,样品进一步包含:在接触内控后生成内控信号的内控探针;如果第一分析物存在于样品中,则在接触第一分析物后生成第一分析物信号的第一分析物探针;以及任选地如果第二分析物存在于样品中,则在接触第二分析物后生成第二分析物信号的第二分析物探针。进一步根据本发明,光学检测机构被构造成测量内控探针和分析物探针所产生的组合信号而不用区分内控信号与分析物信号。光学检测机构任选地被构造成测量第二分析物探针所产生的第二分析物信号。再进一步根据本发明,处理器被编程为确定以下哪一种情形适用:(i) 样品不含第一分析物,条件是组合信号的幅度小于第一分析物截止值并且(1) 组合信号的幅度大于或等于有效性截止值或者(2) 第二分析物探针包含在样品中,光学检测机构被构造成测量第二分析物信号,且第二分析物信号的幅度大于或等于第二分析物截止值,从而确立样品包含第二分析物;(ii) 样品包含第一分析物,条件是组合信号的幅度大于或等于第一分析物截止值;以及(iii) 无法确定样品是否包含第一分析物,条件是组合信号的幅度小于第一分析物截止值且小于有效性截止值,并且如果第二分析物探针包含在反应混合物中,且光学检测机构被构造成测量第二分析物信号,第二分析物信号小于第二分析物截止值。一般来讲,第一分析物截止值的信号量大于有效性截止值的信号量,并且内控信号的可检测最大值不能超过第一分析物截止值。

[0011] 根据通过过程控制确定包含内控的样品中第一分析物存在与否的一般描述的设备的第一高度优选实施方案,光学检测机构被构造成测量通过第二分析物探针生成的第二分析物信号。这样的话,优选地,支架基本上不改变光学检测机构测量组合信号的运行过程中的温度;第一分析物、第二分析物和内控各自都包含核酸;且光学检测机构不测量第一分析物信号,也不测量内控信号。作为另外一种选择,优选地,光学检测机构不测量第一分析物信号,也不测量内控信号;并且设备进一步包括输出装置,其产生由处理器执行的确定步骤的有形记录(如,打印的记录或存储在计算机可读介质上的电子记录)。更优选地,支架基本上不改变光学检测机构测量组合信号的运行过程中的温度;第一分析物、第二分析物和内控各自都包含核酸;且光学检测机构不测量第一分析物信号,也不测量内控信号。这样的话,优选地,样品在光学检测机构测量组合信号的运行过程中保持基本上恒定的温度。这可(例如)涉及使用温控培养箱。作为另外一种选择,优选地,光学检测机构包括选自光度计和荧光计的检测器。更优选地,检测器为光度计。

[0012] 根据通过过程控制确定包含内控的样品中第一分析物存在与否的一般描述的第二高度优选实施方案,光学检测机构不被构造成测量通过第二分析物探针生成的第二分析物信号。这样的话,优选地,支架基本上不改变光学检测机构测量组合信号的运行过程中的温度;第一分析物和内控各自都包含核酸;且光学检测机构不测量第一分析物信号,也不测量内控信号。作为另外一种选择,光学检测机构不测量第一分析物信号,也不测量内控信号;并且设备进一步包括输出装置,其产生由处理器执行的确定步骤的有形记录。

更优选地, 支架基本上不改变光学检测机构测量组合信号的运行过程中的温度; 第一分析物和内控各自都包含核酸; 且光学检测机构不测量第一分析物信号, 也不测量内控信号。这样的话, 优选地, 样品在光学检测机构测量组合信号的运行过程中保持基本上恒定的温度。作为另外一种选择, 优选地, 光学检测机构包括选自光度计和荧光计的检测器。更优选地, 检测器为光度计。

[0013] 除了一般描述的设备的所述高度优选实施方案外, 还存在许多可用来改变本发明的设备的一般优选的修改。在一个一般优选的实施方案中, 样品容纳在反应容器中, 而支架被构造成容纳多个反应容器。更优选地, 反应容器选自试管和多孔板的孔。在另一个一般优选的实施方案中, 光学检测机构包括选自光度计和荧光计的检测器。更优选地, 检测器为光度计。在又一个一般优选的实施方案中, 处理器为包含软件查表的计算机(如独立计算机)。在再一个一般优选的实施方案中, 支架基本上不改变光学检测机构测量组合信号的运行过程中的温度; 第一分析物、第二分析物和内控各自都包含核酸; 且光学检测机构不测量第一分析物信号, 也不测量内控信号。在另一个一般优选的实施方案中, 样品在光学检测机构测量组合信号的运行过程中保持基本上恒定的温度。更优选地, 其中支架容纳在温控培养箱内。在另一个一般优选的实施方案中, 光学检测机构不测量第一分析物信号, 也不测量内控信号; 并且设备进一步包括输出装置, 其产生由处理器执行的确定步骤的有形记录。

[0014] 在另一个方面, 本发明涉及采用过程控制确定包含内控的样品中第一分析物存在与否的方法。一般而言, 该方法包括第一步骤 (a): 其用于制备待测试第一分析物存在的反应混合物。反应混合物包含: 样品; 在接触内控后生成内控信号的内控探针; 如果第一分析物存在于样品中, 则在接触第一分析物后生成第一分析物信号的第一分析物探针; 以及任选地如果第二分析物存在于样品中, 则在接触第二分析物后生成第二分析物信号的第二分析物探针。接下来为步骤 (b), 其用于测量: (i) 内控探针和分析物探针生成的组合信号, 而不用区分内控信号与分析物信号; 和 (ii) 任选地如果第二分析物探针包含在反应混合物中, 则第二分析物探针生成的第二分析物信号。再下来为步骤 (c), 其用于确定以下哪一种情形适用: (i) 样品不含第一分析物, 条件是组合信号的幅度小于第一分析物截止值, 并且 (1) 组合信号的幅度大于或等于有效性截止值, 或者 (2) 第二分析物探针包含在反应混合物中, 在步骤 (b) 中测量第二分析物信号, 且在步骤 (b) 中测量的第二分析物信号的幅度大于或等于第二分析物截止值, 从而确立样品包含第二分析物; (ii) 样品包含第一分析物, 条件是组合信号的幅度大于或等于第一分析物截止值; 以及 (iii) 无法确定样品是否包含第一分析物, 条件是组合信号的幅度小于有效性截止值, 并且如果第二分析物探针包含在反应混合物中, 则在步骤 (b) 中测量第二分析物信号, 且在步骤 (b) 中测量的第二分析物信号的幅度小于第二分析物截止值。一般来讲, 第一分析物截止值的信号量大于有效性截止值的信号量, 并且内控信号的可检测最大值不能超过第一分析物截止值。

[0015] 根据一般描述的方法的第一高度优选实施方案, 在步骤 (a) 中制备的反应混合物包含第二分析物探针; 步骤 (b) 包括在恒定温度下测量; 以及通过计算机自动进行步骤 (c)。更优选地, 步骤 (b) 包括光学测量。在一种情况下, 步骤 (b) 优选地包括用选自光度计和荧光计的装置进行光学测量。更优选地, 该装置为光度计。在另一种情况下, 内控探针、第一分析物探针和第二分析物探针各自进行可检测地标记。更优选地, 内控探针和第一分析物探针各自用相同的可检测标记物进行可检测地标记。例如, 内控探针和第一分析物探

针各自用相同的化学发光标记物进行可检测地标记。作为另外一种选择,内控探针和第一分析物探针各自用相同的吡啶酯进行可检测地标记。

[0016] 根据该一般描述的方法的第二高度优选实施方案,在步骤(a)中制备的反应混合物不含第二分析物探针;步骤(b)包括在恒定温度下测量;以及通过计算机自动进行步骤(c)。更优选地,步骤(b)包括光学测量。在一种情况下,步骤(b)优选地包括用选自光度计和荧光计的装置进行光学测量。更优选地,该装置为光度计。在另一种情况下,内控探针、第一分析物探针和第二分析物探针各自进行可检测地标记。更优选地,内控探针和第一分析物探针各自用相同的可检测标记物进行可检测地标记。例如,内控探针和第一分析物探针各自用相同的化学发光标记物进行可检测地标记。作为另外一种选择,内控探针和第一分析物探针各自用相同的吡啶酯进行可检测地标记。

[0017] 除了该一般描述的方法的前述高度优选实施方案外,还存在许多可用来改变本发明的方法的一般优选的修改。在一个一般优选的实施方案中,步骤(b)包括在恒定温度下测量,且通过计算机自动进行步骤(c)。在另一个一般优选的实施方案中,在步骤(a)中制备的反应混合物包含第二分析物探针。更优选地,在步骤(b)中测量第二分析物信号;在步骤(b)中测量的第二分析物信号的幅度小于第二分析物截止值;以及在步骤(b)中测量的组合信号的幅度大于或等于有效性截止值,从而确定样品不含第二分析物。在又一个一般优选的实施方案中,在步骤(a)中制备的反应混合物不含第二分析物探针。更优选地,在步骤(b)中测量的组合信号的幅度小于第一分析物截止值但大于或等于有效性截止值,并在步骤(c)中确定样品不含第一分析物。在再一个一般优选的实施方案中,第一分析物、内控和第二分析物各自都包含核酸。在另一个一般优选的实施方案中,内控探针、第一分析物探针和第二分析物探针各自进行可检测地标记。更优选地,内控探针和第一分析物探针各自用相同的可检测标记物进行可检测地标记。这样的话,优选地,内控探针和第一分析物探针各自用相同的化学发光标记物进行可检测地标记。作为另外一种选择,优选地,内控探针和第一分析物探针各自用相同的吡啶酯进行可检测地标记。在另一个一般优选的实施方案中,内控探针、第一分析物探针和第二分析物探针各自包含化学发光标记物。在另一个一般优选的实施方案中,步骤(b)包括光学测量。更优选地,步骤(b)包括用选自光度计和荧光计的装置进行光学测量。还更优选地,该装置为光度计。在另一个一般优选的实施方案中,步骤(c)涉及使用包含软件查表的计算机进行确定。在另一个一般优选的实施方案中,每个探针都包含核酸。

[0018] 发明详述

[0019] 简介和概述

[0020] 本发明提供鉴定含分析物样品的工具和方法,方式是使用单通道检测仪以单次读取而无需区分 IC 和分析物探针结合所贡献的信号来检测相同反应混合物中的 IC 信号和分析物信号。在高度优选的实施方案中,使用单个可检测标记物质来同时标记分析物探针(可用于检测分析物扩增子)和 IC 探针(可用于检测 IC 扩增子)。在另一个实施方案中,标记物可以不同,只要它们可在检测装置的单通道中被检出并且只要 IC 检测探针生成的最大信号落在分析物检测的阈值截止值之下即可。根据所述的方法,将代表分析物和 IC 检测的信号幅度用作变量,因而需要多个阈值来解释结果。以此方式,可能的是,无需空间分离或单独的标记物来检测 IC 扩增子和分析物扩增子,并能够验证分析物检测的阴性结果。当在

恒定的温度下评估探针杂交(如下所示)时尤其如此,从而将本发明所公开的技术与热熔融分析区别开来。实际上,所述技术不需要监测在多种温度条件下的探针杂交程度。

[0021] 附图简述

[0022] 图 1 是柱状图,示出了如何根据本发明所公开的技术将组合 IC 信号加分析物信号的幅度用于在 IC 验证测定法中确定分析物的存在与否。坐标图的纵轴代表组合信号幅度。纵轴上标出了用于解释实验结果的有效性(“A”)和分析物(“B”)截止值。落在有效性截止值之下的组合信号不能表明测定结果有效(即,可能表明反应失败或无效)。达到或超过有效性截止值但未达到或超过分析物截止值的组合信号表明不含分析物的有效反应。达到或超过分析物截止值的组合信号表明包含分析物并被自动视为有效的反应。

[0023] 图 2 是柱状图,显示了多重测定的结果,其中单独地或组合地检测两种分析物。空心柱表示使用 IC 和分析物-1 的特异性探针检测的组合信号的幅度。这些探针具有相同类型的 AE 标记物(即,闪光体),并且信号代表均相测定形式下的累积探针杂交信号。所有四个试验(即,阴性对照、仅分析物-1、仅分析物-2 以及分析物-1 与分析物-2)都给出了可检测的闪光体信号。填充柱表示使用分析物-2 的特异性探针检测的信号幅度,其中该探针具有与用于标记 IC 和分析物-1 的特异性探针的类型不同的类型的 AE(即,发光体)。只有包含分析物-2 核酸模板的试验才产生可检测的分析物-2 信号。

[0024] 定义

[0025] 以下术语在本说明书中具有指定的含义,除非明确地表明具有不同的含义。

[0026] 所谓“样品”或“测试样品”是指疑似含有目标生物体或生物分子(诸如衍生自目标生物体的核酸)的任何物质。该物质可以为(例如)未处理的临床标本、含有标本的缓冲介质、含有标本和裂解剂(用于释放属于目标生物体的核酸)的介质,或含有衍生自目标生物体的核酸(已在反应容器中或反应材料或装置上分离和/或纯化)的介质。在某些情况下,样品或测试样品可包含生物标本的产物,诸如待检测的扩增核酸。

[0027] 所谓“分析物”是指在分析程序中检测或测量的物质,诸如核酸或蛋白质。分析物可包含在进行测试的样品中。

[0028] 如本文所用,“标准样品”是包含已知量的分析物的样品。

[0029] 如本文所用,“多核苷酸”是指 RNA、DNA 或同时包含 RNA 和 DNA 的嵌合分子。

[0030] 所谓“分析物多核苷酸”或“分析物核酸”是指待检测或定量的所关注的多核苷酸。

[0031] 所谓“分析物多核苷酸标准品”是指已知量的分析物多核苷酸或其片段。例如,病毒分析物多核苷酸标准品可包含已知数量的以下拷贝:病毒基因组、病毒转录体或体外合成的代表病毒基因组一部分的转录体。

[0032] “核酸”是指包含核苷或核苷类似物的多聚化合物,这些核苷或核苷类似物具有含氮杂环碱基或碱基类似物,它们通过磷酸二酯键或其它键合连接形成多核苷酸。核酸包括 RNA、DNA 或嵌合 DNA-RNA 聚合物以及它们的类似物。核酸“主链”可由多种键合构成,包括糖-磷酸二酯键合、肽-核酸(PNA)键(PCT No. W095/32305)、硫代磷酸酯键合、甲基磷酸酯键合中的一种或多种,或它们的组合。核酸的糖部分可以是核糖或脱氧核糖,或具有已知取代的类似物化合物,诸如 2' 甲氧基取代和 2' 卤取代(如 2' -F)。含氮碱基可以是常规碱基(A、G、C、T、U);其类似物(如肌苷);嘌呤或嘧啶碱基的衍生物,诸如 N⁴-甲基脱氧鸟苷,去氮或氮杂嘌呤,去氮或氮杂嘧啶,在 5 或 6 位具有取代基团的嘧啶碱基,在 2、6 和

/ 或 8 位具有改变的或置换取代基的嘌呤碱基, 诸如 2- 氨基 -6- 甲氨基嘌呤、0⁶- 甲基鸟嘌呤、4- 硫代嘧啶、4- 氨基嘧啶、4- 二甲基胍嘧啶和 0⁴- 烷基嘧啶; 以及吡唑并化合物, 诸如未取代或 3- 取代的吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶(美国专利 No. 5, 378, 825、6, 949, 367 和 PCTNo. W093/13121)。核酸可包含“脱碱基”位置, 其中主链的一个或多个残基不含含氮碱基(参见美国专利 No. 5, 585, 481)。核酸也包括“锁核酸”(LNA), 它是一种含一个或多个 LNA 核苷酸单体与一个以 RNA 模拟糖构象锁定的双环呋喃糖单元的类似物(Vester 等, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41)。核酸可只含在 RNA 和 DNA 中发现的常规糖、碱基和键合, 或者可包含常规组分和取代(例如, 通过 2' 甲氧基主链连接的常规碱基, 或包含常规碱基与一种或多种碱基类似物的混合物的核酸)。体外合成核酸的方法在本领域中是熟知的。

[0033] 所谓“寡核苷酸”或“寡聚物”是指由连在一起的两个或更多个核苷亚单元或核碱基亚单元构成的聚合物。寡核苷酸的长度范围优选地为 10-100 个核苷酸, 更优选地为 10-80 个核苷酸, 还更优选地为 15-60 个核苷酸。寡核苷酸可以是 DNA 和 / 或 RNA 以及它们的类似物。核苷亚单元的糖基可以是核糖、脱氧核糖以及它们的类似物, 包括(例如)具有对呋喃核糖部分的 2' -O- 甲基取代的核糖核苷。包含具有 2' 取代的核苷亚单元并可用作检测探针的寡核苷酸、捕获寡核苷酸和 / 或扩增寡核苷酸由 Becker 等在美国专利 No. 6, 130, 038 中公开。核苷亚单元可通过以下方式接合: 键合, 诸如磷酸二酯键合、修饰键合; 或不会防止寡核苷酸与其互补靶核酸序列杂交的非核苷酸部分。修饰键合包括其中标准磷酸二酯键合被不同键合取代的那些键合, 诸如硫代磷酸酯键合或甲基膦酸酯键合。核碱基亚单元可(例如)通过将 DNA 的天然磷酸脱氧核糖主链用伪肽主链(诸如通过羧甲基连接基将核碱基亚单元连接到中央仲胺的 2- 氨基乙基甘氨酸主链) 替换而接合。(具有伪肽主链的 DNA 类似物通常称为“肽核酸”或“PNA”, 并由 Nielsen 等在美国专利 No. 5, 539, 082 “Peptide Nucleic Acids”中公开。) 本发明设想的寡核苷酸或寡聚物的其它非限制性实例包括含双环和三环核苷的核酸类似物以及称为“锁核酸”、“锁核苷类似物”或“LNA”的核苷酸类似物。(锁核酸在以下专利中被公开: Wang 的美国专利 No. 6, 083, 482 “Conformationally Locked Nucleosides and Oligonucleotides”; Imanishi 等的美国专利 No. 6, 268, 490 “Bicyclonucleoside and Oligonucleotide Analogues”; 以及 Wengel 等的美国专利 No. 6, 670, 461 “Oligonucleotide Analogues”。) 本发明设想了任何核酸类似物, 前提是修饰的寡核苷酸可在严格杂交条件下或扩增反应条件下杂交到靶核酸。

[0034] 如本文所用, “扩增”是指获得靶核酸序列、其互补序列或其片段的多个拷贝的体外程序。例如, 体外扩增反应是一种酶催化反应, 其导致合成靶核酸序列、其互补序列或其片段的多个拷贝。可用于准备体外扩增反应的扩增方法的实例在下文中给出。优选的体外扩增反应以指数方式合成扩增子, 这意味着一个扩增子将作为产生新扩增子的模板。

[0035] 所谓“扩增子”或“扩增产物”是指在核酸扩增反应中生成的核酸分子。扩增子或扩增产物含有可以与靶核酸同义或反义的靶核酸序列。

[0036] 所谓“分析物扩增子”或“分析物扩增产物”是指在核酸扩增反应中使用分析物核酸作为模板而合成的扩增子。

[0037] 如本文所用, “探针”是指可用于检测靶标诸如靶生物分子的靶的分析物特异性试剂。探针的实例包括核酸杂交探针、抗体探针、细胞表面受体和受体特异性配体。

[0038] 所谓“杂交”是指两条完全或部分互补的核酸链在规定的杂交测定条件下合在一起形成具有双链区域的稳定结构的能力。该双链结构(有时称为“杂交体”)的两条组成链通过氢键合在一起。虽然这些氢键最常见的是在单条核酸链上在含腺嘌呤与胸腺嘧啶或尿嘧啶(A与T或U)或者胞嘧啶与鸟嘌呤(C与G)碱基的核苷酸之间形成,但是碱基配对也可在不属于这些“常规”配对成员的碱基之间形成。非常规的碱基配对在本领域中是熟知的。

[0039] 如本文所用,“杂交探针”是在促进杂交的条件下特异性杂交到核酸(优选扩增的核酸)中的靶序列以形成可检测杂交体的寡核苷酸。探针任选地可包含可检测的部分,其可连接到探针的末端或可处于内部。探针中与靶多核苷酸结合的那些核苷酸不必严格邻接,当可检测的部分处于探针序列内部时即可能如此。检测可以是直接的(即,由探针直接杂交到靶序列或扩增的核酸而产生)或间接的(即,由探针杂交到中间分子结构而产生,该中间分子结构将探针连到靶序列或扩增的核酸)。探针的“靶”一般是指扩增核酸序列内所含的序列,其可使用标准氢键结合(即,碱基配对)特异性杂交到探针寡核苷酸的至少一部分。探针可包含靶特异性序列和任选地不与待检测的靶序列互补的其它序列。

[0040] 如本文所用,“可检测标记物”或简称为“标记物”是指可被检测或可导致可检测响应的化学部分。根据本发明的可检测标记物可直接或间接地连接到探针,诸如杂交探针。优选的可检测标记物的实例包括放射性同位素、酶、半抗原、诸如染料或赋予可检测颜色的粒子(如乳胶小珠或金属粒子)的发色团、发光化合物(如生物发光、磷光或化学发光部分)和荧光化合物。

[0041] 如本文所用,“均相可检测标记物”是指可以通过确定标记物是否位于结合到靶序列的探针上而以均相方式检测的标记物。也就是说,均相可检测标记物可无需从标记物或标记探针的非结合(如,未杂交)形式物理地除去结合(如,杂交)而进行检测。当使用标记探针进行检测核酸时,均相可检测标记物是优选的。均相标记物的实例在以下专利中有详细描述:Arnold等的美国专利 No. 5, 283, 174、Woodhead等的美国专利 No. 5, 656, 207和Nelson等的美国专利 No. 5, 658, 737。用于均相测定法的优选标记物包括化学发光化合物(例如参见Woodhead等的美国专利 No. 5, 656, 207、Nelson等的美国专利 No. 5, 658, 737和Arnold, Jr.等的美国专利 No. 5, 639, 604)。优选的化学发光标记物为吡啶酯(“AE”)化合物,诸如标准AE或其衍生物(如萘基-AE、邻位-AE、1-或3-甲基-AE、2,7-二甲基-AE、4,5-二甲基-AE、邻二溴-AE、邻二甲基-AE、间二甲基-AE、邻甲氧基-AE、邻甲氧基(桂皮酰)-AE、邻甲基-AE、邻氟-AE、1-或3-甲基邻氟-AE、1-或3-甲基间二氟-AE和2-甲基-AE)。

[0042] “均相测定”是指在确定特异性探针结合程度前不需要将结合的探针与未结合的探针物理分离的检测程序。示例性均相测定(诸如本文所述的那些)可采用分子炬、分子信标或具有茎环结构并在杂交到合适靶标时发出荧光信号的其它自我报告探针,除非存在于杂化双链中否则可通过化学方法选择性破坏的化学发光吡啶酯标记物,以及本领域的普通技术人员将会熟悉的其它均相可检测标记物。

[0043] 在本发明的背景下,将某些方法用于作出或输出诊断确定结果。例如,基于一组数据,将得出特定分析物存在于测试样品中的可能性极高的结论。方法的输出结果可表示为“确定”或“指定”或“建立”或“称作”特定分析物存在或可能不存在的步骤。

[0044] 如本文所用,“内控”是包含在反应混合物中用来检测分析物存在与否的试剂,其

中内控的直接或间接检测用于验证测定过程步骤。在使用扩增反应检测核酸分析物的测定法的背景下,内控可以是能与核酸分析物一起共扩增并在杂交反应中检测的核酸模板。检测适当水平的内控扩增产物可确认扩增和杂交过程步骤的成功。在一个实施方案中,内控核酸使用与扩增分析物核酸相同的引物进行扩增,但内控扩增子和分析物扩增子使用不同的杂交探针进行检测。优选的内控包括加到用于检测分析物存在与否的反应混合物中的外源性试剂。

[0045] 所谓“内控扩增子”或“IC 扩增子”或“IC 扩增产物”或其变化形式是指使用内控核酸作为模板在核酸扩增反应中合成的扩增子。

[0046] 如本文所用,“设备”是指执行某一目的或实现特定用途必需的事物。

[0047] 如本文所用,“支架”是将某物保持在适当位置的结构元件。例如,支架可容纳试管、多孔板、毛细管或其它反应容器。支架可包括用于保持所夹持的事物的机械夹具。优选地,可用于执行本发明的测定法的设备的支架将允许在所夹持的样品(诸如液相反应混合物)与光学检测机构之间具有光学通路。

[0048] 如本文所用,“光学检测机构”是指从进行测试的样品中采集光学信号所必需的组件的集合。可用的光学检测机构的优选实例包括荧光计和光度计。

[0049] 如本文所用,能量传感器装置(诸如配有光能传感器的装置)的“通道”是指可排除其它波段而检测或定量的限定波段。例如,光度计的一个检测通道能够将一定波长范围内的一种或多种化学发光标记物发出的光能作为单一事件而检测。在化学发光反应过程中发出的光可通过光度计用相对光单位(RLU)定量,计量单位表示在给定波长或波段下样品发出的光子的相对数量。因荧光而发出的光可作为给定波长下或某一波段内的相对荧光单位(RFU)而定量。

[0050] 如本文所用,“单通道检测”是指这样一种过程,借以可在能量传感器装置的一个通道所代表的限定波段内检出一个或多个信号。如果例如有两种可检测标记物,每种设置在不同的探针上,两者均发出彼此不同的特征性波长光,并且如果那些波长在对应于能量传感器装置的一个检测通道的限定波段内检出,则该检测将被称为“单通道检测”。通过单通道检测,当光子由不同的标记物产生,并具有落在单检测通道的检测范围内的波长时,产生被检测光子的标记物之间没有区别。

[0051] 如本文所用,“单次读取确定”是指在探针与分析物之间的结合反应后通过检测步骤获得结果的过程。通过单次读取确定,没有必要更改反应条件(诸如探针杂交条件),或者进行二次杂交反应。

[0052] 如本文所用,“内控信号”(有时称为“IC 信号”)是可测量的信号,它表明反应混合物中存在内控或其产物(例如扩增产物)。例如,如果内控带有标记,则 IC 信号可由内控直接产生。作为另外一种选择,内控信号可由与内控或其产物发生特异性相互作用的探针(如内控探针)产生。优选的内控包括蛋白质和核酸。

[0053] 如本文所用,“分析物信号”是可测量的信号,它表明反应混合物中存在分析物或其产物(例如扩增产物)。例如,如果分析物带有标记,则分析物信号可由分析物直接产生。作为另外一种选择,分析物信号可由与分析物发生特异性相互作用的探针(如分析物探针)产生。优选的分析物包括蛋白质和核酸。

[0054] 如本文所用,“组合信号值”是单个值,它表示对单个反应混合物中的分析物和 IC

所测得的可检测信号的组合。组合信号不区分内控信号与分析物信号。例如,组合信号值对于化学发光标记物可记录为 RLU (相对光单位)或对于荧光标记物可记录为 RFU (相对荧光信号)。

[0055] 在某些检测不止一种分析物的多重测定法中,不同的分析物可分别通过检测或测量“第一分析物信号”和“第二分析物信号”而检测。不同分析物的存在与否可通过将相应信号的幅度与相应截止值(如,“第一”和“第二”分析物截止值)进行比较而判定。

[0056] 如本文所用,“阈值”或“阈值截止值”或简称为“截止值”是指用于解释实验结果的定量限,其中高于和低于截止值的结果将导致相反的结论。例如,落在截止值之下的测得信号可表示不存在特定靶标,但是超过同一截止值的测得信号则可表示存在该靶标。按照惯例,对于达到截止值(即,刚好等于截止值)的结果,其解释与超过截止值的解释相同。

[0057] 如本文所用,“有效性截止值”是用于确定过程步骤是否有效(如,有效或无效)的截止值。例如,达到或超过有效性截止值的内控信号可表示过程按预期进行,而包括该过程的测定法的结果是有效的。反之,落在有效性截止值之下的内控信号可表示过程未按预期进行,而相应测定法的结果是无效的。

[0058] 如本文所用,“分析物截止值”是用于表示分析物在反应混合物或测试样品中存在与否的截止值。例如,达到或超过分析物截止值的分析物信号可表示分析物存在于反应混合物或测试样品中。反之,落在分析物截止值之下的分析物信号如果经过过程控制验证,则将表示不存在分析物。

[0059] 如本文所用,“查表”是指相对于(如, $<$ 或 \geq) 阈值截止值而表示的阳性和阴性结果的可能组合的集合。集合中的组合可与为进行测试的样品中的分析物存在性指定阳性或阴性状态的解释相关联。也可指定测定有效性状态。查表可存储在计算机可读介质上,并通常用于解码实验结果。

[0060] 所谓“套装”是指通常旨在彼此相互结合使用的材料的包装组合。根据本发明的套装可包含“有形”形式的说明或其它信息(如,印刷信息、以电子方式记录在计算机可读介质上或以其它方式记录在机器可读介质诸如用于存储数值的条形码上的信息)。

[0061] 本发明的优选实施方案

[0062] 本文所述的分析技术在某些方面与许多其它人所用的先前方法相反。例如,不同于上面提到的美国专利 No. 6, 586, 234, 其描述了使用将 (a) 分析物信号从 (b) 分析物信号与 IC 信号的组合中区分开来的两次读取方法进行 IC 验证,而本发明的方法完全不用分离这些信号。更具体地讲,本发明的方法采用单次读取法,其不需要归属由 IC 和分析物探针产生的信号的来源或幅度,即便使用检测装置的单检测通道进行多个信号检测时也是如此,这种情况可以通过在两个探针上使用相同的标记物而产生。实际上,本发明的技术使用单通道检测法,来同时检测单一反应混合物中由 IC 探针和分析物探针两者产生的信号。本发明的技术不在单独的检测反应中分离 IC 和分析物探针,而是将两种探针相结合,并同时检测由它们产生的信号。再次提到,IC 和分析物探针可有利地具有相同的可检测标记物或使用检测装置的单通道检测的不同标记物。他人可能使用单个截止值检测来自使用相同标记物检测的多个靶标的信号,但本发明的技术需要使用单独的截止值(如,所谓的有效性截止值和分析物截止值)。使用多个单独的截止值能避免单独读取以区分不同探针产生的信号。根据本发明的技术,存在多个阈值截止值,并要求由 IC 探针的检测所产生的信号的幅

度不能超过用于指示分析物的存在的截止值。换句话说,最大可检测 IC 信号不能超过用于指示分析物的存在的截止值。总而言之,这些差别将本发明的技术与先前方法区分开来。

[0063] 一般而言,本文所公开的技术可应用于检测多种分析物,包括:核酸(如 DNA 和 RNA)、蛋白质(如抗体、激素或其它配体的受体等)以及具有生物学意义的其它分子。通过本发明所公开的方法鉴定的特别优选的分析物为使用互补杂交探针检测的核酸。IC 优选地为外源性合成核酸,其在与分析物核酸共扩增前包含在测试分析物核酸的存在的反应混合物中。将具有不同碱基序列的单独的杂交探针用于检测分析物和 IC 扩增子。检测步骤在恒定温度下进行。在一个高度优选的实施方案中,将具有不同靶核酸(即, IC 和分析物)特异性的不同探针用相同的化学可检测标记物质进行标记。然而,如果将不同的可检测标记物用于标记不同的探针,则由不同标记物产生的信号必须可使用检测装置的单通道检测。优选地,两种可检测标记物产生使用检测装置的单通道检测的光学信号,其中该通道由预定的波长范围限定。

[0064] 阈值

[0065] 本发明的一个方面涉及定义和使用可检测信号的多个阈值截止值,所述可检测信号用在通过 IC 验证的测定法中鉴定分析物的存在与否。优选地,当使用具有相同化学可检测标记物质的不同探针来检测 IC 和分析物时,对于在检测分析物信号和 IC 信号的检测仪器的单通道中检出的信号存在两个阈值截止值。这两个阈值截止值中的低值(即,“有效性截止值”)用于验证 IC 过程控制。这两个阈值截止值中的高值用于表示分析物在进行测试的样品中存在与否。未能达到或超过有效性截止值的信号表示因测定过程失败而导致反应无效。这样的情形可因测定法的扩增步骤和/或检测步骤受到抑制而引起。超过有效性截止值但未达到或超过分析物检测的阈值截止值的信号表示测定法的扩增和检测步骤成功,并进一步表示分析物不存在于样品中。该后一结果可通过本文所公开的方法评定为“有效,分析物阴性”。最后,检出既超过有效性截止值也超过分析物阈值截止值的信号则表示分析物存在于样品中(即,“分析物阳性”样品)。这样的话,无需报告或质疑测定结果的有效性。本发明的这些特征在图 1 中示出。

[0066] 本文所公开的技术的成功取决于以下两者间的某些一般关系:代表 IC 和分析物检出的信号的容许幅度,以及多个阈值截止值。重要的是,当使用具有可检测标记物(它们产生的信号可在检测装置的单通道内检出)的不同探针来检测分析物和 IC 时,有效性截止值必须不同于且低于分析物检测的阈值截止值。在高度优选的实施方案中,所述可检测标记物是相同的可检测标记物(如,相同的化学荧光标记物质或化学发光标记物,诸如 AE 标记物)。实际上,通过 IC 扩增和检测而产生的超过有效性截止值的信号不应含糊不清地表明使用具有相同化学可检测标记物质的探针检测的分析物的存在性。这可通过例如以下方式得以保证:要求仅由检测 IC 扩增子(即,无分析物存在于反应中)而产生的信号的幅度具有无法超过的上限阈值。在特别优选的方法中,这通过以下方式实现:确保对本发明所公开的测定法的 IC 扩增和检测组成部分进行校准,使得 IC 信号无法超过不含分析物的扩增反应中的上限阈值截止值。这可防止因仅扩增和检测 IC 而表明存在分析物的假阳性结果。用于检测分析物的阈值截止值始终大于有效性截止值。检出达到或超过分析物检测的阈值截止值的信号将自动验证分析物阳性测定结果。

[0067] 当使用单一化学可检测标记物质或可使用检测装置的单通道进行检测的不同可

检测标记物来检测 IC 和分析物时,许多不同的方法可用于确保由 IC 检测(如,IC 扩增子检测)产生的最大信号低于用于检测分析物的阈值截止值。例如,可使 IC 扩增子的比活性(如,可通过每单位质量探针的可检测标记单位数来度量)相对于用于检测分析物扩增子的探针的比活性降低。用于杂交反应的 IC 特异性探针的量或浓度可相对于分析物特异性探针的量或浓度降低。设置在 IC 特异性探针上的标记物可选择为其检测有效性相对设置在分析物特异性探针上的标记物的有效性低。在高度优选的实施方案中,将用于检测 IC 扩增子和分析物扩增子的不同探针用相同的化学可检测标记物质(如,化学发光标记物,诸如特定结构的吡啶酯标记物;或者作为另外一种选择,特定结构的荧光标记物)标记,并且用于检测 IC 扩增子的 IC 特异性探针的量小于用于检测分析物扩增子的分析物特异性探针的量。当然,用于共扩增反应的 IC 模板核酸的输入量也可进行调整,使得通过检测 IC 扩增子产生的杂交信号的幅度低于分析物截止值。例如,可将 IC 核酸的输入量选择为不大于分析物检测下限的十倍,更优选地不大于分析物检测下限的三倍,更优选地不大于分析物检测下限的两倍,还更优选地不大于分析物检测下限。例如,用于扩增反应的 IC 模板核酸的量优选地落在以下范围内:从测定法中分析物检测下限的二分之一到十倍,更优选地从测定法中分析物检测下限的十分之一到一倍。任何这些低输入水平的 IC 模板与任何上述控制量的探针的组合也已得到了成功应用,并落在本发明的范围内。

[0068] 当 IC 和分析物靶标使用单一化学物质作为可检测标记物(如,同一化学发光标记物、同一荧光标记物等)或可使用检测装置的单通道检测的不同化学可检测标记物质进行检测时,阈值截止值的前述讨论与 IC 和分析物的分析相关。通过此方法获得的结果分析在表 1 中示出。使用与用于检测 IC 和第一分析物不同的可检测标记物来检测第二分析物能够实现,并可涉及使用不同的阈值截止值。实际上,用于评估第二分析物存在与否的阈值截止值可独立于用于评估第一分析物和 IC 的结果的阈值截止值。通过该后一方法获得的结果的分析在表 2 中示出。

[0069] 信号幅度和阈值截止值之间的某些关系

[0070] 如本文其它地方所述,在代表内控和一种或多种分析物检出的信号幅度与各种相应的阈值截止值之间存在许多有意义的关系。例如,在包括内控和第一分析物的任选地包括第二分析物的测定法以及执行该测定法的设备的背景下,可将测得的组合信号(如,通过内控探针和第一分析物探针产生)的幅度与有效性截止值以及与第一分析物截止值进行比较。如果该测定法包括测量第二分析物信号(如,通过第二分析物探针产生,并区别于组合信号),则可将该第二分析物信号与第二分析物截止值进行比较。如果组合信号的幅度大于或等于有效性截止值,则通过过程控制确立测定结果有效。如果组合信号的幅度大于或等于第一分析物截止值,则确立检出第一分析物。如果组合信号的幅度小于有效性截止值,则通过过程控制不能确立测定结果有效。如果反应混合物包含第二分析物探针,并且如果第二分析物信号的幅度大于或等于第二分析物截止值,则通过过程控制确立测定结果有效,并确立检出第二分析物。如果反应混合物包含第二分析物探针,并且如果第二分析物信号的幅度小于第二分析物截止值,则不能确立检出第二分析物,并且通过过程控制不能确立测定结果有效。因此,当检出第二分析物信号时,该信号也可用于验证测定结果,包括检测第一分析物的阴性结果。这些确定过程的每一个都可以通过根据本发明的设备的处理器或计算机元件而确立。

[0071] 阈值确立的实例

[0072] 阈值截止值(即,有效性截止值和分析物截止值)与代表 IC 加分析物检测的组合信号的测得测试信号之间的比较可通过可供选择的方法执行。在一个优选的实施方案中,将预定的阈值截止值用于评估测试结果并确定分析物是否存在。在不同的优选实施方案中,使用在待用于测试的各种不同机器上运行的校准品确立阈值截止值。

[0073] 确立具体机器和 / 或试剂组特定的阈值截止值可以按不同的方式进行,但通常将采用一个或多个校准标准品(即,一个或多个含有已知量的待扩增和检测的相关核酸的标准品)。各校准反应均包括内控。对于将视为有效的测定法,“阴性”校准品可用于确立必须由代表 IC 和分析物检出的信号超过的有效性截止值。阴性校准品反应优选地包括可以扩增并检测的 IC 模板核酸,但不包括任何分析物核酸。确立有效性截止值的一种方法是计算在阴性校准品运行(即,扩增和检测程序)中测得的信号的值的二分之一(即 50%),或更优选地在多个阴性校准品扩增和检测反应中测得的信号的平均值的二分之一。产生的组合信号值低于该有效性截止值的任何测试反应在不存在第二分析物测得的验证结果的情况下将被视为无效(即,表示过程失败)。阴性校准品结果除了二分之一以外的分数(如 60%、70% 等)作为另外一种选择可被选为具有良好结果的有效性截止值。产生的信号值高于有效性截止值的任何测试反应将被视为有效。

[0074] 对于要视为分析物阳性的结果(即,“分析物阳性”)而言必须超过的最简单形式的上限阈值(即,“分析物截止值”)也可通过使用阴性校准品反应获得的结果加以确定。分析物截止值优选地将为阴性校准品试验测得的信号值(或阴性校准品运行的平均值)的至少一点五倍。更优选地,分析物截止值将为阴性校准品试验测得的信号值的至少两倍。还更优选地,分析物截止值使用得自阴性校准品试验以及得自阳性校准品试验的结果加以确定。例如,分析物截止值可通过以下方式确定:将多个阴性校准品的值加上产生代表 IC 和分析物检出的信号的阳性校准品的测得值的一定百分比(如,10%、20%、30%,或在 10%-30% 的范围内),其中两个靶标都使用单通道检测进行检测。这将在下文的实施例中示出。

[0075] 核酸检测

[0076] 在优选的实施方案中,当检测杂交信号时,核酸扩增子在溶液中用不固定到固体载体上的液相杂交探针进行检测。这明显不同于阵列检测形式,诸如核酸微阵列,其中探针杂交结果的解释依赖于一个探针与另一个的空间分离。同样,本发明的方法可使用以下 IC 探针和分析物探针(例如,它们的每一个都为核酸杂交探针)加以实践,这些探针具有相同的化学可检测标记物质,或者足够相似以允许使用检测装置中的单检测通道进行检测的标记物。要注意的是,优选的程序不涉及检测只代表分析物存在的信号,也不检测代表 IC 存在的信号。同样地,优选的程序不涉及检测只代表 IC 存在的信号,而在分析物也可检测时将分析物排除在外不进行检测。例如,在某些实施方案中,检测表示 IC 和分析物均存在的累积信号,这意味着不单独检测 IC 信号和分析物信号。以此方式,本发明的方法不同于其中要单独检测分析物信号和 IC 信号的某些其它测定形式。

[0077] 查表

[0078] 本文所述的方法可便利地采用查表来解释结果并确定样品中分析物存在与否,以及验证测定完整性。表 1 表示可用于根据本发明所公开的使用分析物和 IC 信号的单通道检测来检测分析物和 IC 的方法进行结果解释的基本查表,这些信号可通过用单一类型的可

检测标记物(即,每种探针上的标记物相同)标记的不同探针(即,IC和分析物的单独探针)提供。参照阈值截止值的排列,检出的信号低于分析物的阈值截止值也低于有效性截止值时表明测试无效。反之,检出的信号低于分析物的截止值但高于有效性截止值则表明测试有效且分析物阴性。最后,信号高于分析物截止值则表明测试为分析物阳性。因此,使用少至两种的具有相同化学可检测标记物质的探针可了解分析过程的有效性以及了解分析物的存在与否。

[0079] 表 1

[0080] 对使用单标记物质检测 IC 和分析物获得的结果进行的分析

信号评价		分析物结果
与分析物检测截止值相比的信号幅度	与有效性截止值相比的信号幅度	
\geq 分析物截止值	$>$ 有效性截止值,因为分析物截止值高于有效性截止值	阳性
$<$ 分析物截止值	\geq 有效性截止值	阴性
	$<$ 有效性截止值	无效测定

[0082] 多重优势和查表

[0083] 使用信号幅度(如杂交信号幅度)用作变量来辨别无效反应、表明分析物阴性样品的有效反应以及表明分析物阳性样品的反应的另一优势涉及仅用少量的可检测标记物即能检测多种分析物。例如,当使第一分析物(分析物-1)和 IC 核酸模板共扩增并用不同探针进行检测,而每种探针具有可使用检测装置的第一检测通道检测的标记物(如,第一可检测标记物彼此相同)时,可使用具有不同可检测标记物的探针检测不相关的靶标(分析物-2),其中该不同的标记物可区别于用在分析物-1和 IC 探针上的标记物(如,通过动力学拆分,或通过使用检测装置的第二检测通道检测等等进行区别)。这样的话,检出分析物-2的阳性结果也可用于验证测定结果。同样,分析物-2可在检出的信号达到或超过第二分析物阈值时得到阳性检测,该第二分析物阈值可以与为确立样品中存在分析物-1而必须达到或超过的阈值截止值相同或不同。因此,检出的信号超过为检测分析物-2的阈值截止值时可验证测定结果(即,表明测定法的组成部分按预期运行)。根据该方法,即使不存在表明分析物-1和 IC 探针杂交的可检测信号时,达到或超过为检测分析物-2的阈值截止值的分析物-2信号也可表明进行测试的样品包含分析物-2但不含分析物-1,以及表明测定结果是有效的(即,有效,分析物-1阴性;分析物-2阳性)。对于包括用共同可检测标记物(即,两种探针上的标记物可使用检测装置的相同检测通道进行检测)标记的分析物-1和 IC 探针与用区别于第一标记物的第二可检测标记物标记的分析物-2探针的简单多重测定,对其结果的逻辑分析在下面以查表的形式给出(参见表 2)。

[0084] 表 2

[0085] 对使用两种标记物质检测 IC 和两种分析物获得的结果进行的分析

[0086]	与分析物-2检	信号1评价	分析物-1结	分析物-2结
--------	---------	-------	--------	--------

测截止值相比的信号2幅度	与分析物-1检测截止值相比的信号1幅度	与有效性截止值相比的信号1幅度	果	果
[0087] \geq 分析物-2截止值	$<$ 分析物-1截止值	无论信号1是 $>$ 还是 $<$ 均有效, 因为高值信号2可验证过程控制	阴性	阳性
	\geq 分析物-1截止值	有效, 因为分析物-1截止值高于有效性截止值	阳性	阳性
$<$ 分析物-2截止值	\geq 分析物-1截止值		阳性	阴性
	$<$ 分析物-1截止值	\geq 有效性截止值 $<$ 有效性截止值	阴性 无效	阴性

[0088] 可用的探针标记系统和可检测部分

[0089] 基本上任何可用于监测探针与分析物之间的特异性结合的标记与检测系统均可结合本发明使用。其中可用的标记物有放射性标记、酶、半抗原、连接的寡核苷酸、化学发光分子、荧光部分(单独地或与“猝灭剂”部分相结合)以及适于电子检测方法的氧化还原活性部分。优选的化学发光分子包括以下类型的吡啶酯:与均相保护测定法结合使用的 Arnold 等在美国专利 No. 5, 283, 174 中所公开的类型, 以及与在单次反应中定量多个靶标的测定法结合使用的 Woodhead 等在美国专利 No. 5, 656, 207 中所公开的类型。这些专利文献中所含的公开内容据此以引用方式并入。优选的电子标记和检测方法在美国专利 No. 5, 591, 578 和 5, 770, 369 以及已公布的国际专利申请 W098/57158 中有所公开, 它们的公开内容据此以引用方式并入。可在本发明中用作标记物的氧化还原活性部分包括过渡金属, 诸如 Cd、Mg、Cu、Co、Pd、Zn、Fe 和 Ru。

[0090] 根据本发明的特别优选的探针的可检测标记物可在均相测定系统中检测(即, 其中, 在混合物中, 结合的标记探针与未结合的标记探针相比表现出可检测的变化, 诸如稳定性或差异降解)。虽然其它均相可检测标记物, 诸如荧光标记物和电子可检测标记物也旨在用于实践本发明, 但是用于均相测定的优选标记物为化学发光化合物(例如, 如 Woodhead 等在美国专利 No. 5, 656, 207 中所述; Nelson 等在美国专利 No. 5, 658, 737 中所述; 或 Arnold 等在美国专利 No. 5, 639, 604 中所述)。特别优选的化学发光标记物包括吡啶酯(“AE”)化合物, 诸如标准 AE 或其衍生物, 如萘基-AE、邻位-AE、1-或 3-甲基-AE、2, 7-二甲基-AE、4, 5-二甲基-AE、邻二溴-AE、邻二甲基-AE、间二甲基-AE、邻甲氧基-AE、邻甲氧基(桂皮酰)-AE、邻甲基-AE、邻氟-AE、1-或 3-甲基邻氟-AE、1-或 3-甲基间二氟-AE 和 2-甲基-AE。

[0091] 在一些应用中, 表现出至少一定程度自身互补性的探针是可取的, 以有利于不需要在检测前首先移除未杂交的探针即可检测测试样品中的探针: 靶标双链体。以举例的方式, 对称为“分子炬”的结构进行设计, 以包含不同的自身互补区(命名为“靶结合域”和“靶封闭域”), 它们通过接合区域连接并在预定的杂交测定条件下彼此杂交。当暴露于变性条件下时, 分子炬熔体的两个互补区(其可以完全互补或部分互补)留下靶结合域可供在恢复预定杂交测定条件时杂交到靶序列。分子炬的设计使得靶结合域相比于靶封闭域有利于杂

交到靶序列。分子炬的靶结合域和靶封闭域包含相互作用的标记物(如,荧光剂/猝灭剂),它们的定位使得当分子炬自我杂交时与分子炬杂交到靶核酸时产生不同的信号,从而允许在存在具有相关可用标记物的未杂交探针时检测测试样品中的探针:靶标双链体。分子炬在美国专利 No. 6, 361, 945 中有全面描述,其公开内容据此以引用方式并入。

[0092] 可结合本发明使用的自我互补杂交测定探针的另一个实例是通常称为“分子信标”的结构。分子信标包括具有以下部分的核酸分子:靶互补序列,在不存在靶核酸序列时将探针维持在封闭构象的亲和对(或核酸臂),以及当探针处于封闭构象时相互作用的标记物对。靶核酸和靶互补序列的杂交将亲和对的成员分离,从而使探针转向开放构象。转向开放构象可因标记物对的相互作用减弱而检测到,而标记物对可为例如荧光团和猝灭剂(如 DABCYL 和 EDANS)。分子信标在美国专利 No. 5, 925, 517 中有全面描述,其公开内容据此以引用方式并入。

[0093] 分子信标优选地用相互作用的可检测标记物对进行标记。优选作为相互作用性标记物对的成员的可检测标记物的实例通过 FRET 或非 FRET 能量转移机理彼此相互作用。荧光共振能量转移(FRET)涉及能量量子通过发色团之间的共振相互作用从吸收位点到其在分子或分子系统中的利用位点之间的无辐射传输,传输距离明显大于原子间距离,而不转化成热能,供体和受体也不发生动力学碰撞。“供体”是最初吸收能量的部分,而“受体”是能量随后转移到的部分。除了 FRET 之外,还存在至少三种其它的“非 FRET”能量转移过程,借助这些过程激发能量可从供体转移到受体分子。

[0094] 当使两个标记物的距离足够近以使得一个标记物发出的能量可被第二标记物接收或吸收时,无论是通过 FRET 还是非 FRET 机理,都称两种标记物的彼此间关系为“能量转移关系”。例如,当通过形成茎双链体将分子信标维持在封闭状态,并且连到探针一条臂上的荧光团的荧光发射被相对臂上的猝灭剂部分猝灭时,情况即是如此。

[0095] 本发明的分子信标的高度优选的标记物部分包括荧光团和具有荧光猝灭性质的第二部分(即,“猝灭剂”)。在该实施方案中,该特征性信号可能是特定波长的荧光,但作为另外一种选择可以是可见光信号。当涉及荧光时,发射变化优选地因 FRET 或因辐射能量转移或非 FRET 模式而发生。当具有一对封闭状态下的相互作用标记物的分子信标通过合适频率的光线刺激时,以第一水平生成荧光信号,该水平可能非常低。当该相同的探针处于开放状态并通过合适频率的光线刺激时,荧光团和猝灭剂部分彼此足够分离,使得它们之间的能量转移基本上被阻止。在该条件下,猝灭剂部分不能猝灭来自荧光团部分的荧光。如果荧光团通过合适波长的光能刺激,则将生成高于第一水平的第二水平的荧光信号。两种水平的荧光之间的差异可检测和测量。以此方式使用荧光团和猝灭剂部分,分子信标只以“开放”构象“打开”,并表明探针通过发出易于检测的信号而结合到靶标。探针的构象状态通过调节标记物部分之间的相互作用而改变探针生成的信号。

[0096] 不刻意区分 FRET 与非 FRET 对,可结合本发明使用的供体/受体标记物对的实例包括荧光素/四甲基若丹明、IAEDANS/荧光素、EDANS/DABCYL、香豆素/DABCYL、荧光素/荧光素、BODIPY FL/BODIPY FL、荧光素/DABCYL、荧光黄/DABCYL、BODIPY/DABCYL、曙红/DABCYL、赤藓红/DABCYL、四甲基若丹明/DABCYL、德州红/DABCYL、CY5/BH1、CY5/BH2、CY3/BH1、CY3/BH2 和荧光素/QSY7 染料。本领域的普通技术人员将会理解,当供体和受体染料不同时,能量转移可通过受体敏化荧光的外观或通过供体荧光的猝灭而检测。当供体和受体

物质相同时,能量可通过所产生的荧光去极化而检测。诸如 DABCYL 和 QSY7 染料的非荧光受体可有利地消除间接(即,非敏化)受体激发而产生的潜在背景荧光问题。可用作供体-受体对的一个成员的优选荧光团部分包括荧光素、ROX 和 CY 染料(诸如 CY5)。可用作供体-受体对的另一个成员的高度优选的猝灭剂部分包括 DABCYL 和可得自 Biosearch Technologies 公司(Novato, CA)的 BLACKHOLE QUENCHER 部分。

[0097] 使标记物结合到核酸并对标记物进行检测的合成技术及方法在本领域中是熟知的(例如,参见 Sambrook 等, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第 2 版(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), 第 10 章; Nelson 等, 美国专利 No. 5, 658, 737; Woodhead 等, 美国专利 No. 5, 656, 207; Hogan 等, 美国专利 No. 5, 547, 842; Arnold 等, 美国专利 No. 5, 283, 174; Kourilsky 等, 美国专利 No. 4, 581, 333; 以及 Becker 等, 欧洲专利申请 No. 0747706)。

[0098] 探针的化学组成

[0099] 根据本发明的探针包含能够与分析物复合的试剂。可用的探针的实例包括蛋白质探针, 诸如抗体探针; 以及多核苷酸或核酸探针。

[0100] 优选的多核苷酸探针的核苷或核苷类似物包含含氮杂环碱基或碱基类似物, 其中核苷例如通过磷酸二酯键连在一起形成多核苷酸。因此, 探针可包括常规核糖核酸(RNA)和/或脱氧核糖核酸(DNA), 但也可包括这些分子的化学类似物。探针的“主链”可由本领域已知的多种键合构成, 包括一个或多个糖-磷酸二酯键合、肽-核酸键合(有时称为“肽核酸”, 如 Hyldig-Nielsen 等在 PCT 国际申请 No. W095/32305 中所述)、硫代磷酸酯键合、甲基膦酸酯键合或它们的组合。探针的糖部分可以是核糖或脱氧核糖, 或具有已知取代的类似化合物, 诸如 2'-O-甲基核糖和 2' 卤取代(如 2'-F)。含氮碱基可以是常规碱基(A、G、C、T、U); 其已知类似物(如肌苷或“I”; 参见 The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36, Adams 等编辑, 第 11 版, 1992); 嘌呤或嘧啶碱基的已知衍生物(如 N⁴-甲基脱氧鸟苷, 去氮或氮杂嘌呤, 去氮或氮杂嘧啶, 在 5 或 6 位具有取代基团的嘧啶碱基, 在 2、6 或 8 位具有改变的或置取代基的嘌呤碱基, 2-氨基-6-甲氨基嘌呤, 0⁶-甲基鸟嘌呤, 4-硫代嘧啶, 4-氨基嘧啶, 4-二甲基胍嘧啶和 0⁴-烷基嘧啶(参见例如 Cook 的 PCT 国际申请 No. W093/13121)); 以及“脱碱基”残基, 其中聚合物主链的一个或多个残基不含含氮碱基(参见 Arnold 等的美国专利 No. 5, 585, 481)。核酸可只含存在于 RNA 和 DNA 中的常规糖、碱基和键合, 或者既可包含常规组分也可包含取代(例如, 通过甲氧基主链连接的常规碱基, 或包含常规碱基与一种或多种碱基类似物的核酸)。

[0101] 优选的核酸扩增反应形式

[0102] 优选的核酸扩增方法可采用热循环以使双链核酸变性并杂交引物; 或者作为另外一种选择可采用等温反应机理。通常称为 PCR 的聚合酶链反应(Mullis 等, 美国专利 No. 4, 683, 195; Mullis, 美国专利 No. 4, 683, 202; 以及 Mullis 等, 美国专利 No. 4, 800, 159) 使用多个循环的变性、引物对与相反链退火以及引物延伸, 从而以指数方式增加靶序列的拷贝数。在称为 RT-PCR 的变型形式中, 将逆转录酶(RT)用于从 mRNA 制备互补 DNA(cDNA), 然后将 cDNA 通过 PCR 扩增以产生 DNA 的多个拷贝(Gelfand 等, “Reverse Transcription with Thermostable DNA Polymerases - High Temperature Reverse Transcription”, 美国专利 No. 5, 322, 770 和 5, 310, 652)。另一种方法为

链置换扩增(Walker, G. 等 (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA89, 392-396; Walker 等, "Nucleic Acid Target Generation", 美国专利 No. 5, 270, 184; Walker, "Strand Displacement Amplification", 美国专利 No. 5, 455, 166; 以及 Walker 等 (1992) Nucleic Acids Research20, 1691-1696), 其通常称为 SDA, 并使用以下步骤的数个循环: 引物序列对与靶序列相反链进行退火, 在 dNTP 存在下进行引物延伸以产生双链半硫代磷酸化的 (hemiphosphorothioated) 引物延伸产物, 半修饰的限制性内切酶识别位点进行的内切酶介导切刻, 以及从切口 3' 端进行的聚合酶介导引物延伸以置换现有链并产生供下一轮引物退火、切刻和链置换的链, 从而导致产物的几何扩增。嗜热 SDA (tSDA) 以基本上相同的方法在更高温度下使用耐热内切酶和聚合酶(欧洲专利 No. 0684315)。其它扩增方法包括: 基于核酸序列的扩增(Malek 等, 美国专利 No. 5, 130, 238), 通常称为 NASBA; 使用 RNA 复制酶扩增探针分子本身的方法 (Lizardi, P. 等 (1988) BioTechnol. 6, 1197-1202), 通常称为 Q β 复制酶; 基于转录的扩增方法 (Kwoh, D. 等 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA86, 1173-1177); 自动维持序列扩增(Guatelli, J. 等 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA87, 1874-1878; Landgren (1993) Trends in Genetics9, 199-202; 和 Lee, H. 等, NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGIES(1997)); 以及转录介导扩增(Kacian 等, "Nucleic Acid Sequence Amplification Methods", 美国专利 No. 5, 480, 784; 和 Kacian 等, 美国专利 No. 5, 399, 491), 通常称为 TMA。对于已知扩增方法的进一步讨论, 参见 Persing, David H., 1993, "In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques" in Diagnostic Medical Microbiology: Principles and Applications (Persing 等编辑), 第 51-87 页 (American Society for Microbiology, Washington, DC)。适于根据本发明使用的其它示例性扩增方法包括滚环扩增 (RCA) (Lizardi, "Rolling Circle Replication Reporter Systems", 美国专利 No. 5, 854, 033); 解链酶扩增技术 (HDA) (Kong 等, "Helicase Dependent Amplification Nucleic Acids", 美国专利申请公布 No. US2004-0058378A1); 以及环介导等温扩增 (LAMP) (Notomi 等, "Process for Synthesizing Nucleic Acid", 美国专利 No. 6, 410, 278)。

[0103] 本发明优选的基于转录的扩增系统包括 TMA, 其采用 RNA 聚合酶产生靶区的多个 RNA 转录体(例如, Kacian 等, 美国专利 No. 5, 480, 784 和 5, 399, 491; 以及 Becker 等, "Single-Primer Nucleic Acid Amplification Methods", 美国专利申请公布 No. US2006-0046265A1)。转录介导扩增 (TMA) 使用“启动子寡核苷酸”或“启动子引物”, 其在逆转录酶和 RNA 聚合酶存在下杂交到靶核酸, 以形成双链启动子, 而 RNA 聚合酶由其产生 RNA 转录体。这些转录体可变成模板, 用于在能够杂交到 RNA 转录体的第二引物存在下进行更多轮的 TMA。不同于 PCR、LCR 或需要热变性的其它方法, TMA 是一种等温方法, 它使用 RNase H 活性来消化 RNA:DNA 杂交体的 RNA 链, 从而使得 DNA 链可用于与引物或启动子引物杂交。

[0104] 在一个示例性 TMA 方法中, 一个扩增引物为寡核苷酸启动子引物, 其包含当双链化时变为功能性的启动子序列, 该序列位于靶结合序列的 5', 而该靶结合序列能够杂交到待扩增的序列的 3' 位的靶 RNA 结合位点。启动子引物在具有 T7RNA 聚合酶识别特异性时可称为“T7 引物”。在某些情况下, 启动子引物的 3' 端或此类启动子引物的亚群可以被修饰, 以阻断或减少引物延伸。通过未修饰的启动子引物, 逆转录酶形成靶 RNA 的 cDNA 拷贝, 而 RNase H 活性则降解靶 RNA。第二扩增引物然后结合到 cDNA。该引物可以称为“非 T7 引

物”以区别于“T7 引物”。通过该第二扩增引物,逆转录酶形成另一条 DNA 链,从而产生在一端具有功能性启动子的双链 DNA。当双链化时,启动子序列能够结合 RNA 聚合酶,以开始启动子引物所杂交到的靶序列的转录。RNA 聚合酶使用该引物序列产生多个 RNA 转录体(即,扩增子),通常为约 100 至 1,000 个拷贝。每个新合成的扩增子可与第二扩增引物退火。逆转录酶随后可产生 DNA 拷贝,而 RNase H 活性则降解此 RNA:DNA 双链体的 RNA。启动子引物可结合到新合成的 DNA,从而允许逆转录酶形成双链 DNA,而 RNA 聚合酶则由其产生多个扩增子。

[0105] 优选的分析物多核苷酸

[0106] 本发明不限于使用特定的核苷酸序列、核酸分析物、引物或杂交探针。因此,用于实施例中的具体寡核苷酸不是本发明的本质特征。

[0107] 优选的分析物多核苷酸包括来自致病生物体的核酸,这些生物体包括病毒、细菌、真菌和原生动物。来自病毒的高度优选的分析物多核苷酸的实例为来自人免疫缺陷病毒(HIV-1 和 HIV-2)、乙肝病毒(HBV)、丙肝病毒(HCV)、人乳头瘤病毒(HPV)、登革热病毒(DEN)、基孔肯雅病毒(CHIKV)等的核酸。可根据本文所公开的方法定量来自细菌、真菌和原生动物的优选分析物多核苷酸包括核糖体 RNA(rRNA)。作为分析物多核苷酸来源的高度优选的细菌的实例包括:沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*) (专性细胞内寄生的革兰氏阴性细胞)、弯曲菌属成员(空肠弯曲菌(*C. jejuni*))、结肠弯曲菌(*C. coli*)、海鸥弯曲菌(*C. lariidis*)、肠球菌属成员(鸟肠球菌(*E. avium*))、酪黄肠球菌(*E. casseliflavus*)、坚忍肠球菌(*E. durans*)、粪肠球菌(*E. faecalis*)、尿肠球菌(*E. faecium*)、鹌鸡肠球菌(*E. gallinarum*)、希拉肠球菌(*E. hirae*)、蒙氏肠球菌(*E. mundtii*)、假鸟肠球菌(*E. pseudoavium*)、恶臭肠球菌(*E. malodoratus*)和棉子糖肠球菌(*E. raffinosus*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、单核增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、B 群链球菌(Group B Streptococci)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)、细胞内分枝杆菌(*Mycobacterium intracellulare*)、戈氏分枝杆菌(*Mycobacterium goodii*)、堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*)。作为分析物多核苷酸来源的高度优选的真菌的实例包括:皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、假丝酵母属成员(白假丝酵母(*C. albicans*))、光滑假丝酵母菌(*C. glabrata*)、近平滑假丝酵母(*C. parapsilosis*)、*C. diversus*、热带假丝酵母(*C. tropicalis*)、季也蒙假丝酵母(*C. guilliermondii*)、都柏林假丝酵母(*C. dubliniensis*)、荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)。作为分析物多核苷酸来源的高度优选的原生动物的实例包括:血液和组织原生动物,诸如疟原虫属成员(三日疟原虫(*P. malariae*))、恶性疟原虫(*P. falciparum*)、间日疟原虫(*P. vivax*));以及感染胃肠道的原生动物,诸如蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*)和小球隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)。

[0108] 本发明所公开的方法也可用于检测人源核酸,诸如在疾病状态(包括癌症)下过表达或低表达的 mRNA。在乳腺和卵巢腺癌中以增加的拷贝数存在的基因的一个实例为 HER-2/neu 癌基因,其编码具有某些与表皮生长因子受体(EGFR)相同的特征的酪氨酸激酶。美国专利 No. 4,968,603 描述了测量 HER-2/neu 基因或 HER-2/neu mRNA 增加的拷贝数

作为确定肿瘤疾病状态的工具有的价值。因此,例如,本文所述的方法可用于定量核酸扩增方案,借此确定 HER-2/neu 多核苷酸的细胞含量。

[0109] 实际上,本文所述的方法广泛适用于许多核酸靶标,并可容易地扩展到定量测试样品中任何给定分析物多核苷酸的程序。

[0110] 设备和转化备选方案

[0111] 可用于执行本文所公开的方法的设备通常将包括:支架,其用于进行测试的样品,光学检测机构,其检测和/或定量表示 IC 和分析物探针的探针结合幅度的信号,以及处理器(如,计算机),其分析数据并确定分析物是否存在或甚至这样的确定是否可能。这样的设备的一个优选实例为核酸扩增和检测装置。在该设备上执行的方法可涉及杂交探针,并且对可检测标记物生成的光学信号的检测可在恒定温度(如,环境温度或不同的恒定温度)下进行。根据本发明,不必收集不同温度下的光学信号数据来确定测试样品中分析物的存在与否。维持恒定温度的优选构造为温控培养箱。如果信号检测在环境温度下进行则温控培养箱是可选的。当然,设备也可以包括温控培养箱来扩增核酸,但是该培养箱不必在用于确定样品中分析物存在与否的光学信号检测步骤中使用。例如,支架可容纳在温控培养箱内,以维持其恒定温度,或者可独立于用在涉及核酸扩增或某些其它过程的步骤中的温控培养箱。优选地,该设备被构造成固定多孔板或多根试管。在一个实施方案中,光学检测机构包括检测化学发光反应的光输出的光度计。在不同的实施方案中,光学检测机构包括荧光检测器(即,荧光计)。就核酸分析而言,杂交信号的检测优选地在扩增反应结束时发生,其有时称为“终点检测”。这区别于实时检测,其中检测步骤在扩增反应发生时连续地或定期地进行。优选地,通过自动化测试仪将 IC 和分析物核酸(如,扩增产物)的特异性探针加到核酸扩增反应混合物中。在一般优选的实施方案中,执行本发明所公开的方法的设备将包括通过软件指令编程的或能够执行软件指令的计算机或处理器,以用于确定测试反应是否无效,测试结果是否有效以及分析物存在性是否为阴性(即,进行测试的样品不含分析物),或进行测试的样品的分析物存在性是否为阳性。

[0112] 在某些情况下,在实践本发明时,试剂(如,三磷酸脱氧核糖核苷酸和/或三磷酸核糖核苷酸)转化成扩增子也是优选的。这可涉及将模板核酸与一种或多种启动寡核苷酸(如,“引物”)接触,然后以模板依赖性方式酶促延伸启动寡核苷酸。

[0113] 在某些其它情况下,试剂的转化可涉及将指示试剂转化成可检测的形式,其中该可检测的形式指示起始样品或反应混合物中 IC 或分析物的存在性。

[0114] 软件

[0115] 无论是以有形形式记录的机器可读指令的形式(如,机器可读介质,诸如具有使用电子、磁或光学数据存储记录在其上的指令的磁盘),还是加载到作为样品处理及结果获取设备的组件的装置中(如,执行探针杂交和检测的核酸扩增装置),软件产品均代表了本说明涵盖的主题的一部分。同样,本发明也涵盖使用软件运行的样品处理及结果获取装置(如,执行探针杂交和检测的核酸扩增装置)。当然,软件可加载到连接到样品处理及结果获取装置的通用计算机中。作为另外一种选择,软件可加载到作为样品处理及结果获取装置的一体化元件的计算装置中。

[0116] 校准软件

[0117] 本发明的软件特征可包括用于处理来自一个或多个校准标准品的输入结果的指

令。因此,将确立有效性截止值和分析物截止值,其中这些截止值可用于确定测定结果是否有效,以及进行测试的样品是否包含分析物。更具体地讲,软件处理来自阴性校准品(即,不含任何外加分析物的校准标准品)的结果。高度优选的软件应用程序关注于核酸的检测,其中使用涉及核酸扩增程序的技术。当然,使用阴性校准品进行的核酸扩增反应将包括内控,无论是作为校准品的组分还是单独地添加。

[0118] 优选的软件能够确立用于确定测定过程有效性以及确定进行测试的样品中分析物存在与否的阈值截止值。用于执行这些程序的仪器优选地包括在其中发生核酸扩增反应的温控培养箱。更优选地,仪器被进一步构造成用于执行核酸杂交反应(如,在扩增反应结束时)以及检测探针杂交体。软件通常能够接收来自一个或多个阴性校准品试验的定量输入,其中每个试验包括在不存在外加分析物的情况下使用 IC 进行的反应(如,核酸扩增和探针杂交及检测),并且其中阴性校准品试验的反应产物通过单通道检测进行检测。在这种检测形式中,表明 IC 特异性和分析物特异性反应产物的存在的信号在不用区分两种反应产物中的任一种的特定信号的情况下进行定量。软件能够进一步确立以下有效性截止值:其小于阴性校准品试验测得的组合 IC 信号加分析物信号的幅度的 100%。得出组合 IC 加分析物信号的幅度达到或超过有效性截止值的测试反应(即,使用测试样品进行的反应)将被判定为有效(即,证实所有测定过程步骤都正常作用)。得出 IC 加分析物信号的幅度小于有效性截止值的测试反应将被判定为无效。软件能够进一步接收一个或多个阳性校准品试验的结果,其中每个试验包括使用产生 IC 和分析物两者的可检测反应产物的 IC 和预定量分析物进行的反应(如,核酸扩增和探针杂交及检测),并且其中阳性校准品试验的产物与阴性校准品试验的产物一样通过单通道检测进行检测。软件能够进一步确立这样的分析物截止值:其大于阴性校准品试验测得的组合 IC 加分析物信号的幅度的 100%,并任选地也小于阳性校准品试验的 100% 的分数量。产生组合 IC 加分析物信号的幅度达到或超过分析物截止值的测试样品将表明进行测试的样品包含分析物。产生组合 IC 加分析物信号的幅度小于分析物截止值的测试样品将表明进行测试的样品不含分析物。

[0119] 本公开的校准软件组件值得注意的特征在于以下事实:确立两个截止值,并且这些截止值使用基于组合信号的单次读取的定量信号数据加以确立,其中组合信号包含来自 IC 和分析物的贡献,但是其中组合信号不对信号贡献的来源进行区分。相反,软件能够通过将组合信号针对确定的阈值截止值进行比较而确定分析物存在于测试样品中。

[0120] 分析软件

[0121] 用于分析结合本发明的技术得到的实验数据的软件能够确定组合 IC 和分析物信号的幅度是高于还是低于多个阈值截止值。例如,优选的软件指令规定执行以下步骤:确定组合信号的幅度是否达到或超过阈值(即,分析物截止值)以确定分析物在反应混合物中的存在性。如果组合信号达到或超过分析物截止值,则软件可输出表明进行测试的样品包含分析物的结果。反之,如果组合信号的幅度未达到或超过分析物截止值(即,落在分析物截止值以下),则软件也可命令对组合信号的幅度与有效性截止值的比较,以确定测定结果是有效还是无效。这里,其中组合信号的幅度低于有效性截止值的结果将被解释为表明测定无效。这可能需要重复测试,并且软件可表明测试无效。另一方面,如果组合信号的幅度达到或超过有效性截止值,则软件将测定结果解释为有效。再次提到,如果组合信号的幅度达到或超过有效性截止值,但未达到或超过分析物截止值,则软件命令输出将表明进行测试

的样品不含分析物的结果。该结果将被视为有效,这意味着关于分析物不存在的结论是准确的,并且不是因为某些测定组成部分失败所致。此树状处理的逻辑以表 1 中显示的查表体现。

[0122] 除了以上方面外,优选的软件指令可进一步对检测多种分析物的 IC 验证测定法获得的结果进行解释。为了简化软件该方面的描述,使用“组合第一信号”检测第一分析物(即,“分析物-1”)和 IC 或由其产生的扩增子,该组合第一信号为表明这些靶标检出的组合 IC 加分析物-1 信号。相似地,“第二信号”用于检测第二分析物(即,“分析物-2”)或由其产生的扩增子。任选地,第三分析物(即,“分析物-3”)也可通过“组合第二信号”检测,其中该信号表示存在分析物-2 或分析物-3,而不对它们彼此进行区分。软件可接收第二信号的输入信息,并将第二信号的幅度与检测分析物-2 的阈值截止值(即,“分析物-2 截止值”)进行比较。分析物-2 截止值任选地可不同于用于检测分析物-1 的阈值截止值(即,“分析物-1 截止值”),因为分析物-2 的检测通常将使用区别于用于检测分析物-1 的标记物的标记物来进行。在这里,软件可命令执行确定第二信号的幅度是高于还是低于分析物-2 截止值的步骤。如果第二信号的幅度达到或超过分析物-2 截止值,则软件报告分析物-2 存在于进行测试的样品中。如果第二信号的幅度低于分析物-2 截止值,则结果可能意味着进行测试的样品不含分析物-2,或者结果因测定过程步骤受到抑制而无效。无论第二信号是高于还是低于分析物-2 截止值,软件都优选地询问组合第一信号的幅度。这里再次提到,优选的软件指令将规定执行以下步骤:确定组合第一信号的幅度是达到还是超过分析物-1 截止值。如果组合第一信号达到或超过分析物-1 截止值,则软件将输出表明进行测试的样品包含分析物-1 的结果。由于分析物-1 截止值高于有效性截止值,所以分析物-1 阳性结果将自动验证测定结果,这意味着落在分析物-2 截止值以下的第二信号将由软件解释为验证分析物-2 阴性结果。在这种情况下,软件可生成表明进行测试的样品包含分析物-1 但不含分析物-2 的输出。如果组合第一信号的幅度未达到或超过分析物-1 截止值(即,落在分析物-1 截止值以下),则软件也可命令对组合第一信号的幅度与有效性截止值进行比较,以确定测定结果是有效还是无效。在这里,其中组合第一信号的幅度低于有效性截止值的结果将被软件解释为表示仅当第二信号也落在分析物-2 截止值以下时测定结果才无效。如果组合第一信号的幅度低于有效性截止值,并且如果第二信号的幅度达到或超过分析物-2 截止值,则软件报告进行测试的样品包含分析物-2 但不含分析物-1。在这种情况下,第二信号可用于验证测定结果,即便第一信号低于有效性截止值时。同样,如果组合第一信号达到或超过有效性截止值,但落在分析物-1 截止值以下,则该结果将验证测定结果,这意味着进行测试的样品不含分析物-1。样品是否包含分析物-2 将取决于第二信号的幅度是否达到或超过分析物-2 截止值(在该情况下,样品包含分析物-2),或者第二信号的幅度是否落在分析物-2 截止值以下(在该情况下,样品不含分析物-2)。此树状处理的逻辑以表 2 中显示的查表体现。

[0123] 示例性实施例

[0124] 以下是扩增并检测 IC 多核苷酸以及任选地不同的第一和 / 或第二分析物多核苷酸(即,称为“分析物-1”和“分析物-2”)的示例性情况。更具体地讲,在扩增反应结束时,对若存在的 IC 扩增子、分析物-1 扩增子和分析物-2 扩增子均使用靶特异性杂交探针进行检测。将 IC 和分析物-1 特异性探针用相同的化学发光标记物质(即,AE 标记物)进行标

记。将分析物 -2 扩增子特异性探针用第二 AE 标记物标记,其区别于用于检测 IC 扩增子和分析物 -1 扩增子的标记物。对 IC 和分析物 -1 扩增子的组合探针杂交信号的幅度进行测量,并针对两个阈值截止值进行比较,以确定测定有效性以及分析物 -1 核酸在反应中存在与否。根据本发明,达到或超过这些阈值中的低值(即,有效性截止值)的组合信号表明发生了扩增和检测,从而对测定进行验证(即,“测定有效”)。反之,低于有效性截止值的组合信号表明程序失败,并宣称测定结果“无效”。达到或超过第二阈值(即,分析物 -1 截止值)的组合信号表明分析物 -1 存在于进行测试的样品中(即,分析物 -1 阳性),其中第二阈值大于第一阈值。超过有效性截止值但未超过分析物 -1 截止值的组合信号表明样品为分析物 -1 阴性,并且测定结果有效(即,测定有效;分析物 -1 阴性)。通过将分析物 -2 特异性探针的杂交信号针对该靶标的特异性阈值截止值(即,分析物 -2 截止值)进行比较而独立地对分析物 -2 进行检测。达到或超过分析物 -2 截止值的由分析物 -2 特异性探针产生的信号表明分析物 -2 存在于进行测试的样品中。要注意的是,任何分析物 -2 阳性的样品都被视为有效,而无论 IC 加分析物 -1 扩增子检测得的信号如何。最后,检出达到或超过分析物 -1 截止值的 IC 和分析物 -1 的组合杂交信号与达到或超过分析物 -2 截止值的由分析物 -2 特异性探针产生的信号则表明进行测试的样品同时含有分析物 -1 和分析物 -2。

[0125] 采用下述吡啶酯标记物的方法在核酸标记领域是已知的。实际上,Nelson 等在美国专利 No. 5, 658, 737 中描述了使用具有动力学有区别的化学发光标记物的杂交探针同时检测多种特异性核酸序列。Nelson 等具体采用了不同的标记物来区分不同靶特异性探针的杂交。Linnen 等在已公布的美国专利申请 No. 2004/0029111 中描述了使用杂交探针混合物来检测扩增的病毒核酸靶标,并在一些情况下检测内控扩增子。这里,将动力学有区别的标记物用于辨别内控扩增子与分析物扩增子。将其中使用探针集合来检测病毒扩增子的试验通过使用单个阈值截止值判定为阳性或阴性。Linnen 等公开的 IC 验证测定法始终需要一个标记物来检测 IC 扩增子以及不同的标记物来检测分析物扩增子。通过以下描述将显而易见的是,本发明所公开的技术包括在单一反应混合物中的探针(如,核酸探针)上可检测标记物的全新布置,其中该布置会产生使用他人之前公开的方法得到的模棱两可的结果。

[0126] 实施例 1 描述能够使用单读取通道以及仅单个可检测标记物质而检测第一分析物核酸的 IC 验证测定法。所述测定法能够进一步使用第二可检测标记物质检测第二分析物,其中该第二标记物质区别于第一标记物质。在此情况下,IC(即,除了错义内部探针结合序列外基本上与分析物 -1 相同的序列)和分析物 -1 模板均使用共用的引物对扩增,从而限定竞争性 IC 扩增(即,分析物 -1 和 IC 通过共用的引物扩增)。然而,非竞争性 IC 系统(即,分析物 -1 和 IC 核酸通过不相关的引物扩增)也可代替,并落在本发明的方法和设备的范围内。要注意的是,在此举例说明中所用的测定法在相应的靶标以每次反应 30 个拷贝存在时表现出 95% 的分析物 -1 和分析物 -2 阳性检测。

[0127] 实施例 1

[0128] 使用分析物和过程控制信号的单通道读取来检测两种不同的分析物多核苷酸的 IC 验证测定法

[0129] 体外合成的转录体用作常规 TMA 反应中的扩增模板。阴性对照样品由 400 μ l 体积的不含添加的分析物 -1 或分析物 -2 核酸的标本转移介质 (STM) 表示。测试样品由 400 μ l 体积的含有以下物质的 STM 表示:分析物 -1 体外转录体的 100 个拷贝、分析物 -2 体外转录

体的 100 个拷贝,或分析物 -1 体外转录体的 10^7 个拷贝与分析物 -2 体外转录体的 10^4 个拷贝的组合。STM 是一种磷酸盐缓冲洗涤剂溶液,其除了裂解细胞外,还通过抑制可能存在于测试样品中的 RNase 活性而保护释放出来的 RNA。将含有体外合成的 IC 转录体的 200 个拷贝的靶捕获试剂 (TCR) 的等分试样 ($100\ \mu\text{l}$) 加到各样品中,然后温和混合。这确保了每个反应都收到 IC 模板核酸。TCR 包含显示出表面 oligo(dT)₁₄ 的磁性粒子 (Seradyn 公司; Indianapolis 公司); 以及具有一段接合到与 IC 和分析物 -1 核酸或与分析物 -2 核酸互补的序列的 poly(dA) 的靶捕获寡核苷酸。将捕获反应混合物依次在 62°C 下温育 30 分钟,在室温下温育 30 分钟,以允许形成由固体载体粒子上的靶: 捕获寡聚物: 固定化探针构成的杂交复合物。将粒子上的杂交复合物通过向容器外壁施加磁力而与样品组分分离,吸走未固定到粒子上的其它样品组分,使用标准实验室程序洗涤粒子上的杂交复合物。要注意的是, IC 和分析物 -1 转录体除了引物结合位点之间的错义 (scrambled) 区外具有相同的序列。这些天然和错义序列作为扩增步骤结束时执行杂交和检测程序过程中的探针结合位点。分析物 -2 转录体具有使用独立引物组扩增的序列,其中扩增产物不通过用于检测 IC 或分析物 -1 的探针检测。

[0130] 扩增反应物通过将来自各试管的纯化磁珠复合物与 $75\ \mu\text{l}$ 扩增试剂的等分试样和 $200\ \mu\text{l}$ 控制蒸发的惰性油覆盖层相结合而制备。TMA 反应基本上如 Kacian 等在美国专利 No. 5, 399, 491 中所述而进行。该美国专利的公开内容以引用方式并入。扩增试剂包含 pH 缓冲的以下物质的混合物: 盐、辅因子、三磷酸脱氧核糖核苷酸 (即, 四种 dNTP) 和三磷酸核糖核苷酸 (即, 四种 NTP)。扩增试剂进一步包含 T7 启动子引物和非 T7 引物, 其中该组合既能扩增 IC 又能扩增分析物 -1 核酸模板。扩增试剂还包含 T7 启动子引物和非 T7 引物, 其中该组合能扩增分析物 -2 核酸。将试管的内容物温和混合, 短暂加热到 62°C , 然后平衡到 42°C 。接下来, 将反应混合物与 $25\ \mu\text{l}$ 酶试剂的等分试样组合, 再在 42°C 下温育另外 60 分钟以允许扩增。酶试剂包含莫洛尼鼠白血病病毒 (“MMLV”) 逆转录酶和 T7RNA 聚合酶。当存在合适的模板多核苷酸时, 反应导致了形成扩增的 DNA 和 RNA 链。

[0131] 在 60 分钟的温育期结束时, 使扩增反应混合物接受探针杂交测定。根据本领域普通技术人员将会熟悉的程序, 使用 2'-甲氧基 (2'-OMe) 核苷酸类似物制备寡核苷酸探针, 并用吡啶酯进行标记。在此情况下, 将 IC 扩增子特异性探针和分析物 -1 扩增子特异性探针均用邻氟 AE 标记, 其有时称为“闪烁体”, 因为其在化学发光过程中具有快速动力学性质。将分析物 -2 扩增子特异性探针用 2-甲基 AE 标记, 其有时称为“发光体”, 因为其相对于闪烁体具有持久的发光动力学性质。根据美国专利 No. 5, 585, 481 和 5, 639, 604 中所述的程序, 通过内置的非核苷酸连接基将可检测标记物接合到寡核苷酸, 这些专利的公开内容以引用方式并入。通过将 $100\ \mu\text{l}$ 体积的扩增反应物与 $100\ \mu\text{l}$ 的缓冲探针试剂 (在琥珀酸盐缓冲洗涤剂溶液中含有三种寡核苷酸探针) 相结合而进行杂交反应。更具体地讲, 将探针试剂加到各试管中, 涡旋, 然后在 62°C 的水浴中温育 15 分钟。完成探针杂交步骤后, 将 $250\ \mu\text{l}$ 选择试剂 (含表面活性剂的硼酸盐缓冲溶液) 加到各反应试管中。将试管涡旋, 然后在 62°C 下温育 10 分钟。从 62°C 的培养箱中取出后, 将试管冷却到 19°C 至 27°C 维持 10 分钟至 75 分钟, 然后置于被构造造成自动注射 0.1% 过氧化氢和 1mM 硝酸的 LEADER HC+ 光度计 (Gen-Probe Incorporated; San Diego, CA) 中, 然后注射含 1N NaOH 的溶液。各反应中的组合 IC 闪烁体信号和分析物 -1 闪烁体信号与分析物 -2 发光体信号的区别在于不同的发光

动力学,基本上如 Nelson 等在美国专利 No. 5, 658, 737 中所述。该美国专利的公开内容以引用方式并入。接收来自光度计的输入的软件对闪烁体与发光体信号进行区分,并以相对光单位 (RLU) 记录化学发光反应的结果。再次提到,该程序允许指定由于以下方面产生的信号贡献:(1) IC 加分析物 -1 杂交的组合;和 (2) 分析物 -2 杂交。IC 探针和分析物 -1 探针产生的信号之间无区别。

[0132] 虽然通常将只使用两种校准品(即,下面所述的第一和第二校准品)来确立旨在用于通过 IC 验证而检测单一分析物(如,分析物 -1)的测定法中的截止值,但是使用了三种校准品来阐释另外还允许检测第二分析物(分析物 -2)的技术。更具体地讲,进行了校准反应以确立有效性截止值、分析物 -1 截止值和分析物 -2 截止值。第一校准标准品(即,“Cal(1)”)是由 STM 缓冲液组成的阴性校准品,且不含外加的分析物 -1 或分析物 -2 核酸。第二校准标准品(即,“Cal(2)”)是在 STM 缓冲液中含有分析物 -1 转录体的阳性校准品,所含的量每次反应提供 400 个拷贝。第二校准品不含任何外加的分析物 -2 转录体。第三校准标准品(即,“Cal(3)”)是在 STM 缓冲液中含有分析物 -2 转录体的阳性校准品,所含的量每次反应提供 300 个拷贝。第三校准品不含任何外加的分析物 -1 转录体。使用本领域的普通技术人员将会熟悉的标准实验室程序提前确立了:这些分析物 -1 和分析物 -2 模板输入量在探针杂交和检测程序中导致了基本上饱和水平的杂交信号。包括校准标准品的试验使用上述靶捕获、扩增和检测程序进行处理。校准反应一式三份地进行。

[0133] 表 3 汇总了用于确立有效性截止值、分析物 -1 截止值和分析物 -2 截止值的校准反应的结果。将使用阴性校准品(即,Cal(1))确定的平均闪烁体信号值乘以 0.5 以确立有效性截止值。通过将使用阴性校准品确定的平均闪烁体信号值加倍,然后加上使用第二校准品(即,Cal(2))确定的平均闪烁体信号值的 10% 而确立分析物 -1 截止值。通过任意计算使用第三校准品(即,Cal(3))确定的平均发光体信号值的 18%,然后加上 Cal(1) 测得的平均发光体信号值而确立分析物 -2 截止值。

[0134] 表 3

[0135] 确立阈值截止值

[0136]

校准品ID	平均闪烁体信号 (RLU)	平均发光体信号 (RLU)	确定的截止值 (RLU值)
Cal(1)	207,910	0	有效性截止值 (103,955个闪烁体 RLU)
Cal(2)	2,341,958	0	分析物-1截止值 (650,016个闪烁体 RLU)
Cal(3)	0	1,962,929	分析物-2截止值 (353,327个发光体 RLU)

[0137] 表 4 和图 2 汇总了使用测试样品一式十份获得的并根据表 3 所示的阈值截止值解释的结果。阴性对照试验产生了超过有效性截止值的 IC 加分析物 -1 闪烁体探针的组合平均杂交信号,从而确立测定结果有效。然而,该信号的幅度低于分析物 -1 截止值,并因此表明测试样品如预期一样其分析物 -1 存在性为阴性。同样地,分析物 -2 发光体信号低于

分析物-2 截止值,从而表明测试样品也如预期一样为分析物-2 阴性。每次反应使用分析物-1 转录体的 100 个拷贝并且无分析物-2 转录体而进行的试验产生了超过有效性截止值和分析物-1 截止值两者的 IC 加分析物-1 闪烁体探针的组合平均杂交信号,从而确立测定结果有效,并且测试样品为分析物-1 阳性。这些相同的试验产生了低于分析物-2 截止值的平均发光体信号,从而表明测试样品为分析物-2 阴性。每次反应使用分析物-2 转录体的 100 个拷贝并且无分析物-1 转录体而进行的试验产生了仅超过有效性截止值而未超过分析物-1 截止值的 IC 加分析物-1 闪烁体探针的组合平均杂交信号。这表明了测定结果有效,并确立了测试样品为分析物-1 阴性。这些相同的试验产生了超过分析物-2 截止值的平均发光体信号,从而表明测试样品为分析物-2 阳性。最后,每次反应使用分析物-1 转录体的 10^7 个拷贝以及分析物-2 转录体的 10^4 个拷贝而进行的试验产生了超过有效性截止值和分析物-1 截止值两者的 IC 加分析物-1 闪烁体探针的组合平均杂交信号,从而确立测定结果有效,并且测试样品为分析物-1 阳性。这些相同的试验产生了超过分析物-2 截止值的平均发光体信号,从而表明测试样品也为分析物-2 阳性。表 4 中所示的基于第 2 和 3 列给出的结果得出的结论与上表 2 中示出的解释一致。当然,表 4 中所示的与仅使用 IC 和分析物-1 探针(参见第 2 列)获得的结果解释相关的结论与上表 1 中示出的解释一致。

[0138] 表 4

[0139] 实验结果的分析

试验	平均IC加分析物-1 闪光体信号(RLU)	平均分析物-2发 光体信号(RLU)	结论
阴性对照	210,640	0	测定有效 分析物-1 (-) 分析物-2 (-)
100 c/rxn下的分析物-1 0 c/rxn下的分析物-2	2,090,384	0	测定有效 分析物-1 (+) 分析物-2 (-)
0 c/rxn下的分析物-1 100 c/rxn下的分析物-2	177,431	1,744,838	测定有效 分析物-1 (-) 分析物-2 (+)
10^7 c/rxn下的分析物-1 10^4 c/rxn下的分析物-2	2,502,884	1,620,591	测定有效 分析物-1 (+) 分析物-2 (+)

[0141] 虽然已经参照某些优选的实施方案相当详细地描述和展示了本发明,但是本领域的技术人员将容易地认识到本发明的其它实施方案。因此,本发明被认为包括所附权利要求书的精神和范围涵盖的所有修改形式和变型形式。

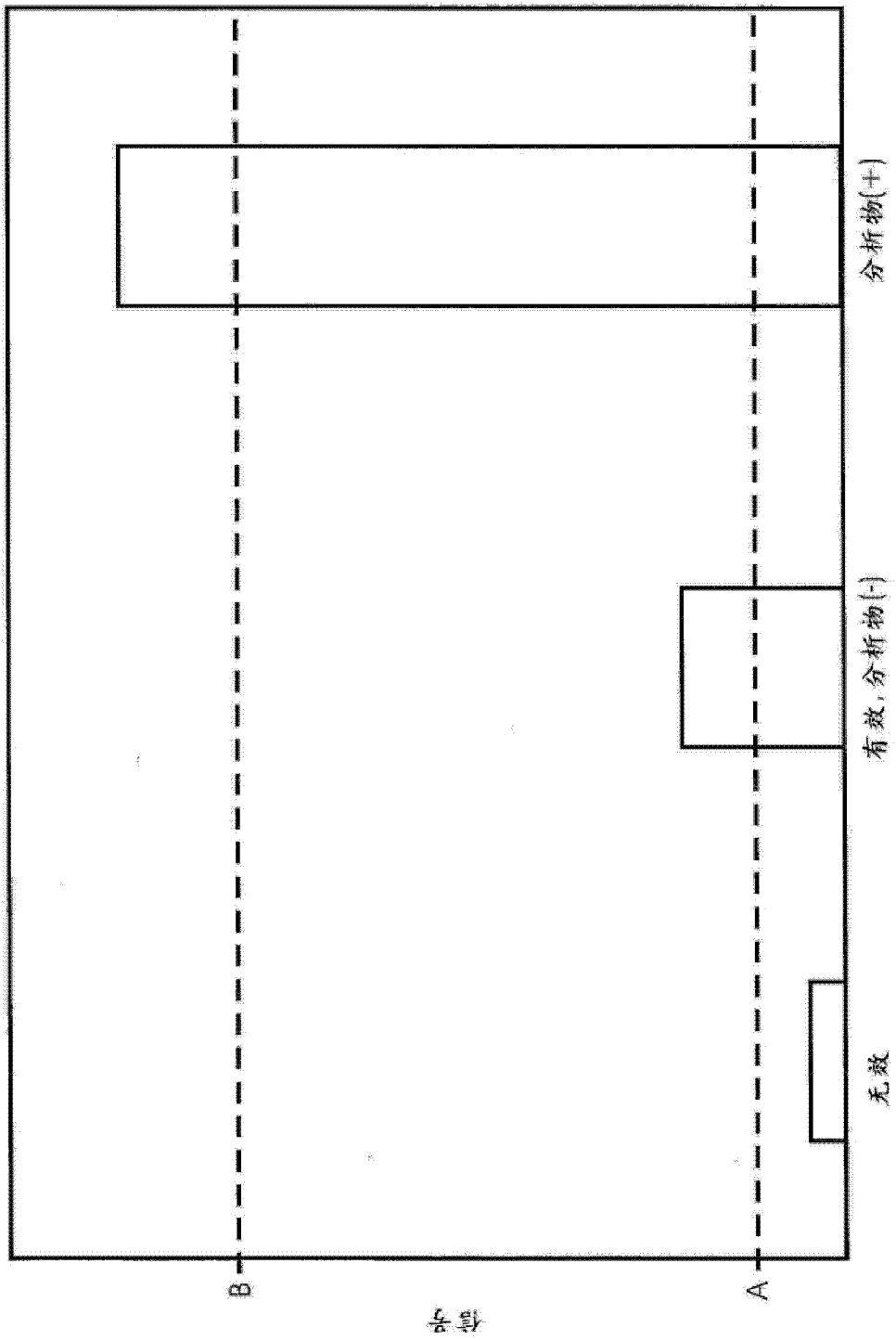


图 1

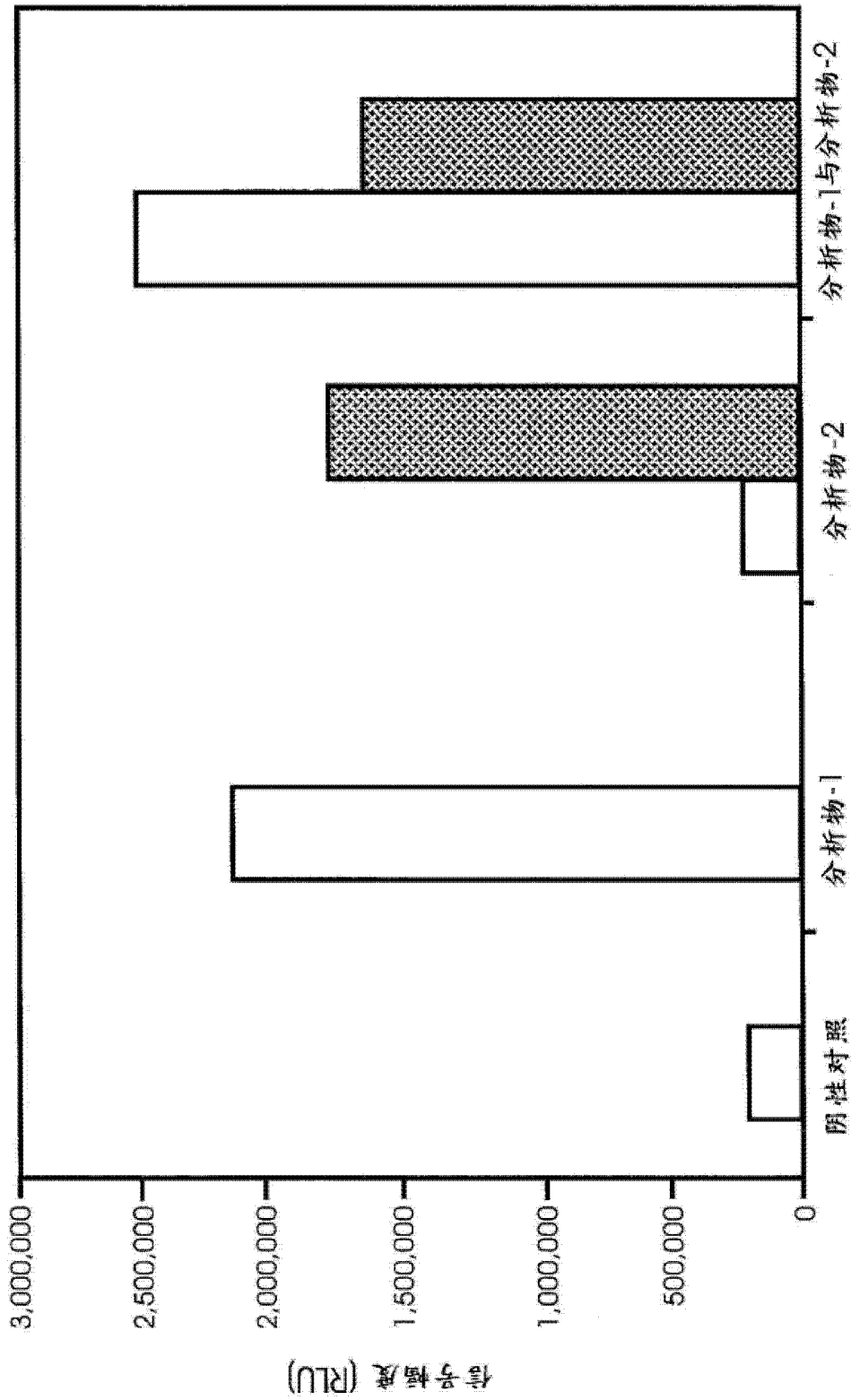


图 2