



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107058617 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201710127528.9

(51) Int. Cl.

(22)申请日 2011.07.27

C12Q 1/70(2006.01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/68(2006.01)

10175533.8 2010.09.07 EP

C12Q 1/04(2006.01)

61/368.970 2010.07.29 US

C12N 15/10(2006.01)

(62)分案原申请数据

201180035818.1 2011.07.27

(71)申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 M·埃克霍夫 E·拉斯曼

D·齐默尔曼 A·沃尔菲尔施奈德

C·纽豪斯 E·S·史密斯

S · F · 博伊尔

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 岑晓东

权利要求书4页 说明书58页

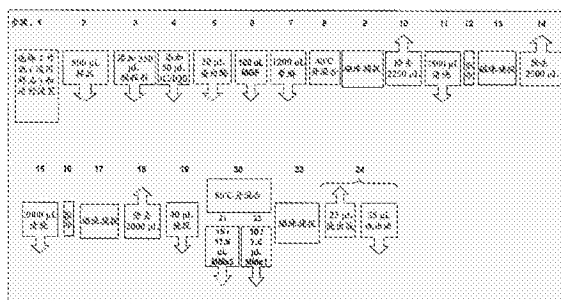
序列表17页 附图20页

(54)发明名称

通用样品制备

(57)摘要

本发明涉及通用样品制备。本发明涉及用于诊断目的的核酸的样品制备。更精确地,本发明提供了一种用于自多种不同类型的流体样品至少同时分离第一和第二靶核酸并任选地以同时方式扩增所述分离的核酸的方法。



1. 一种用于自多种不同类型的流体样品至少同时分离选自细菌、DNA病毒和RNA病毒的第一和第二靶核酸并测定其存在、不存在和/或量的非诊断目的的方法，

其中所述第一靶核酸和所述第二靶核酸来自不同生物体，

其中所述第一或所述第二核酸是细菌核酸，

且其中所述第一靶核酸包含RNA，而所述第二靶核酸包含DNA，

所述方法包括下列自动化步骤：

a. 向所述多种不同类型的流体样品的成员添加相同的裂解缓冲液，其中所述裂解缓冲液具有介于5.5和6.5之间的pH且包含离液剂、缓冲物质、醇、和还原剂，并由此将核酸从其细胞和病毒环境中释放，其通过裂解所述多种不同类型的流体样品中潜在存在的细胞和病毒壳体来进行，并在与流体样品数目对应的数目的容器中将磁性颗粒和所述多种不同类型的流体样品在一定条件下组合在一起达一段时间，该条件和时间段足以允许包含所述靶核酸的核酸在所述磁性颗粒上固定化，

b. 在包含一个或多个磁体的分离站中将所述磁性颗粒自存在于所述流体样品中的其它物质分离，

c. 在分离站中纯化所述核酸，其通过将所述流体样品与所述磁性颗粒分开，并通过使用移液器将包含清洗缓冲液和磁性颗粒的悬浮液抽吸并分配一次或多次而将所述磁性颗粒用清洗缓冲液清洗一次或多次来进行，

d. 用洗脱缓冲液从所述磁性颗粒洗脱所述核酸，

e. 将纯化的核酸和任选地所述磁性颗粒转移至多种反应容器，

f. 扩增所述靶核酸，

其中物理条件和所述时间段对于所述多种不同类型的流体样品的成员是相同的。

2. 权利要求1的方法，其中所述容器在同一整体排列中组合。

3. 权利要求1或2的方法，其中于高至50℃的温度实施步骤a.。

4. 权利要求1的方法，其中于介于70℃和90℃之间的温度实施步骤d.。

5. 权利要求1的方法，其中步骤f. 包括下列步骤：

i. 在至少两个反应容器中使纯化的核酸与包含具有逆转录酶活性的聚合酶的一种或多种扩增试剂接触，其中至少第一反应容器至少包含所述第一靶核酸，而至少第二反应容器至少包含所述第二靶核酸，且其中所述第二靶核酸不存在于所述第一反应容器中；

ii. 在所述反应容器中将所述纯化的核酸与所述一种或多种扩增试剂在一定的条件下一起温育一段时间，该条件和时间段适合于通过所述具有逆转录酶活性的聚合酶发生RNA转录；

iii. 在所述反应容器中将所述纯化的核酸与所述一种或多种扩增试剂在一定的条件下一起温育一段时间，该条件和时间段足以发生指示所述第一和第二靶核酸存在或缺乏的扩增反应，

其中步骤i. 至iii. 中用于转录和扩增的条件至少对于第一和第二靶核酸是相同的。

6. 磁性颗粒和裂解缓冲液在制备实施用于自多种不同类型的流体样品至少同时分离选自细菌、DNA病毒和RNA病毒的第一和第二靶核酸并测定其存在、不存在和/或量的方法的试剂盒中的用途，

其中所述第一靶核酸和所述第二靶核酸来自不同生物体，

其中所述第一或所述第二核酸是细菌核酸，

且其中所述第一靶核酸包含RNA，而所述第二靶核酸包含DNA，

所述方法包括下列自动化步骤：

a. 向所述多种不同类型的流体样品的成员添加相同的裂解缓冲液，其中所述裂解缓冲液具有介于5.5和6.5之间的pH且包含离液剂、缓冲物质、醇、和还原剂，并由此将核酸从其细胞和病毒环境中释放，其通过裂解所述多种不同类型的流体样品中潜在存在的细胞和病毒壳体来进行，并在与流体样品数目对应的数目的容器中将磁性颗粒和所述多种不同类型的流体样品在一定条件下组合在一起达一段时间，该条件和时间段足以允许包含所述靶核酸的核酸在所述磁性颗粒上固定化，

b. 在包含一个或多个磁体的分离站中将所述磁性颗粒自存在于所述流体样品中的其它物质分离，

c. 在分离站中纯化所述核酸，其通过将所述流体样品与所述磁性颗粒分开，并通过使用移液器将包含清洗缓冲液和磁性颗粒的悬浮液抽吸并分配一次或多次而将所述磁性颗粒用清洗缓冲液清洗一次或多次来进行，

d. 用洗脱缓冲液从所述磁性颗粒洗脱所述核酸，

e. 将纯化的核酸和任选地所述磁性颗粒转移至多种反应容器，

f. 扩增所述靶核酸，

其中物理条件和所述时间段对于所述多种不同类型的流体样品的成员是相同的。

7. 权利要求6的用途，其中所述容器在同一整体排列中组合。

8. 权利要求6或7的用途，其中于高至50℃的温度实施步骤a.。

9. 权利要求6的用途，其中于介于70℃和90℃之间的温度实施步骤d.。

10. 权利要求6的用途，其中步骤f. 包括下列步骤：

i. 在至少两个反应容器中使纯化的核酸与包含具有逆转录酶活性的聚合酶的一种或多种扩增试剂接触，其中至少第一反应容器至少包含所述第一靶核酸，而至少第二反应容器至少包含所述第二靶核酸，且其中所述第二靶核酸不存在于所述第一反应容器中；

ii. 在所述反应容器中将所述纯化的核酸与所述一种或多种扩增试剂在一定的条件下一起温育一段时间，该条件和时间段适合于通过所述具有逆转录酶活性的聚合酶发生RNA转录；

iii. 在所述反应容器中将所述纯化的核酸与所述一种或多种扩增试剂在一定的条件下一起温育一段时间，该条件和时间段足以发生指示所述第一和第二靶核酸存在或缺乏的扩增反应，

其中步骤i. 至iii. 中用于转录和扩增的条件至少对于第一和第二靶核酸是相同的。

11. 一种容许自多种不同类型的流体样品同时分离来自细菌、DNA病毒和RNA病毒的靶核酸并测定其存在、不存在和/或量的非诊断目的的方法，所述方法包括下列自动化步骤：

a. 向所述多种不同类型的流体样品的成员添加相同的裂解缓冲液，其中所述裂解缓冲液具有介于5.5和6.5之间的pH且包含离液剂、缓冲物质、醇、和还原剂，并由此将核酸从其细胞和病毒环境中释放，其通过裂解所述多种不同类型的流体样品中潜在存在的细胞和病毒壳体来进行，并在与流体样品数目对应的数目的容器中将磁性颗粒和所述多种不同类型的流体样品在一定条件下组合在一起达一段时间，该条件和时间段足以允许包含所述靶核

酸的核酸在所述磁性颗粒上固定化，

b. 在包含一个或多个磁体的分离站中将所述磁性颗粒自存在于所述流体样品中的其它物质分离，

c. 在分离站中纯化所述核酸，其通过将所述流体样品与所述磁性颗粒分开，并通过使用移液器将包含清洗缓冲液和磁性颗粒的悬浮液抽吸并分配一次或多次而将所述磁性颗粒用清洗缓冲液清洗一次或多次来进行，

d. 用洗脱缓冲液从所述磁性颗粒洗脱所述核酸，

e. 将纯化的核酸和任选地所述磁性颗粒转移至多种反应容器，

f. 扩增所述靶核酸，

其中物理条件和所述时间段对于所述多种不同类型的流体样品的成员是相同的。

12. 权利要求11的方法，其中所述容器在同一整体排列中组合。

13. 权利要求11或12的方法，其中于高至50℃的温度实施步骤a.。

14. 权利要求11的方法，其中于介于70℃和90℃之间的温度实施步骤d.。

15. 权利要求11的方法，其中步骤f. 包括下列步骤：

i. 在至少两个反应容器中使纯化的核酸与包含具有逆转录酶活性的聚合酶的一种或多种扩增试剂接触，其中至少第一反应容器至少包含第一靶核酸，而至少第二反应容器至少包含第二靶核酸，且其中所述第二靶核酸不存在于所述第一反应容器中；

ii. 在所述反应容器中将所述纯化的核酸与所述一种或多种扩增试剂在一定的条件下一起温育一段时间，该条件和时间段适合于通过所述具有逆转录酶活性的聚合酶发生RNA转录；

iii. 在所述反应容器中将所述纯化的核酸与所述一种或多种扩增试剂在一定的条件下一起温育一段时间，该条件和时间段足以发生指示所述第一和第二靶核酸存在或缺乏的扩增反应，

其中步骤i. 至iii. 中用于转录和扩增的条件至少对于第一和第二靶核酸是相同的。

16. 磁性颗粒和裂解缓冲液在制备实施容许自多种不同类型的流体样品同时分离来自细菌、DNA病毒和RNA病毒的靶核酸并测定其存在、不存在和/或量的方法的试剂盒中的用途，所述方法包括下列自动化步骤：

a. 向所述多种不同类型的流体样品的成员添加相同的裂解缓冲液，其中所述裂解缓冲液具有介于5.5和6.5之间的pH且包含离液剂、缓冲物质、醇、和还原剂，并由此将核酸从其细胞和病毒环境中释放，其通过裂解所述多种不同类型的流体样品中潜在存在的细胞和病毒壳体来进行，并在与流体样品数目对应的数目的容器中将磁性颗粒和所述多种不同类型的流体样品在一定条件下组合在一起达一段时间，该条件和时间段足以允许包含所述靶核酸的核酸在所述磁性颗粒上固定化，

b. 在包含一个或多个磁体的分离站中将所述磁性颗粒自存在于所述流体样品中的其它物质分离，

c. 在分离站中纯化所述核酸，其通过将所述流体样品与所述磁性颗粒分开，并通过使用移液器将包含清洗缓冲液和磁性颗粒的悬浮液抽吸并分配一次或多次而将所述磁性颗粒用清洗缓冲液清洗一次或多次来进行，

d. 用洗脱缓冲液从所述磁性颗粒洗脱所述核酸，

- e. 将纯化的核酸和任选地所述磁性颗粒转移至多种反应容器，
 - f. 扩增所述靶核酸，
- 其中物理条件和所述时间段对于所述多种不同类型的流体样品的成员是相同的。
17. 权利要求16的用途，其中所述容器在同一整体排列中组合。
18. 权利要求16或17的用途，其中于高至50℃的温度实施步骤a.。
19. 权利要求16的用途，其中于介于70℃和90℃之间的温度实施步骤d.。
20. 权利要求16的用途，其中步骤f. 包括下列步骤：
- i. 在至少两个反应容器中使纯化的核酸与包含具有逆转录酶活性的聚合酶的一种或多种扩增试剂接触，其中至少第一反应容器至少包含第一靶核酸，而至少第二反应容器至少包含第二靶核酸，且其中所述第二靶核酸不存在于所述第一反应容器中；
 - ii. 在所述反应容器中将所述纯化的核酸与所述一种或多种扩增试剂在一定的条件下一起温育一段时间，该条件和时间段适合于通过所述具有逆转录酶活性的聚合酶发生RNA转录；
 - iii. 在所述反应容器中将所述纯化的核酸与所述一种或多种扩增试剂在一定的条件下一起温育一段时间，该条件和时间段足以发生指示所述第一和第二靶核酸存在或缺乏的扩增反应，
- 其中步骤i. 至iii. 中用于转录和扩增的条件至少对于第一和第二靶核酸是相同的。
21. 实施例中使用的各种试剂及其用途。

通用样品制备

[0001] 本申请是申请日为2011年7月27日、中国申请号为201180035818.1、发明名称为“通用样品制备”的发明申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明属于体外诊断学领域。具体而言,在此领域内,其关注用于诊断 目的的核酸的样品制备。更精确地,本发明提供了一种用于自多种不同类型的 流体样品至少同时分离第一和第二靶核酸的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 自复杂的生物学混合物诸如例如临床样品分离生物学材料诸如核酸或 蛋白质具有相当大的意义,尤其对于诊断目的。

[0005] 核酸样品制备的诊断性应用的例子包含病毒诸如人乳头状瘤病毒 (HPV)、西尼罗病毒(WNV)的制备及随后的检测或针对人免疫缺陷病毒 (HIV)、乙肝病毒(HBV)和/或丙肝病毒(HCV)的存在的献血常规筛选。此外,所述扩增技术适用于细菌性靶物诸如分枝杆菌或沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)和淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*),或对肿瘤标志物的分析。

[0006] 本领域中已经开发出众多不同方法,例如,将样品中不期望的组分变性、沉淀并除去,随后沉淀并分离所讨论的分析物(例如基于醇的核酸沉淀)。另一种办法是将相应的生物学材料结合至固体支持材料,所述固体支持材料可以例如以层析柱形式提供。出于诊断目的,且尤其为了自动化分离随后进行中或高通量分析的生物学材料,经常使用结合颗粒。这类颗粒可以具有功能化表面,即它们经常用抗体、核酸捕捉探针等包被以结合期望的分析物。或者,它们可以具有未修饰的表面诸如特别用于核酸分离的玻璃表面。

[0007] 然而,出于诊断目的而有待分析的靶核酸可以存在于多种不同来源中。实际上,通常使用于不同来源中核酸的样品制备规程适合于:

[0008] 1. 流体样品的类型

[0009] 2. 核酸的类型。

[0010] 在从不同来源分离不同核酸时,也可能不得不考虑其它标准。现有技术 已经通过对所述不同类型的样品提供不同制备方法解决了此多样性。

[0011] 本发明提供了用于从多种不同类型的流体样品至少分离第一和第二靶 核酸的改良方法。

[0012] 发明描述

[0013] 本发明提供了一种用于从多种不同类型的流体样品至少同时分离第一 和第二靶核酸的方法。

[0014] 在第一个方面,本发明涉及一种用于从多种不同类型的流体样品至少同 时分离第一和第二靶核酸的方法,所述方法包括下列自动化步骤

[0015] a. 在与流体样品数目对应的数目的容器中将固体支持材料和所述多种 不同类型的流体样品在一定条件下组合在一起达一段时间,该条件和时间段 足以允许包含所述靶

核酸的核酸在所述固体支持材料上固定化，

[0016] b. 在分离站中将所述固体支持材料自存在于所述流体样品中的其它物质分离，

[0017] c. 在分离站中纯化所述核酸，其通过将所述流体样品与所述固体支持材料分开，并将所述固体支持材料用清洗缓冲液清洗一次或多次进行，

[0018] 其中物理条件和所述时间段对于所述多种不同类型的流体样品的成员是相同的。

[0019] 特别但不仅对于具有高样品通量的临床实验室，高度有利的是提供用于从多种不同类型的流体样品快速、简便且可靠地同时分离多种靶核酸的这类改良方法。

[0020] 包括上文提及的自动化步骤的方法展示出多种优点。

[0021] 首先，将依照本发明的样品制备规程与例如RNA逆转录和靶核酸扩增以自动化方式组合显著降低对手动干预的需要以及由此潜在的污染风险。

[0022] 此外，提供其中有多种不同样品，即不同核酸来源的单一方法的可能性显著促成降低核酸诊断的总体复杂性。如果例如不得不对每种类型的流体样品应用不同方法，就像现有技术中的情况那样，那么样品制备是复杂、耗时且资源密集得多的。通常，必须采用不同试剂，这导致成本增加，并且阻碍快速且不复杂的自动化解决办法的开发。

[0023] 依照本发明的样品制备展现出适合于处理含有不同类型核酸诸如例如DNA和RNA的多种不同样品类型的灵活性和工作流。

[0024] 不同来源，即样品类型包含所有种类的人体液，诸如例如血液、痰、鼻拭样、尿液、汗液或其它，等等。

[0025] 依照本发明的方法需要相当少的动手实践时间，并且测试的实施比现有技术中使用的样品制备方法简单得多。依照本发明的方法在例如临床病毒学领域中提供一项主要的优点，因为其允许平行实验中数种病毒的平行样品制备和优选地下游扩增。该方法特别可用于管理需要频繁的病毒监测的移植后患者。由此，依照本发明的方法促进节省成本的诊断学，并且促成抗病毒剂的使用和病毒性并发症以及住院的降低。这同样适用于临床微生物学领域。一般而言，效率会在更快的周转时间和改善的测试灵活性方面增加。因此，这导致做出诊断对患者要求的测试运行数目的降低和潜在更短的住院期（例如如果可以更快地提供诊断，那么需要抗微生物疗法的患者会更快地接受它，并且因此更早恢复）。另外，患者显示更小的发病率，并且因此引起更少的支持疗法（例如败血症诊断延迟相关的加强监护）相关成本。更快地提供阴性结果对于抗生素的开药过量可以具有重要的含意。例如，如果使用依照本发明的方法获得的测试结果能够比用标准样品制备方法，接着用例如实时PCR更快地排除病原体，那么就不会迫使临床医师使用经验抗生素。或者，如果使用经验抗生素，那么可以缩短相应治疗的持续时间。

[0026] 就设计一种包括用依照本发明的方法的样品制备的测定法而言，熟练技术人员会特别但不仅仅受益于下列优点：

[0027] • 软件复杂性的降低（导致编程错误的风险降低）

[0028] • 将测定法开发努力聚焦于化学优化而非化学以及仪器控制参数

[0029] • 可靠得多的系统，因为总是使用单一方法，并且可以最佳地设计硬件来实施此方案

[0030] • 给实施依照本发明方法的熟练技术人员提供作为同一过程的部分平行运行多

种不同分离的灵活性

[0031] • 成本降低。

[0032] 在本发明的意义中,核酸的“纯化”、“分离”或“提取”指如下的情况:可以在诊断测定法中例如通过扩增分析核酸前,通常必须从含有不同组分的复杂混合物的生物学样品中将它们纯化、分离或提取。对于第一步,可以使用允许核酸富集的方法。

[0033] 经常,要分析的核酸在所讨论的流体样品内的溶液中不是游离的,而是位于闭合结构诸如例如细胞或病毒内。在诊断用测定法中,目的经常是特别鉴定流体样品诸如临床样品中病原性细胞或病毒。这类病原体可以例如包含RNA病毒诸如例如人免疫缺陷病毒(HIV)、丙肝病毒(HCV)、西尼罗病毒(WNV)、人乳头状瘤病毒(HPV)、日本脑炎病毒(JEV)、圣路易斯(St.Louis)脑炎病毒(SLEV)和其它,或DNA病毒诸如例如乙肝病毒(HBC)、巨细胞病毒(CMV)和其它,或细菌诸如例如沙眼衣原体(CT)、淋病奈瑟氏球菌(NG)和其它。依照本发明的方法对于从上文提及的以及其它生物体中提取核酸是有用的。

[0034] 因此,本发明的一个优选的方面是上文描述的方法,其中步骤a.进一步包括将核酸从其细胞和/或病毒环境中释放,其通过裂解多种不同流体样品中潜在存在的细胞和/或病毒壳体进行。

[0035] 为了释放细胞或病毒颗粒的内容物,可以将它们用酶或化学药品处理以将细胞壁或病毒颗粒溶解、降解或变性。此过程通常被称为裂解。所得的含有这类裂解材料的溶液被称为溶胞物。

[0036] 适合于裂解细胞和/或病毒壳体或类似结构的试剂通常在裂解缓冲液内提供。因此,在本发明的一个优选的实施方案中,上文所描述的方法在步骤a.中进一步包括向多种不同流体样品添加裂解缓冲液。

[0037] 由于依照本发明的方法对于高通量、效率和并行化是特别有利的,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述裂解缓冲液对于所述多种不同类型的流体样品的成员是相同的。

[0038] 那样,样品制备规程的复杂性得到进一步降低,因为不必对要处理的不同样品单个提供不同裂解试剂。此外,该规程在用单一裂解缓冲液工作时可以更容易地控制。可以例如用多路移液管从单个容器中取出裂解缓冲液,随后同时分配到不同样品中。

[0039] 在本发明的一个优选的实施方案中,上文所描述的方法中的裂解缓冲液包含一种或多种选自下组的组分:

[0040] • 离液剂

[0041] • 缓冲物质

[0042] • 醇

[0043] • 还原剂。

[0044] 离液剂(其通常扰乱溶液中水分子的有序结构以及分子之中和之间的非共价结合力)可以对样品制备规程做出数种贡献。具体但不仅仅,它们可以通过扰乱核酸酶三级结构作为RNA酶抑制剂应用。通常,不必对裂解缓冲液应用另外的RNA酶抑制剂。除此之外,离液剂还促成对生物膜,诸如质膜或细胞器膜(若存在的话)的破坏。还有,它们可以在核酸对表面如玻璃的粘着结合中起重要的作用(见下文)。在本发明上下文中优选的离液剂是胍盐如硫氰酸胍或盐酸胍或氯化胍或异硫氰酸胍、尿素、过氯酸盐诸如例如过氯酸钾、

其它硫氰酸盐或碘化钾。特别优选的是硫氰酸胍。然而,在本发明的范围内 也可以使用其它离液剂。

[0045] 一般地,缓冲物质对于维持溶液中某个pH值或pH范围是重要的。这是 大多数生物学系统的先决条件,并且通常对于体外反应也是期望的。它对于 本发明的方法也可以是有利的。在本发明上下文中优选的缓冲液是柠檬酸盐 缓冲液诸如柠檬酸钠,而且还有Tris (三-(羟甲基)-氨基甲烷)缓冲液诸如Tris HCl、磷酸盐、N-(2-羟乙基)-哌嗪-N'-(2-乙磺酸) (HEPES)、乙酸盐缓冲液,而且也可以在本发明上下文中使用其它缓冲液。

[0046] 在用于核酸制备的裂解缓冲液中使用醇也可以是有利的,如本领域中技 术人员已知的。在本发明上下文中特别优选的是使用聚多卡醇(polidocanol), 而其它醇也可以在上文所描述的裂解缓冲液中使用。聚多卡醇用于制备核酸 的用途已经例如记载于EP 1 932 913中。

[0047] 还原剂也可以促成不期望的组分诸如上文提及的RNA酶A的变性。具体 地,如本领域中公知的还原剂切割对于许多蛋白质的三级结构特别重要的分 子间和分子内二硫键。在本发明上下文中优选的是还原剂诸如二硫苏糖醇 (DTT),但是也可以在本发明的上下文中有利地采用本领域中已知的其它还 原剂诸如例如2-巯基乙醇。

[0048] 由上述内容看来,本发明的一个优选方面是上文所描述的方法,其中所 述裂解缓冲液包含下列组分:

[0049] • 硫氰酸胍,

[0050] • 柠檬酸钠,

[0051] • 聚多卡醇,

[0052] • DTT。

[0053] 在本发明的一个更优选的实施方案中,上文提及的裂解缓冲液组分的浓 度如下:

[0054] • 硫氰酸胍:4M

[0055] • 柠檬酸钠:50mM

[0056] • 聚多卡醇:5%w/v

[0057] • DTT:2%w/v。

[0058] 上文所描述的裂解缓冲液的pH并不限于特定pH值。然而,在一个优选 的实施方案中,所述裂解缓冲液具有酸性pH,更优选地5.5-6.5,最优选地约 5.8的pH。

[0059] 在裂解过程中经常遇到的问题是降解感兴趣组分的其它酶,例如降解核 酸的脱氧核糖核酸酶或核糖核酸酶诸如上文提及的RNA酶在裂解规程过程 中与感兴趣的组分接触。这些降解酶也可以存在于细胞外部或在裂解前可能 已经在不同细胞区室中空间分隔。当裂解发生时,感兴趣的组分变得暴露于 所述降解酶。在此过程期间释放的其它组分可以例如是属于对细胞有毒的脂 多糖类家族的内毒素,并且可以对意图用在人或动物疗法中的 产品引起问 题。

[0060] 有多种手段来处理上文提及的问题。当意图释放核酸时,通常使用离液 剂(如上文所描述)或阴离子、阳离子、两性离子或非离子型去污剂。

[0061] 使用快速降解先前描述的酶或不期望的蛋白质的蛋白酶也是一种优点。然而,这 可能产生另一个问题,因为所述物质或酶能在随后步骤中干扰试剂 或组分。

[0062] 在上文提及的这类裂解或样品制备过程中优选使用的酶是如下的酶,其 切割蛋

白质底物中的酰胺连接,并且分类为蛋白酶,或(互换地)肽酶(参见 Walsh,1979, *Enzymatic Reaction Mechanisms*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 第3章)。现有技术中使用的蛋白酶包含碱性蛋白酶(WO 98/04730)或酸性蛋白酶(US 5,386,024)。在现有技术中已经在核酸分离中广泛用于样品制备的蛋白酶是来自白色念球菌(*Tritirachium album*)的蛋白酶K(参见例如 Sambrook J.等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989), 其中性pH左右是有活性的,并且属于本领域技术人员称为枯草杆菌蛋白酶的蛋白酶家族。在上文提及的裂解或样品制备方法中特别优选使用的是酶Esperase, 即一种在高碱度和于高温两者都保留其活性的强力的蛋白酶(EP 1 201 753)。

[0063] 在裂解步骤后的样品制备步骤中,进一步富集感兴趣的组分。如果感兴趣的非蛋白质性组分是例如核酸,那么通常在将它们在基于探针的测定法中使用前从复杂的裂解混合物提取它们。

[0064] 有数种用于核酸纯化的方法:

[0065] 序列依赖性的或生物特异性的方法如例如:

[0066] • 亲和层析

[0067] • 与固定化的探针杂交

[0068] 不依赖于序列的或物理化学的方法如例如:

[0069] • 用例如酚-氯仿进行的液体-液体萃取

[0070] • 用例如纯乙醇进行的沉淀

[0071] • 用滤纸进行的提取

[0072] • 用微团形成剂如鲸蜡基三甲基溴化铵进行的提取

[0073] • 结合固定化的嵌合染料,例如吡啶衍生物

[0074] • 吸附至硅胶或硅藻土(diatomaceous earth)

[0075] • 在离液序列高的(chotropic)条件下吸附至磁性玻璃颗粒(MGP)或有 机硅烷颗粒。

[0076] 对于纯化目的特别感兴趣的是将核酸吸附至玻璃表面,尽管其它表面也是有可能的。近年来已经提出了许多通过利用核酸对玻璃表面的结合行为用于将其从其天然环境中分离出来的规程。如果未修饰的核酸是靶物,那么优选将核酸直接结合至硅土表面的材料,因为核酸不必进行修饰,而且甚至可以结合天然核酸,等等。这些方法由多份文件详细地描述。例如,在Vogelstein B.等, *Proc. Natl. Acad. USA* 76 (1979) 615-9中,提出了一种用于将来自琼脂糖凝胶的核酸在存在碘化钠的情况下结合到磨砂火石玻璃的规程。在存在过氯酸钠的情况下在玻璃粉上自细菌纯化质粒DNA记载于Marko M.A.等, *Anal. Biochem.* 121 (1982) 382-387。在DE-A 37 34 442中,描述了在玻璃纤维滤器上分离单链M13噬菌体DNA,其通过使用乙酸将噬菌体颗粒沉淀,并用高氯酸盐裂解噬菌体颗粒来进行。清洗结合到玻璃纤维滤器的核酸,然后用含有甲醇的Tris/EDTA缓冲液洗脱。一种用于从λ噬菌体纯化DNA的类似规程记载于Jakobi R.等, *Anal. Biochem.* 175 (1988) 196-201。该规程需要使核酸在离液盐溶液中选择性结合玻璃表面以及将核酸与污染物诸如琼脂糖、蛋白质或细胞残留物分开。为了将玻璃颗粒与污染物分开,可以将该颗粒离心或者将流体抽过玻璃纤维滤器。然而,这是一个限制步骤,其阻止该规程用于加工大量样品。在通过

添加盐和乙醇进行沉淀后使用磁性颗粒来固定化核酸是更有利的,并且记载于例如 Alderton R.P.等,S.,Anal.Biochem.201(1992)166-169 和PCT GB 91/00212中。在此规程中,将核酸与磁性颗粒一起凝集。通过应用磁场并实施清洗步骤将凝集物与初始溶剂分开。在一个清洗步骤后,将核酸溶解于Tris缓冲液中。然而,此规程具有的缺点在于沉淀对于核酸不是选择性的。更确切地,也将多种固体和溶解的物质凝集。因此,不可以使用此规程来除去可能存在的、特定酶促反应的大量的任何抑制剂。磁性多孔玻璃也是商品化的,其在多孔特殊玻璃基质中含有磁性颗粒,并且用含有链霉亲和素的层覆盖。如果生物学材料例如蛋白质或核酸在复杂的制备步骤中修饰,从而它们共价结合生物素,那么可以使用此产品来分离它们。可磁化的特殊吸附剂证明为对于自动样品制备是非常有效且合适的。出于此目的,使用亚铁磁性和铁磁性以及超顺磁性(superparamagnetic)色素。最优选的磁性玻璃颗粒和使用它们的方法是那些记载于WO 01/37291中的。依照R.Boom等(J Clin Microbiol.28(1990),495-503)的方法特别可用于本发明上下文中的核酸分离。

[0077] 可以通过改编所述方法中使用的相应流体样品的体积来进一步改进依照本发明的方法的灵活性。此实施方案聚焦于不同类型的流体样品和可能地生物体及其内存在的核酸类型的多样性。例如,全血样品中的某些病毒可能比其它样品需要更多的起始材料(若已知在这些特定情况中通常仅存在低拷贝数)。

[0078] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述多种不同流体样品中的至少一种流体样品与其它流体样品具有不同的体积。

[0079] 或者/另外,还优选的是,向所述多种不同流体样品添加不同体积的裂解缓冲液。

[0080] 在又一个优选的实施方案中,当所述多种不同流体样品中的至少一种流体样品与其它流体样品具有不同体积时,向样品添加裂解缓冲液,使得所有样品在添加后具有相同体积。

[0081] 在此实施方案中,对不同样品同时实施自动化方法甚至是更方便的。在此办法中组合如下的优点,即能够根据样品类型来选择适当的起始体积及对于实施分离和任选地,例如扩增和检测具有相同体积。

[0082] 术语“固体支持材料”包含就核酸固定化而言的、上文提及的任何固体材料,例如磁性玻璃颗粒、玻璃纤维、玻璃纤维滤器、滤纸等,尽管固体支持材料并不限于这些材料。

[0083] 本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述固体支持材料包含核酸结合颗粒和核酸,所述核酸结合颗粒优选是一种或多种选自下组的材料:硅土、金属、金属氧化物、塑料、聚合物。在本发明的一个非常优选的实施方案中,所述固体支持材料是磁性玻璃颗粒。

[0084] “固定化”在本发明的上下文中意指以可逆或不可逆的方式捕捉对象诸如例如核酸。具体地,“在固体支持材料上固定化”意指出于将其与任何周围介质分开的目的,使一种或多种对象与固体支持材料结合,并且可以例如通过在后来的点时与固体支持材料分开来回收。在此上下文中,“固定化”可以例如包括将核酸吸附至玻璃或固体材料的其它合适的表面,如上文所描述的。此外,可以通过结合捕捉探针来特异性“固定化”核酸,其中核酸通过碱基配对而结合附着于固体支持物的、基本上互补的核酸。在后一种情况中,这类特异性固定化导致靶核酸的优势结合。

[0085] “同时”在本发明的意义中意味着同时且在相同物理条件下实施两种行为,诸如

扩增第一和第二或更多种核酸。在一个实施方案中,在一个容器中 实施至少第一和第二靶核酸的同时扩增。在另一个实施方案中,在一个容器 中用至少一种核酸而在第二容器中用至少第二种核酸同时且在相同物理条 件(特别就温度和温育时间而言)下实施同时扩增。

[0086] “第一靶核酸”和“第二靶核酸”是不同的核酸。

[0087] “流体样品”是可以进行靶向核酸的诊断用测定法的任何流体材料,并 且优选地,自生物学来源衍生。还优选地,流体样品自人衍生,并且是体液。在本发明的一个优选的实施方案中,流体样品是人血液、尿液、痰、汗液、拭样、可移液的粪、或脊髓液。最优选地,流体样品是人血液。

[0088] 术语“反应容器”包含但不限于,管或板诸如微孔、深孔或其它类型多 孔板的孔,其中发生用于分析流体样品的反应诸如例如逆转录或聚合酶链式 反应。这类容器的外部界限或壁是化学惰性的,使得它们不干扰之内发生的 分析反应。优选地,如上文所描述的核酸分离也在多孔板中实施。

[0089] 在此背景中,分析系统中的多孔板允许多种样品的平行分离和分析或贮 存。可以对多孔板优化最大液体摄取,或得到最大热转移。用于本发明上下 文中的优选的多孔板是经过优化的,以在自动化分析仪中温育或分离分析 物。优选地,多孔板构建并排列为接触磁性装置和/或加热装置。

[0090] 所述优选的多孔板(可互换地,其在本发明的上下文中称作“加工板”), 包含:

[0091] -包含成行排列的、顶部有开口的多个容器的顶部表面。容器包含上部 部分、中心部分和底部部分。上部部分与多孔板的顶部表面连接,并且包含 两个较长侧和两个较短侧。中心部分具有实质上矩形的横截面,其具有两个 较长侧和两个较短侧;

[0092] -两个相向的较短的和两个相向的较长的侧壁,和

[0093] -基部,其中所述基部包含开口,该开口构建并排列为将多孔板置于与 所述磁性装置和/或加热装置的接触中。

[0094] 在多孔板的一个优选的实施方案中,一行内相邻的容器在所述几乎矩形 形状的较长侧上连接。

[0095] 优选地,多孔板包含位于容器的相邻行间的连续空间。所述连续空间构 建并排列为容纳板形状的磁性装置。在一个优选的实施方案中,容器的底部 部分包含球形底部。在一个更优选的实施方案中,容器的底部部分包含位于 所述中心部分和所述球形底部之间的圆锥部分。

[0096] 在一个优选的实施方案中,所述顶部表面包含圆拱(rib),其中所述圆拱 围绕所述容器的开口。优选地,容器的所述上部部分的一个较短侧包含凹口 (recess),所述凹口 包含从圆拱延伸到该容器内侧的弯曲表面。

[0097] 此外,在一个优选的实施方案中,所述容器包含圆形内侧形状。

[0098] 为了固定到加工或温育站,优选地,基部包含含有凹口的边缘。分析仪 站上的闩锁夹(latch clip)可以衔接所述凹口以将板固定在站上。

[0099] 在一个优选的实施方案中,所述容器包含基本上恒定的壁厚度。

[0100] 在本发明上下文中优选的加工板(101)是1组件板。其顶部表面(110)包含 多个容器(103)(图5、图6)。每个容器在顶部具有开口(108),并且在底部端(112) 是闭合的。顶部表面(110)包含圆拱(104),优选地,其相对于顶部表面(110) 是升高的,并且围绕容器

(103)的开口(108)。这防止可能落到板(101)的顶部表面(110)上的液滴污染容器(103)的内容物。在图3至8中显示了优选的加工板的视图。

[0101] 优选地,加工板(101)的足迹包含对应于ANSI SBS足迹形式的基部长度和宽度。更优选地,长度为 $127.76\text{mm} \pm 0.25\text{mm}$,而宽度为 $85.48\text{mm} \pm 0.25\text{mm}$ 。因此,该板(101)具有两个相向的较短的侧壁(109)和两个相向的较长的侧壁(118)。加工板(101)包含用于与输送装置(handler)(500,图12)相互作用的形式锁定元件(106)。可以将加工板(101)在维持正确取向和位置的情况中以高速快速且安全地夹紧、转运并定位。优选地,用于夹紧的形式锁定元件(106)位于加工板(101)的上部中心部分,优选地,上部中心的三分之一内。这具有的优点在于加工板(101)的潜在扭曲对形式锁定元件(106)只具有较小的影响,而且板(101)的操作更强力。

[0102] 优选地,加工板(101)包含硬件标识符(102)和(115)。硬件标识符(102)和(115)是加工板(101)独特的,并且不同于同一系统中使用的其它消耗品的硬件标识符。优选地,硬件标识符(102、115)在该消耗品侧壁上包含隆起部(ridge)(119)和/或凹口(125),其中所述隆起部(119)和/或凹口(125)的模式对于特定的消耗品类型,优选地加工板(101)是独特的。此独特模式在本文中也称为独特的“表面几何学”。硬件标识符(102、115)确保用户仅可以将加工板(101)以正确的取向加载到分析用仪器的适当堆垛机(stacker)位置中。在加工板(101)的侧面,包含导向元件(116)和(117)(图3、图4)。它们防止加工板(101)倾斜。导向元件(116、117)允许用户将具有导向元件(116、117)的加工板(101)作为堆垛(stack)加载到分析用仪器中,然后将其在不使板倾斜的情况中在堆垛机中在该仪器内垂直转移。

[0103] 容器(103)的中心部分(120)具有几乎为矩形的横截面(图6、图7)。它们沿着几乎为矩形形状的较长侧(118)以共用壁(113)分隔(图3)。由此形成的容器(103)行具有的优点在于尽管可用的空间有限,但是它们具有大体积,优选地为4mL的体积。另一个优点在于由于基本上恒定的壁厚度,生产是非常经济的。进一步的优点在于容器(103)彼此加强,并且因此可以获得形状的高稳定性。

[0104] 连续空间(121)位于容器(103)行之间(图6、图7)。该空间(121)可以容纳磁体(202、203)或加热装置(128)(图11)。优选地,这些磁体(202、203)和加热装置(128)是固体装置。因此,可以将容器(103)中可容纳的液体(215)中包含的磁性颗粒(216)从该液体(215)分离,其通过在使磁体(202、203)接近容器(103)时对容器(103)施加磁场来实现。或者,在将加工板(101)置于加热装置(128)上时,可以以升高的、受控的温度温育容器(103)的内容物。由于磁体(202、203)或加热装置(128)可以是固体,因此可以实现高能量密度。容器(103)的中心部分(120)的几乎矩形的形状(图10)还通过优化容器(103)和磁体(202)或加热装置(128)之间的接触表面,并且因此增强能量转移入容器(103)中来优化容器壁(109)和扁平形状的磁体(202)或加热装置(128)之间的接触。

[0105] 在容器的圆锥底部(111)的区域中,空间(121)甚至更为明显,并且可以容纳更多磁体(203)。容器的上部区域中大磁体(202)和圆锥区域中较小磁体(203)的组合允许较大或小体积液体(215)中磁性颗粒(216)的分离。因此,小磁体(203)使得在洗脱物移液过程中扣留磁性颗粒(216)更简单。这使得通过减少磁性颗粒(216)沉淀物的死体积来以最小的损失移液洗脱物成为可能。此外,使转移的洗脱物中磁性颗粒(216)的存在最小化。

[0106] 在容器(103)的上部端,容器(103)的较短侧壁(109)之一包含延伸至圆周圆拱(104)的试剂入口通道(105)(图3、4、7)。将试剂移液至试剂入口通道(105)上,并且从通道(105)排入容器(103)中。因此,防止移液管针或尖端(3、4)和容器中含有的液体之间的接触。此外,防止源自将液体直接分配入容器(103)中含有的另一种液体(215)中的喷溅,其可能引起移液管针或尖端(3、4)或相邻容器(103)的污染。将小体积试剂,随后为最大体积的另一种试剂连续移液入试剂入口通道(105)上确保将仅以少量添加的试剂完全排入容器(103)中。因此,移液小体积的试剂在不损失要实施的测试的准确度的情况中是可能的。

[0107] 在内侧,在容器底部(111、112),形状变成圆锥形(111),并且以球形底部(112)为末端(图6、图7)。容器的内侧形状(114)(包括矩形中心部分(120))是圆形的。球形底部(112)、圆形内侧形状(114)、圆锥形部分(111)和容器(103)的精细表面的组合产生有利的流体学,其促进加工板(101)中分析物的有效分离和纯化。球形底部(112)允许分离洗脱物的基本上完全使用和死体积的降低,这减少试剂遗留物或样品交叉污染。

[0108] 加工板(101)的基部(129)上的边缘包含用于衔接加工站(201)或加热装置(128)或分析用仪器(126)上的闩锁夹(124)的凹口(107)(图5、图9)。闩锁夹(124)与凹口(107)的衔接允许加工板(101)在加工站(201)上的定位和固定。凹口(107)的存在允许闩锁力几乎与基部(129)垂直地对加工板(101)起作用。因此,仅可以发生横向起作用的小力。这降低应变的发生以及如此加工板(101)的变形。垂直闩锁力也可以中和加工板(101)的任何变形,从而导致加工站(201)内球形底部(111)的更精确定位。一般地,加工板(101)和分析仪内加工站(201)或加热装置(128)之间的精确界面减少死体积,而且还降低样品交叉污染的风险。

[0109] “分离站”是分析用系统中允许固体支持材料自流体样品中存在的其它材料分离的一种装置或组件。这类分离站可以例如包括但不限于离心机、过滤管架、磁体、或其它合适的组件。在本发明的一个优选的实施方案中,分离站包含一个或多个磁体。优选地,使用一个或多个磁体来分离作为固体支持物的磁性颗粒,优选地,磁性玻璃颗粒。如果例如流体样品和固体支持材料在多孔板的孔中组合在一起,那么分离站包含的一个或多个磁体可以例如通过将磁体引入孔中来与流体样品自身接触,或者可以使所述一个或多个磁体靠近孔的外壁以吸引磁性颗粒,随后将它们与周围液体分开。

[0110] 在一个优选的实施方案中,分离站是包含多孔板的装置,所述多孔板包含具有多孔板顶部表面处开口和闭合底部的容器。该容器包含上部部分、中心部分和底部部分,其中所述上部部分与多孔板的顶部表面连接,并且优选地,包含两个较长侧和两个较短侧。中心部分具有含两个较长侧的实质上矩形的横截面,其中所述容器成行排列。连续空间位于两个相邻行间以使夹具(fixture)上安放的至少一个磁体与处于至少两个Z位置的侧壁选择性接触。该装置进一步包含磁性分离站,该磁性分离站包含至少一个夹具。夹具包含至少一个产生磁场的磁体。存在移动机械,其相对于多孔板的容器至少在第一和第二位置之间垂直移动包含至少一个磁体的所述至少一个夹具。优选地,容器的所述至少两个Z位置包含所述容器的侧壁和底部部分。优选地,所述至少一个磁体的磁场在所述至少一个磁体处于所述第一位置时将磁性颗粒拉到容器与所述至少一个磁体相邻的内表面。所述磁场的效应在所述至少一个磁体处于所述第二位置时小于在所述至少一个磁体处于所述

第一位置时。优选地,包含所述至少一个磁体的夹具包含框。容器具有优选的特征,如上文在多孔板/加工板的背景中描述的。一种这类优选特征是所述容器的至少一部分具有与所述容器的轴成直角的实质上矩形的横截面。

[0111] 在所述第一位置中,所述至少一个磁体与所述容器的所述部分相邻。相邻理解为意指极其接近从而对容器的内容物施加磁场,或者与容器有物理接触。

[0112] 分离站包含接受多孔板的框和附着多孔板的闩锁夹。优选地,分离站包含两类磁体。下文进一步描述了此优选的实施方案。

[0113] 下文描述了第二个优选的实施方案,其包含对包含磁体的框施加压力,使得磁体相对于多孔板的容器挤压的弹簧。

[0114] 优选地,第一磁体构建并排列为与多孔板的容器相互作用以对所述容器中容纳的包含磁性颗粒的大体积液体施加磁场。优选地,所述第二磁体构建并排列为与多孔板的容器相互作用以对所述容器中容纳的包含磁性颗粒的小体积液体施加磁场。所述第一和第二磁体可以移动到不同的Z位置。

[0115] 此外,分离和纯化核酸的方法在本发明的上下文和所述分离站中是有用的。该方法包括使核酸在多孔板的容器中与磁性颗粒结合的步骤。所述容器包含上部开口、中心部分和底部部分。然后,当液体的主要部分位于容器中圆锥部分以具有矩形形状的中心部分替换的截面之上时,如下将结合的材料与液体中含有的未结合的材料分开,即将磁体从第二位置移动到第一位置,并且在所述第一位置中,对中心部分应用磁场,以及任选地,对所述容器的底部部分另外应用磁场。任选地,可以用清洗溶液清洗磁性颗粒。通过对所述容器的底部部分选择性应用磁场自所述磁性颗粒分离小体积的液体,其中液体的主要部分位于容器中圆锥部分以具有矩形形状的中心部分替换的截面之下。

[0116] 用于分离与磁性颗粒结合的核酸的磁性分离站在本发明的上下文中也 是有用的,所述分离站包含第一磁体和第二磁体,所述第一磁体构建并排列为与多孔板的容器相互作用以对所述容器中容纳的包含磁性颗粒的大体积液体施加磁场,所述第二种磁体构建并排列为与多孔板的容器相互作用以对所述容器中容纳的包含磁性颗粒的小体积液体施加磁场,且其中所述第一和第二磁体可以移动到不同的Z位置。在本文中描述了磁性分离站的优选实施方案。

[0117] 下文描述了对本发明有用的分离站(201)的第一个优选的实施方案。所述分离站(201)的第一个优选的实施方案包含至少两类磁体(202、203)。第一长型磁体(202)构建并排列为适合于加工板(101)的空间(121)。如此,磁体(202)对容器(103)中的液体(215)施加磁场以扣留容器壁内侧的磁性颗粒(216)。当存在大体积液体(215)时,这允许磁性颗粒(216)和任何与其结合的材料与容器(103)内侧的液体(215)分离。磁体(202)具有伸长的结构,并且构建并排列为与容器的基本上矩形的中心部分(120)相互作用。因此,当液体(215)的主要部分位于容器(103)中圆锥部分(111)以具有矩形形状的中心部分(120)替换的截面之上时使用磁体(202)。如图10中显示的,磁体(202)的优选构造包含夹具(204、204a),该夹具包含适合于加工板(101)中容器(103)行之间的空间(121)的磁体(202)。磁体(202)的另一种优选的实施方案包含排列在夹具(204、204a)上的磁体(202)。优选的分离站(201)的磁体(203)较小,并且可以与容器(103)的圆锥部分(111)相互作用。这在图10中显示。优选地,磁体(203)在基部(205)上排列,所述基部可以移动到加工板(101)的空间

(121)中。优选地,每个磁体(202、203)构建为与两个相邻行中的两个容器(103)相互作用。在一个优选的实施方案中,所述加工板(101)具有每行8个容器(103)的6行。可以与优选的加工板(101)相互作用的分离站(201)具有3个包含磁体(202)的夹具(204、204a)和4个包含磁体(203)的基部(205)。还包括一种如下的实施方案,其中所述分离站具有4个包含磁体(202)的磁性夹具(204、204a)和3个包含磁体(203)的磁性基部(205)。

[0118] 所述磁体(202、203)是可移动的。所述分离站(201)包含移动夹具(204、204a)和基部(205)的机械。所有夹具(204、204a)通过基部(217)相互连接,并且因此协调移动。所有磁体(203)与一个基部(218)连接,并且因此协调移动。用于移动磁性板(202)和(203)的机械构建并排列为将两类磁性板(202、203)移动至总共4个末端位置:

[0119] 在图10小图a-c中,所述磁体(203)位于加工板(101)的容器(103)的圆锥部分附近。这是磁体(203)的最高位置,并且是分离位置。在此图中,所述磁体(202)位于最低位置。当它们在此位置时它们不牵涉分离。

[0120] 在图10中显示的优选实施方案中,磁体(202)的基部(217)与定位轮(206)连接。该基部(217)包含通过移动元件(209)与连接元件(208)柔性接触的底部末端(207)。所述移动元件构建并排列为将连接元件(208)沿着轨道(212)从一侧移动到另一侧。所述移动元件(209)用销(220)固定到连接元件(208)。所述连接元件(208)通过螺钉(210)固定到定位轮(206)。连接元件(208)也与轴(211)连接。优选地,所述连接元件(208)是矩形板。当定位轮(206)绕着轴(211)偏心移动,使得螺钉(210)从高于偏心轴的点移动到低于偏心轴的点时,使移动元件(209)和附着有磁体(202)的基部(204)的底部末端(207)从最高位置移动到最低位置。基部(218)在底部部分(219)上安放,并且在其较低末端用销(213)与移动元件(214)连接,优选地,所述移动元件是轮,其与定位轮(206)相互作用。当定位轮(206)绕轴(211)旋转时,轮(214)沿着定位轮(206)移动。如果轮(214)位于定位轮(206)中离轴(211)的距离较短的截面上,那么磁体(203)处于其最低位置。如果轮(214)位于定位轮(206)中离轴(211)的距离最大的截面上时,磁体(203)处于其最高位置。因此,在分离站的第一个实施方案的优选实施方案中,磁体(203)的位置受定位轮(206)形状控制。当移动元件(209)沿着轨道(212)的中心、圆形的上部或下部部分(212a)移动时,小型磁体(203)上下移动。当移动元件(209)位于底部末端(207)的侧面(212b)并且向上或向下移动时,磁体(202)向上或向下移动。定位轮可以由任何电动机(224)旋转。

[0121] 在一个优选的实施方案中,弹簧(225)附着于分离站的基部(222)和磁体(203)的基部(218)以确保磁体(203)在其向下移动时移动到最低位置中。

[0122] 如本文中使用的,术语“销”指任何固定元件,包括螺钉或销。

[0123] 在第二个优选的实施方案中,所述分离站(230)包含至少一个夹具(231),该夹具包含至少一个磁体(232),优选地,与行(123)中的容器(103)数目相等数目的磁体。优选地,所述分离站(230)包含与上文中描述的多孔板(101)的行(123)数目相等数目的夹具(231)。更优选地,6个夹具(231)在分离站(230)上安放。至少一个磁体(232)在一个夹具(231)上安放。优选地,磁体(232)数目等于一行(123)中容器(103)的数目。最优选地,8个磁体(232)在一个夹具上(231)安放。优选地,在所述夹具(231)上包含一类磁体(232)。更优选地,磁体(232)在朝向与磁体相互作用的容器取向的一侧安放。

[0124] 夹具(231)在基部(233)上安放。优选地,所述安放是柔性的。基部(233)包含安放

于其上的弹簧(234)。弹簧(234)的数目是所述基部(233)上安放的每个夹具(231)至少一个弹簧。该基部进一步包含斜面(236),其限制弹簧及因此包含磁体(232)的夹具(231)的移动。优选地,任一个所述弹簧(234)构建并排列为与夹具(231)相互作用。更优选地,所述弹簧(234)是轭式弹簧(yoke spring)。所述相互作用控制夹具(231)的水平移动。此外,分离站(230)包含框(235)。具有夹具(231)的基部(233)通过移动机械与框(235)连接,如在上文中对第一个实施方案的磁体(232)描述的。

[0125] 优选地,所述基部(233)和夹具(231)构建并排列为(以Z方向)垂直移动。

[0126] 将上文中描述的多孔板(101)插入在分离站(230)中。垂直移动包含磁体(232)的夹具(231)。如此,将任一个夹具(232)移动到容器(103)的两行(123)之间的空间(121)中。垂直移动使安放在夹具(231)上的磁体(232)与容器(103)接触。根据容器(103)内侧的液体(215)体积选择Z位置。对于大体积,磁体(232)在中心位置(120)中接触容器(103),在那里容器(103)具有近似矩形形状。对于小体积液体(215)(其中液体(215)的主要部分位于容器(103)的中心部分(120)下),优选地,磁体(232)接触容器(103)的圆锥部分(111)。

[0127] 弹簧附着于任一个框(231)的基部(233)(图9小图a、b)。该弹簧使磁体(232)挤压容器(103)。这确保在磁性分离过程中磁体(232)和容器(103)之间的接触。优选地,磁体(232)在位于入口(105)下面的侧壁(109)上接触容器(103)。这具有的优点在于,通过移液添加的液体流过扣留的磁性颗粒,并且确保将颗粒重悬浮,而且相同处理所有容器中的所有样品。

[0128] 此实施方案特别适合于在所述多孔板(101)的容器(103)中含有不同水平的液体(215)时将如上文描述的多孔板(101)中包含的液体(215)与磁性颗粒(216)分开。

[0129] “清洗缓冲液”是设计为除去不期望的组分(尤其在纯化规程中)的流体。这类缓冲液是本领域中公知的。在核酸纯化背景中,清洗缓冲液适于清洗固体支持材料以将固定化的核酸与任何不期望的组分分开。所述清洗缓冲液可以例如在如上文所描述的具有酸性pH且没有乙醇和/或离液剂的一种或多种缓冲溶液中含有乙醇和/或离液剂。清洗溶液或其它溶液经常以储备溶液提供,所述储备溶液在使用前必须稀释。

[0130] 依照本发明的方法中的清洗需要将固体支持材料及其上固定化的核酸与清洗缓冲液进行程度不同的强烈接触。不同方法有可能实现这点,例如在相应的一个或多个容器或与相应的一个或多个容器一起摇动清洗缓冲液及固体支持材料。另一种有利的方法是将包含清洗缓冲液和固体支持材料的悬浮液抽吸并分配一次或多次。优选地,使用移液管实施此方法,其中优选地,所述移液管包含抽吸所述悬浮液并将其再次分配的一次性移液管尖端。这类移液管尖端在弃去和替换前可以使用数次。优选地,对本发明有用的一次性移液管尖端具有至少10 μ l,更优选地,至少15 μ l,更优选地,至少100 μ l,更优选地,至少500 μ l,更优选地,至少1ml,甚至更优选地,约1ml的体积。在本发明的上下文中使用的移液管也可以是移液针。

[0131] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中步骤c.中的所述清洗包含抽吸和分配包含固体支持材料的清洗缓冲液。

[0132] 为了易于操作并促进自动化,优选的是将上文提及的容器在整体排列中组合,因此可以一起操作它们。

[0133] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述容器在整体排列

中组合。

[0134] 整体排列可以例如是可逆或不可逆地彼此附着或排列在架中的管形瓶或管。优选地,所述整体排列是多孔板。更优选地,所述多孔板是深孔板。

[0135] 依照本发明的方法在要制备不同类型的核酸时是特别有用的,因为提供单一工作流和相同试剂消除由于其不同特性而以单独方式分离不同类型的核酸,如DNA和RNA的需要。

[0136] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述第一靶核酸包含RNA,而所述第二靶核酸包含DNA。

[0137] 此外,多种不同流体样品可以包含不同生物体或者自不同生物体衍生。然后,用相同工作流和试剂同时产生相应的核酸也是有利的。例如,本发明允许细菌、DNA病毒和RNA病毒核酸的这类同时制备,尽管它们有不同的结构和特性。

[0138] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述第一靶核酸和第二靶核酸来自不同生物体。

[0139] 本发明的另一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述第一和/或第二核酸是非病毒性核酸。

[0140] 还有,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述第一和/或第二靶核酸是细菌核酸。

[0141] 如本文中使用的,“生物体”意指任何活的单细胞或多细胞生命形态。在本发明的上下文中,病毒是一种生物体。

[0142] 本发明在不同核酸要来自多种不同类型的流体样品时也是有用的。如此,可以在相同物理条件下在平行同时提取中分离不同核酸,然后,可以例如在不同容器中进一步分析性加工。

[0143] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述第一核酸存在于第一流体样品中,而所述第二核酸存在于第二流体样品中。

[0144] 此类实施方案在所述不同核酸彼此不接触并且可以分开加工时是特别有用的。因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述第二靶核酸不存在于第一流体样品中。

[0145] 然而,不同核酸也可以存在于相同样品内,但是不必必须将它们都在分离后进一步加工。本发明在这些情况中也是有用的。

[0146] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述第二核酸也存在于第一流体样品中。

[0147] 在下游加工的情况中(特别在使用诊断技术诸如核酸扩增方法时),经常期望或甚至需要包括一种或多种对照核酸。这样,可以在将对照添加至纯化的核酸时控制分析反应,或者也可以在核酸提取前或期间添加对照时监测样品制备。包括两类对照也是常见且优选的。

[0148] 在此方面,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中在任何步骤对流体样品和/或纯化的核酸添加对照核酸。

[0149] 对于将核酸结合至固体支持材料,以及裂解细胞和病毒(若可应用的话),证明了于高至50℃的温度温育是有利的。

[0150] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中步骤a.于高至50℃的温度,优选地,35℃-45℃的温度,更优选地,于40℃的温度实施。

[0151] 对于分离的核酸的下游加工,例如将它们进行扩增前将它们与固体支持材料分开可以是有利的。

[0152] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述方法在步骤c.后进一步包括下列步骤:

[0153] d.用洗脱缓冲液将核酸自固体支持材料洗脱。

[0154] 在本发明的上下文中“洗脱缓冲液”是适合于将核酸与固体支持物分开的液体。这类液体可以是例如蒸馏水或水性盐溶液,诸如例如Tris缓冲液如 Tris HCl、或HEPES、或熟练技术人员已知的其它合适的缓冲液。优选地,这类洗脱缓冲液的pH值是碱性或中性的。所述洗脱缓冲液可以进一步含有组分诸如例如螯合剂如EDTA,其通过使降解酶失活来稳定化分离的核酸。

[0155] 优选地,于升高的温度实施洗脱,使得本发明的一个优选的实施方案是上文所描述的方法,其中于70℃-90℃的温度,更优选地,于80℃的温度实施步骤d.。

[0156] 如上文提及的,经常期望分析通过上文所描述的方法分离的核酸。为此,增加用于分析的起始材料的量可以是有利的。

[0157] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述方法在步骤c.后或步骤d.后进一步包括下列步骤:

[0158] e.将纯化的核酸和任选地所述固体支持材料转移到多个反应容器,

[0159] f.扩增靶核酸。

[0160] 在此背景中,特别有利的是,采用允许在相同物理条件下并使用相同试剂在两个或更多个反应容器中同时扩增和检测多种不同核酸的扩增和检测方法。这类技术与上文公开的快速且有效的样品制备的组合对于提供例如整合自动化解决办法(其中对含有不同核酸的多种不同类型的样品实施相同工作流)可以是非常有利的。可以平行加工这些样品以同时分离它们含有的不同核酸,然后,也可以以同时方式实施对所述分离的不同核酸的分析。这类办法的组合显著降低这类实验的复杂性和获得结果的时间,这具有相当大的优点,尤其对于临床背景中的诊断实验室而言。

[0161] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中步骤f.包括下列步骤:

[0162] i.在至少两个反应容器中使纯化的核酸与包含具有逆转录酶活性的聚合酶的一种或多种扩增试剂接触,其中至少第一反应容器至少包含所述第一靶核酸,而至少第二反应容器至少包含所述第二靶核酸,且其中所述第二靶核酸不存在于所述第一反应容器中;

[0163] ii.在所述反应容器中将所述纯化的核酸与所述一种或多种扩增试剂在一定的条件下一起温育一段时间,该条件和时间段适合于通过所述具有逆转录酶活性的聚合酶发生RNA转录;

[0164] iii.在所述反应容器中将所述纯化的核酸和所述一种或多种扩增试剂在一定的条件下一起温育一段时间,该条件和时间段足以发生指示所述第一和第二靶核酸的存在或缺乏的扩增反应,

[0165] 其中在步骤i.至iii.中用于转录和扩增的条件至少对于第一和第二靶核酸是相

同的。

[0166] 对于扩增规程,在现有技术中的一项挑战是,在单个反应容器中实施的多重测定法中的不同靶核酸数目受限于合适标记物的数目。例如在实时PCR测定法中,荧光染料光谱的潜在重叠对于测定法性能(假阳性结果的风险、较低的精确性,等等)具有很大的影响。因此,相应的荧光团必须经过仔细选择,并且在光谱上良好地分开,从而确保诊断测试的期望性能。典型地,不同可用荧光团的数目对应于PCR仪荧光通道的单数位数目。

[0167] 相比之下,在上文所描述的方法中,在至少两个不同的反应容器中发生至少第一和第二靶核酸的扩增,从而允许较高数目的不同靶核酸的同时扩增,因为不同反应容器中的信号可以彼此独立地检出。如下的实施方案仍然在本发明的范围内,其中在多个反应容器的一个或多个中实施多重反应,从而成倍增加可以同时且在相同条件下扩增的靶物数目。

[0168] 在本发明的上下文中,“扩增试剂”是使核酸能够扩增的化学或生物化学成分。这类试剂包含但不限于核酸聚合酶、缓冲液、单核苷酸诸如三磷酸核苷、寡核苷酸例如寡核苷酸引物、盐及其相应的溶液、检测探针、染料,等等。

[0169] 如本领域中已知的,“核苷”是碱基-糖组合。核苷的碱基部分通常是杂环碱基。两类最常见的这类杂环碱基是嘌呤和嘧啶。

[0170] “核苷酸”是进一步包含与核苷的糖部分共价连接的磷酸根基团的核苷。对于那些包含呋喃戊糖基糖的核苷,磷酸根基团可以与糖的2'-、3'-或5'-羟基模块连接。核苷酸是“寡核苷酸”(其可以更一般地称为“寡聚化合物”),或“多核苷酸”(更一般称为“多聚化合物”)的单体单元。前述物质的另一种一般表述是脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。

[0171] 依照本发明,“寡聚化合物”是由“单体单元”组成的化合物,所述“单体单元”可以是单独的核苷酸或单独的非天然化合物(见下文),更特别地是经修饰的核苷酸(或核苷酸类似物)或非核苷酸化合物,或其组合。

[0172] “寡核苷酸”和“经修饰的寡核苷酸”(或“寡核苷酸类似物”)是寡聚化合物的亚组。在本发明的背景中,术语“寡核苷酸”指自多个作为其单体单元的核苷酸形成的组分。磷酸根基团通常称为形成寡核苷酸的核苷间主链。RNA和DNA的正常连接或主链是3'至5'磷酸二酯连接。可以合成对本发明有用的寡核苷酸和经修饰的寡核苷酸(见下文),如主要在本领域中描述的且本领域中熟练人员已知的。用于制备特定序列的寡聚化合物的方法是本领域中已知的,并且包括例如合适序列的克隆和限制以及直接化学合成。化学合成方法可以包括例如由Narang S.A.等,Methods in Enzymology 68(1979) 90-98描述的磷酸三酯方法、由Brown E.L.等,Methods in Enzymology 68(1979) 109-151披露的磷酸二酯方法、在Beaucage等,Tetrahedron Letters 22(1981) 1859中披露的亚磷酰胺方法、在Garegg等,Chem.Scr.25(1985) 280-282中披露的H-膦酸盐方法以及在US 4,458,066中披露的固体支持物方法。

[0173] 在依照本发明的方法中,寡核苷酸可以经过化学修饰,即引物和/或探针包含经修饰的核苷酸或非核苷酸化合物。因而,探针或引物是经修饰的寡核苷酸。

[0174] “经修饰的核苷酸”(或“核苷酸类似物”)与天然核苷酸相差一些修饰,但是仍然由碱基、呋喃戊糖基糖、磷酸根部分、碱基样、呋喃戊糖基糖样和磷酸根样部分或其组合组成。例如,可以将标记物附着于核苷酸的碱基部分,由此获得经修饰的核苷酸。核苷酸中的

天然碱基也可以用例如7-脱氮嘌呤替换,由此也获得经修饰的核苷酸。

[0175] “经修饰的寡核苷酸”(或“寡核苷酸类似物”),属于另一特定亚组的寡聚化合物,拥有一种或多种核苷酸和一种或多种经修饰的核苷酸作为单体单元。因此,术语“经修饰的寡核苷酸”(或“寡核苷酸类似物”)指以与寡核苷酸基本上相似的方式发挥功能的结构,并且在本发明的背景中可以互换使用。从合成观点来看,可以例如通过对磷酸根主链、核糖单元或核苷酸碱基的适当修饰通过化学修饰寡核苷酸来生成经修饰的寡核苷酸(或寡核苷酸类似物)(Uhlmann和Peyman,Chemical Reviews 90(1990)543;Verma S.和Eckstein F.,Annu.Rev.Biochem.67(1998)99-134)。代表性修饰包括用硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸甲酯、磷酸三酯或氨基磷酸酯核苷间连接替换磷酸二酯核苷间连接;用脱氮或氮杂嘌呤和嘧啶替换天然的嘌呤和嘧啶碱基,在第5位或第6位具有取代基基团的嘧啶碱基;在第2位、第6位或第8位或第7位(如7-脱氮嘌呤)具有改变的取代基基团的嘌呤碱基;携带烷基、烯基、炔基或芳基模块,例如低级烷基基团诸如甲基、乙基、丙基、丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基,或芳基基团如苯基、苄基、萘基的碱基;在例如其2'位置具有取代基基团的糖;或碳环或无环糖类似物。与本发明的精神一致的其它修饰是本领域的技术人员已知的。这类经修饰的寡核苷酸(或寡核苷酸类似物)最好描述为与天然寡核苷酸在功能上可互换,但在结构上不同。更为详细的,例示性修饰披露于Verma S.和Eckstein F.,Annu.Rev. Biochem.67(1998)99-134或WO 02/12263中。另外,可以做出如下的修饰,其中核苷单元经由取代核苷间磷酸酯或糖磷酸酯连接的基团连接。这类连接包括那些披露于Verma S.和Eckstein F.,Annu.Rev.Biochem.67(1998)99-134中的。当利用磷酸酯以外的连接来连接核苷单元时,这类结构也描述为“寡核苷”。

[0176] “核酸”以及“靶核酸”是如本领域熟练技术人员已知的核苷酸的多聚化合物。“靶核酸”在本文中用于指样品中应该分析,即应该测定样品中其存在、不存在和/或量的核酸。

[0177] 术语“引物”在本文中如本领域熟练技术人员已知的那样使用,指能够通过模板依赖性DNA聚合酶引发DNA合成的寡聚化合物,主要指寡核苷酸,但也指经修饰的寡核苷酸,即例如引物的3'端提供游离的3'-OH基团,可以通过建立3'至5'磷酸二酯连接的模板依赖性DNA聚合酶对所述游离的3'-OH基团附着其它核苷酸,其中使用三磷酸脱氧核苷且其中释放焦磷酸。

[0178] “探针”也指天然的或经修饰的寡核苷酸。如本领域中已知的,探针满足检测分析物或扩增物的目的。在依照本发明的方法的情况中,可以使用探针来检测靶核酸的扩增物。出于此目的,探针通常携带标记物。

[0179] “标记物”,经常称为“报告基团”,一般是使与其结合的核酸,特别是寡核苷酸或经修饰的寡核苷酸,以及任何核酸与样品的剩余部分可区别的基团(具有附着的标记物的核酸也可以称作经标记的核酸结合化合物、经标记的探针或仅探针)。依照本发明的优选的标记物是荧光标记物,其是例如荧光染料诸如荧光素染料、罗丹明染料、花菁染料和香豆素染料。依照本发明的优选的荧光染料是FAM、HEX、JA270、CAL635、香豆素343、Quasar705、Cyan500、CY5.5、LC-红640、LC-红705。

[0180] 在本发明的上下文中,任何引物和/或探针都可以是经过化学修饰的,即引物和/或探针包含经修饰的核苷酸或非核苷酸化合物。因而,探针或引物是经修饰的寡核苷酸。

[0181] 核酸扩增的优选方法是聚合酶链式反应(PCR),其披露于美国专利No. 4,683,202、4,683,195、4,800,159和4,965,188,等等。PCR通常采用两种或更多种结合选择的核酸模板(例如DNA或RNA)的寡核苷酸引物。对核酸分析有用的引物包括能够在靶核酸的核酸序列内充当核酸合成的起始点的寡核苷酸。可以通过常规方法从限制性消化物纯化引物,或者其可以合成生成。优选地,引物是单链以在扩增中实现最大效率,但是引物可以是双链。首先,将双链引物变性,即处理以将链分开。将双链核酸变性的一种方法通过加热进行。“热稳定性聚合酶”是热稳定的酶聚合酶,即其是催化形成与模板互补的引物延伸产物,并且在受到升高的温度处理达实现双链模板核酸变性必需的时间时没有不可逆地变性的酶。一般地,合成在每条引物的3'端起始,并且沿着模板链以5'到3'方向进行。热稳定性聚合酶已经例如自黄色栖热菌(*Thermus flavus*)、红色栖热菌(*T. ruber*)、嗜热栖热菌(*T. thermophilus*)、水生栖热菌(*T. aquaticus*)、乳栖热菌(*T. lacteus*)、红色栖热菌(*T. rubens*)、嗜热脂肪芽胞杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)和炽热甲烷嗜热菌(*Methanothermobacter fervidus*)分离。不过,非热稳定性聚合酶也可以在PCR测定法中采用,只要该酶得到补充。

[0182] 如果模板核酸是双链的,那么有必要在可以使用其作为PCR中的模板前将两条链分开。可以通过任何合适的变性方法,包括物理、化学或酶手段来实现链分开。一种分开核酸链的方法牵涉加热核酸,直至其变性占优势(例如,大于50%、60%、70%、80%、90%或95%变性)。使模板核酸变性必需的加热条件会取决于例如缓冲盐浓度和变性的核酸的长度和核苷酸组成,但是范围通常为约90℃至约105℃达某个时间,该时间取决于反应特征诸如温度和核酸长度。变性通常实施约5秒至9分钟。为了不使相应的聚合酶如例如Z05DNA聚合酶暴露于这类高温太长及如此有损失功能性酶的风险,优选使用较短的变性步骤。

[0183] 在本发明的一个优选的实施方案中,变性步骤长至30秒,进一步优选地,长至20秒,进一步优选地,长至10秒,进一步优选地,长至5秒,最优选地,约5秒。

[0184] 如果通过加热来使双链模板核酸变性,那么允许反应混合物冷却至如下温度,该温度促进每条引物在靶核酸上与其靶序列退火。

[0185] 优选地,用于退火的温度是约35℃至约70℃,进一步优选地,约45℃至约65℃;进一步优选地,约50℃至约60℃,进一步优选地,约55℃至约58℃。退火时间可以是约10秒至约1分钟(例如约20秒至约50秒;约30秒至约40秒)。在此背景中,可以有利的是使用不同的退火温度来增加相应测定法的包容性(inclusivity)。简言之,这意味着于相对较低的退火温度,引物也可以结合具有单一错配的靶物,因此也可以扩增特定序列的变体。如果例如某种生物体具有已知或未知的也应该检出的遗传变体,那么这可以是期望的。在另一方面,相对较高的退火温度具有提供较高特异性的优点,因为朝向更高的温度,引物结合不完全匹配的靶序列的可能性不断降低。为了受益于这两种现象,在本发明的一些实施方案中,优选的是,上文所描述的方法包括于不同温度,优选地,首先于较低温度,然后于较高温度退火。如果例如第一温育于55℃发生约5个循环,那么可以(预)扩增不完全匹配的靶序列。这接着可以是例如于58℃约45个循环,从而提供贯穿实验的主要部分的较高特异性。这样,在特异性保持相对较高的情况中不遗漏潜在重要的遗传变体。

[0186] 然后,将反应混合物调节至促进或优化聚合酶活性的温度,即足以自退火引物发

生延伸以生成与要分析的核酸互补的产物的温度。温度应该足以从与核酸模板退火的每条引物合成延伸产物,但是不应高得以致于延伸产物从其互补模板变性(例如,一般地,用于延伸的温度范围为约40℃至约80℃;例如约50℃至约70℃;约60℃)。延伸时间可以是约10秒至约5分钟,优选地,约15秒至2分钟,进一步优选地,约20秒至约1分钟,进一步优选地,约25秒至约35秒。新合成的链形成双链分子,其可以在反应的随后步骤中使用。可以根据需要经常重复链分开、退火、和延伸步骤以产生期望量的与靶核酸对应的扩增产物。反应中的限制因素是反应中存在的引物、热稳定性酶、和三磷酸核苷的量。优选地,将循环步骤(即变性、退火、和延伸)至少重复一次。为了在检测中使用,循环步骤数目会取决于例如样品的性质。如果样品是核酸的复杂混合物,那么将需要更多的循环步骤来扩增足以检出的靶序列。一般地,将循环步骤至少重复约20次,但是可以重复多达40、60或甚至100次。

[0187] 在本发明的范围内,可以实施如下的PCR,其中退火和延伸步骤在同一 步骤中(一步PCR)或者如上文所描述的,在分开的步骤中(两步PCR)实施。将退火和延伸一起及如此在相同物理和化学条件下,用合适的酶诸如例如Z05 DNA聚合酶实施具有的优点在于节省每个循环中用于额外步骤的时间,并且还消除对退火和延伸之间额外的温度调节的需要。因此,一步PCR降低相应测定法的总体复杂性。

[0188] 一般地,总体扩增的时间较短是优选的(因为缩短获得结果时间),而且 导致可能更早的诊断。

[0189] 在本发明的上下文中要使用的其它优选的核酸扩增方法包括连接酶链式反应(LCR;Wu D.Y.和Wallace R.B.,*Genomics* 4(1989)560-69;及Barany F.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88(1991)189-193);聚合酶连接酶链式反应(Barany F.,*PCR Methods and Applic.1*(1991)5-16);缺口-LCR(WO 90/01069);修复链式反应(Repair Chain Reaction)(EP 0439182A2)、3SR(Kwoh D.Y.等,*Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 86(1989)1173-1177;Guatelli J.C.等,*Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 87(1990)1874-1878;WO 92/08808)、以及NASBA(US 5,130,238)。此外,有链置换扩增(SDA)、转录介导的扩增(TMA)和Qb扩增(关于综述,参见例如 Whelen A.C.和Persing D.H.,*Annu.Rev.Microbiol.*50(1996)349-373;Abramson R.D.和Myers T.W.,*Curr Opin Biotechnol* 4(1993)41-47)。

[0190] “具有逆转录酶活性的聚合酶”是能够基于RNA模板合成DNA的核酸聚合酶。它也能够能够在RNA已经逆转录成单链cDNA后形成双链DNA。在本发明的一个优选的实施方案中,具有逆转录酶活性的聚合酶是热稳定的。

[0191] 在一个优选的实施方案中,依照本发明的方法包括将含有RNA模板的样品与寡核苷酸引物和优选地热稳定性DNA聚合酶在存在至少所有4种天然的或经修饰的三磷酸脱氧核糖核苷的情况中在合适的缓冲液中一起温育,所述寡核苷酸引物与所述RNA模板充分互补以与后者杂交,所述合适的缓冲液包含金属离子缓冲液,在一个优选的实施方案中,其缓冲pH和金属离子浓度两者。于某个温度实施此温育,所述温度足以使所述引物与所述RNA模板杂交,并且所述DNA聚合酶催化所述三磷酸脱氧核糖核苷的聚合,以形成与所述RNA模板序列互补的cDNA序列。

[0192] 如在本文中使用的,术语“cDNA”指使用核糖核酸链(RNA)作为模板合成的互补DNA分子。RNA可以是例如mRNA、tRNA、rRNA、或另一种形式的RNA,诸如病毒RNA。cDNA可以是单链的、双链的或者可以与互补RNA分子氢键键合,如在RNA/cDNA杂合物中的。

[0193] 适合于与RNA模板退火的引物也可以适合于通过PCR扩增。对于PCR，与逆转录cDNA链互补的第二条引物为延伸产物的合成提供起始位点。

[0194] 在通过DNA聚合酶来扩增RNA分子中，第一延伸反应是使用RNA模板的逆转录，并且生成DNA链。使用DNA模板的第二延伸反应生成双链DNA分子。因此，通过DNA聚合酶从RNA模板合成互补DNA链为扩增提供起始材料。

[0195] 热稳定性DNA聚合酶可以在偶联的单酶逆转录/扩增反应中使用。术语“同质的”在此背景中指用于RNA靶物的逆转录和扩增的两步骤单一添加反应。同质的意指在逆转录(RT)步骤后，不需要在扩增步骤前打开反应容器或以其它方式调节反应组分。在非同质性RT/PCR反应中，在逆转录后且在扩增前，例如调节、添加、或稀释一种或多种反应组分诸如扩增试剂，为此不得不打开反应容器，或者至少不得不操作其内容物。虽然本发明的范围包括同质性和非同质性实施方案两者，但是优选RT/PCR的同质形式。

[0196] 逆转录是RT/PCR中的一个重要的步骤。例如，本领域中已知的是，RNA模板显示形成二级结构的趋势，所述二级结构可以阻碍引物结合和/或相应逆转录酶对cDNA链的延伸。因此，RT反应的相对较高的温度就转录效率而言是有利的。在另一方面，提高温度也意味着更高的特异性，即RT引物不会与同预期的一种或多种序列显示错配的序列退火。尤其在多种不同靶RNA的情况下，可能期望也转录，并且随后扩增并检测具有单一错配的序列，例如在流体样品中可能存在生物体的未知的或不常见的亚株或亚种的情况下。

[0197] 为了受益于上文所描述的两种优点，即减少二级结构和具有错配的模板的逆转录，本发明的一个方面是于超过一种不同温度实施RT温育。

[0198] 因此，本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法，其中在步骤ii.中，于30℃至75℃，优选地45℃至70℃，进一步优选地55℃至65℃的不同温度实施具有逆转录酶活性的聚合酶的温育。

[0199] 作为逆转录的又一个重要方面，较长的RT步骤可以损伤可存在于流体样品中的DNA模板。如果流体样品含有RNA和DNA种类两者，如此，有利的 是将RT步骤的持续时间保持得尽可能短，但是同时确保合成的cDNA量足以用于随后的扩增和任选的扩增物检测。

[0200] 因此，本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法，其中在步骤ii.中，时间段是长至30分钟、20分钟、15分钟、12.5分钟、10分钟、5分钟、或1分钟。

[0201] 本发明的一个进一步优选的方面是上文所描述的方法，其中具有逆转录酶活性且包含突变的聚合酶选自下组：

[0202] a. CS5DNA聚合酶

[0203] b. CS6DNA聚合酶

[0204] c. 海栖热袍菌(*Thermotoga maritime*) DNA聚合酶

[0205] d. 水生栖热菌DNA聚合酶

[0206] e. 嗜热栖热菌DNA聚合酶

[0207] f. 黄色栖热菌DNA聚合酶

[0208] g. 丝状栖热菌(*Thermus filiformis*) DNA聚合酶

[0209] h. 栖热菌属物种sps17DNA聚合酶

[0210] i. 栖热菌属物种Z05DNA聚合酶

[0211] j. 那不勒斯栖热袍菌(*Thermotoga neapolitana*) DNA聚合酶

[0212] k.非洲栖热腔菌 (*Thermosipho africanus*) DNA聚合酶

[0213] l.*Thermus caldophilus* DNA聚合酶。

[0214] 特别适合于这些要求的是在聚合酶域中携带突变的酶,所述突变就较快的延伸速率而言增强其逆转录效率。

[0215] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中具有逆转录酶活性的聚合酶是相对于相应的野生型聚合酶包含突变的聚合酶,所述突变赋予改善的核酸延伸速率和/或改善的逆转录酶活性。

[0216] 在一个更优选的实施方案中,在上文所描述的方法中,具有逆转录酶活性的聚合酶是相对于相应的野生型聚合酶包含突变的聚合酶,所述突变赋予改善的逆转录酶活性。

[0217] 携带使其特别可用于本发明背景的点突变的聚合酶披露于WO 2008/046612中。具体地,要在本发明背景中使用的优选的聚合酶是在聚合酶域中至少包含下述基序的突变的DNA聚合酶: T-G-R-L-S-S-X_{b7}-X_{b8}-P-N-L-Q-N;其中X_{b7}是选自S或T的氨基酸,且其中X_{b8}是选自G、T、R、K或L的氨基酸,其中该聚合酶包含3'-5'外切核酸酶活性,并且相对于野生型DNA聚合酶具有改善的核酸延伸速率和/或改善的逆转录效率,其中在所述野生型DNA聚合酶中,X_{b8}是选自D、E或N的氨基酸。

[0218] 一个特别优选的例子是来自栖热菌属物种Z05的热稳定性DNA聚合酶突变体(记载于例如US 5,455,170),如与相应的野生型酶Z05相比,所述变异在聚合酶域中包含突变。对依照本发明的方法特别优选的是突变体Z05DNA聚合酶,其中第580位氨基酸选自下组:G、T、R、K和L。

[0219] 对于使用热稳定性聚合酶的逆转录,Mn²⁺作为二价阳离子是优选的,并且通常以盐形式,例如氯化锰(MnCl₂)、乙酸锰(Mn(OAc)₂)、或硫酸锰(MnSO₄)包括在内。如果例如在含有50mM Tricine缓冲液的反应中包含MnCl₂,那么MnCl₂一般以0.5-7.0mM的浓度存在;当利用各200mM dGTP、dATP、dUTP、和dCTP时优选0.8-1.4mM;且2.5-3.5mM MnCl₂是最优选的。此外,使用Mg²⁺作为二价阳离子用于逆转录在本发明的背景中也是优选的。

[0220] 由于在保留DNA靶核酸的情况中将RNA靶核酸逆转录成cDNA在本发明的范围内,因此可以使用cDNA和DNA两者进行随后的扩增,依照本发明的方法特别可用于同时扩增自具有RNA基因组的生物体或具有DNA基因组的生物体两者衍生的靶核酸。此优点相当大地增加可以在相同物理条件下分析的一批不同生物体,特别是病原体。

[0221] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中至少两种靶核酸包含RNA和DNA。

[0222] 特别由于适当的最适温度,酶如Tth聚合酶或优选地上文提及的突变体Z05DNA聚合酶适合于实施随后扩增靶核酸的步骤。对逆转录和扩增两者采用同一种酶促成易于实施该方法,并且促进了自动化,因为不必在RT和扩增步骤之间操作流体样品。

[0223] 因此,在一个优选的实施方案中,在上文所描述的方法中,在步骤ii.和步骤iii中使用相同的具有逆转录酶活性的聚合酶。优选地,所述酶是上文描述的突变体Z05DNA聚合酶。

[0224] 为了不使本发明上下文中使用的反应混合物的聚合酶或其它组分暴露于升高的温度达长于必要的时间,在一个优选的实施方案中,高于90℃的步骤长多至20秒,优选地多至15秒,更优选地多至10秒,更优选地多至5秒,且最优选地5秒。这也缩短获得结果时

间,并且缩短测定法的总体需要时间。

[0225] 在这类同质性设置中,可以具有相当大的优点的是在启动RT和扩增前将反应容器密封,由此降低污染的风险。可以例如如下实现密封,即应用优选为透明的箔、盖,或者通过对反应容器添加油,并在流体顶部形成亲脂相作为密封层。

[0226] 因此,本发明的一个优选的方面是上文描述的方法,其在步骤i.和步骤ii.之间进一步包括将至少两个反应容器密封的步骤。

[0227] 扩增步骤的靶物可以是RNA/DNA杂合分子。靶物可以是单链或双链核酸。虽然最广泛使用的PCR规程使用双链靶物,但是这并不是必须的。在单链DNA靶物的第一轮扩增循环后,反应混合物含有双链DNA分子,其由单链靶物和新合成的互补链构成。类似地,在RNA/cDNA靶物的第一轮扩增循环后,反应混合物含有双链cDNA分子。在这时,进行连续扩增循环,如上文所描述的。

[0228] 由于核酸扩增(特别但不仅仅是在PCR的情况中)在作为循环反应实施时是非常有效的,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中步骤iii.中的扩增反应由多个循环步骤组成。

[0229] 合适的核酸检测方法是本领域技术人员已知的,并且记载于标准教科书如Sambrook J.等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989及Ausubel F.等:Current Protocols in Molecular Biology 1987,J.Wiley and Sons,NY。在实施核酸检测步骤前也可以有进一步的纯化步骤,如例如沉淀步骤。检测方法可以包括但不限于结合或插入特定的染料如溴化乙啶,其插入双链DNA中,此后改变其荧光。也可以任选地在限制性消化后通过电泳方法分离纯化的核酸,此后将其显现。还有基于探针的测定法,其采用寡核苷酸与特定序列的杂交和随后对杂交物的检测。

[0230] 优选的是在扩增反应期间或之后检测扩增的靶核酸以评估分析结果。特别对于实时检测,使用核酸探针是有利的。

[0231] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中循环步骤包括扩增步骤和杂交步骤,所述杂交步骤包括使扩增的核酸与探针杂交。

[0232] 可以有利的实时监测扩增反应,即在扩增自身期间检测靶核酸和/或其扩增物。

[0233] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中用供体荧光模块和相应的接受荧光模块标记探针。

[0234] 优选地,上文所列的方法基于供体荧光模块和接受荧光模块之间的荧光共振能量转移(FRET)。代表性的供体荧光模块是荧光素,而代表性的相应接受荧光模块包括LC-红640、LC-红705、Cy5、和Cy5.5。通常,检测包括以供体荧光模块吸收的波长激发样品,并且显现和/或测量由相应的接受荧光模块发射的波长。在依照本发明的方法中,优选地,检测继之以量化FRET。优选地,在每个循环步骤后实施检测。最优选地,实时实施检测。通过使用商品化实时PCR仪(例如LightCycler™或TaqMan®),PCR扩增和扩增产物的检测可以以显著缩短的循环时间在单个封闭的小杯中组合。由于检测与扩增同时发生,因此实时PCR方法消除对操作扩增产物的需要,并且降低扩增产物间交叉污染的风险。实时PCR大大地缩短周转时间,并且是临床实验室中常规PCR技术的一种有吸引力的备选。

[0235] 下列专利申请描述了如在LightCycler™技术中使用的实时PCR:WO 97/46707、WO 97/46714和WO 97/46712。LightCycler™仪是一种与利用高质量光学镜的微体积荧光计组合的快速热循环仪。此快速热循环技术使用薄玻璃小杯作为反应容器。反应室的加热和冷却通过交替加热的和周围的空气来控制。由于空气的质量低以及小杯的表面积与体积的比率高,可以在热室内实现非常快速的温度交换速率。

[0236] TaqMan®技术利用用两种荧光模块标记的单链杂交探针。当第一荧光模块用合适波长的光激发时,吸收的能量依照FRET的原理转移到第二荧光模块。一般地,第二荧光模块是猝灭剂分子。以此形式使用的典型荧光染料是例如FAM、HEX、CY5、JA270、Cyan和CY5.5,等等。在PCR反应的退火步骤期间中,经标记的杂交探针结合靶核酸(即扩增产物),并且在随后的延伸阶段期间,受到Taq或如熟练技术人员已知的另一种合适的聚合酶,诸如优选的突变体Z05聚合酶的5'至3'外切核酸酶活性降解。结果,激发的荧光模块和猝灭剂模块变成彼此空间分开。因此,在没有猝灭剂的情况中激发第一荧光模块后,可以检出来自第一荧光模块的荧光发射。

[0237] 在上文描述的两种检测形式中,发射信号的强度可以与初始靶核酸分子数目相关联。

[0238] 作为FRET的一种备选,可以使用双链DNA结合染料诸如荧光DNA结合染料(例如SYBRGREENI®或SYBRGOLD® (Molecular Probes))来检测扩增产物。在与双链核酸相互作用后,这类荧光DNA结合染料在用合适波长的光激发后发射出荧光信号。也可以使用双链DNA结合染料诸如核酸嵌入染料。当使用双链DNA结合染料时,通常实施解链曲线分析以确认扩增产物的存在。

[0239] 使用本发明的实时PCR方法,也可以使用与FRET结合的分子信标来检测扩增产物的存在。分子信标技术使用用第一荧光模块和第二荧光模块标记的杂交探针。第二荧光部分一般是猝灭剂,并且荧光标记物通常位于探针的每个末端。分子信标技术使用具有允许二级结构形成(例如发夹)的序列的探针寡核苷酸。由于探针内二级结构形成,两种荧光模块在探针在溶液中时为空间接近。在与扩增产物杂交后,探针的二级结构受到破坏,并且荧光模块变得彼此分开,使得在用合适波长的光激发后,可以检出第一荧光模块的发射。

[0240] 因此,利用FRET的上文描述的方法在依照本发明的优选方法中,其中所述探针包含允许二级结构形成的核酸序列,其中所述二级结构形成导致所述第一和第二荧光模块之间的空间接近。

[0241] 仅可以在荧光模块直接局部接近时,且在供体荧光模块的发射光谱与接受荧光模块的吸收光谱重叠时发生有效的FRET。

[0242] 因此,在本发明的一个优选的实施方案中,所述供体和接受荧光模块在所述探针上在彼此的不超过5个核苷酸内。

[0243] 在一个进一步优选的实施方案中,所述接受荧光模块是猝灭剂。

[0244] 如上文描述的,在TaqMan形式中,在PCR反应的退火步骤期间中,经标记的杂交探针结合靶核酸(即扩增产物),并且在随后的延伸阶段期间,受到Taq或如熟练技术人员已知的另一种合适的聚合酶,诸如优选的突变体Z05聚合酶的5'至3'外切核酸酶活性降解。

[0245] 因此,在一个优选的实施方案中,在依照本发明的方法中,扩增采用具有5'至3'外切核酸酶活性的酶聚合酶。

[0246] 进一步有利的是注意选择由上文所描述的方法产生的扩增子的长度。一般地,相对较短的扩增子提高扩增反应的效率。因此,本发明的一个优选的方面是上文描述的方法,其中扩增片段包含多至450个碱基,优选地多至300个碱基,进一步优选地多至200个碱基,且进一步优选地多至150个碱基。

[0247] 依照本发明,使用对照核酸可以进一步具有优点。本领域已知的是定性和定量对照两者特别在诊断环境中具有相当大的意义。

[0248] 在此背景中,充当“定量标准核酸”的对照核酸倾向是参照,并且作为参照使用以量化靶核酸,即测定靶核酸的量。出于此目的,一种或多种定量标准核酸与靶核酸一起经历所有可能的样品制备步骤。此外,贯穿整个方法在相同反应混合物内加工定量标准核酸。它必须在存在或没有靶核酸的这两种情况中都直接或间接地生成可检测的信号。出于此目的,在每种测试中必须仔细优化定量标准核酸的浓度,以便不干扰灵敏度,而且例如在非常高的靶物浓度也生成可检测的信号。就相应测定法的检测限(LOD,见下文)而言,优选地,“定量标准核酸”的浓度范围是20-5000倍LOD,更优选地20-1000倍LOD,最优选地20-5000倍LOD。反应混合物中定量标准核酸的终浓度取决于实现的定量测量范围。定量标准核酸可以是例如DNA、RNA或PNA、装甲(armored)DNA或RNA及其经修饰形式。

[0249] “检测限”或“LOD”意指样品中可检测的最低核酸量或浓度。低“LOD”对应于高灵敏度,反之亦然。“LOD”通常依靠单位“cp/ml”(特别是在核酸是病毒核酸时),或者以IU/ml表示。“cp/ml”意指“每毫升的拷贝”,其中“拷贝”是相应核酸的拷贝。IU/ml代表“国际单位/ml”,指WHO标准。

[0250] 一种用于计算LOD的广泛使用的方法是“Probit(概率单位)分析”,其是一种分析刺激物(剂量)和可数性(quantal)(全有或全无)响应之间关系的方法。在典型的可数性响应实验中,对动物组给予不同剂量的药物。记录每个剂量水平的百分比濒死。然后,可以使用Probit分析来分析这些数据。Probit模型假定百分比响应与对数剂量的关系呈累积正态分布。也就是说,可以使用对数剂量作为变量来从累积法线(cumulative normal)中读出百分比濒死。使用正态分布而不是其它概率分布,影响在可能的剂量的高和低末端处的预测响应率,但是接近中间具有很少的影响。

[0251] Probit分析可以以独特的“命中率”应用。如本领域中已知的,“命中率”通常以百分比[%]表示,并且指示在特定浓度的分析物时阳性结果的百分比。因此例如,LOD可以以95%命中率测定,这意味着对95%有效结果呈阳性的背景计算LOD。

[0252] 在一个优选的实施方案中,上文所描述的方法提供1-100cp/ml或0.5-50 IU/ml,更优选地1-75cp/ml或0.5-30IU/ml,更优选地1-25cp/ml或1-20IU/ml的LOD。

[0253] 就来自某些病毒的可能的靶核酸的一些例子而言,优选地,依照本发明的方法提供下列LOD:

[0254] • HIV:多至60cp/ml,更优选地多至50cp/ml,更优选地多至40cp/ml,更优选地多至30cp/ml,更优选地多至20cp/ml,更优选地多至15cp/ml

[0255] • HBV:多至10IU/ml,更优选地多至7.5IU/ml,更优选地多至5IU/ml

[0256] • HCV:多至10IU/ml,更优选地多至7.5IU/ml,更优选地多至5IU/ml

[0257] • WNV I:多至20cp/ml,更优选地多至15cp/ml,更优选地多至10cp/ml

[0258] • WNV II:多至20cp/ml,更优选地多至15cp/ml,更优选地多至10cp/ml,更优选

地多至5cp/ml

[0259] • JEV:多至100cp/ml,更优选地多至75cp/ml,更优选地多至50cp/ml,更优选地多至30cp/ml

[0260] • SLEV:多至100cp/ml,更优选地多至75cp/ml,更优选地多至50cp/ml,更优选地多至25cp/ml,更优选地多至10cp/ml。

[0261] 在下文中描述了如何基于定量标准核酸在TaqMan形式中实施定量结果 计算的例子:从来自整个PCR运行的、经仪器校正的荧光值的输入数据计算 滴度。含有靶核酸和充当定量标准核酸的对照核酸的一组样品在使用规定温 度概况的热循环仪上经历PCR。在PCR概况期间的选定温度和时间,通过过 滤光照明样品,并且对每份样品针对靶核酸和定量标准核酸收集过滤荧光数 据。在完成PCR运行后,处理荧光读数以产生定量标准核酸的一组染料浓度 数据和靶核酸的一组染料浓度数据。以相同方式处理每组染料浓度数据。在 数次似真性检查后,对定量标准核酸和靶核酸计算肘值(elbow value) (CT)。肘值定义为靶核酸或定量标准核酸的荧光与预定阈值(荧光浓度)相交的点。滴度测定基于如下的假定,即靶核酸和定量标准核酸以相同的效率扩增,且 在计算的肘值,扩增并检测相等量的靶核酸和定量标准核酸扩增子拷贝数。因此,(CT_{QS}-CT_{靶物})对对数(靶物浓度/QS浓度)呈线性,其中“QS”代表 内部定量标准核酸。然后,可以例如通过使用如下述等式中的多项式校正式 计算滴度T:

[0262] $T' = 10 (a (CT_{QS} - CT_{靶物})^2 + b (CT_{QS} - CT_{靶物}) + c)$

[0263] 已知多项式常数和定量标准核酸的浓度,因此该等式中唯一的变量是差 (CT_{QS}-CT_{靶物})。

[0264] 在仅检测流体样品中靶核酸的存在或缺乏外,测定所述核酸的量也经常 是重要的。举例而言,病毒性疾病的阶段和严重性可以基于病毒载量评估。此外,任何疗法的监测需要关于个体中存在的病原体量的信息以估计疗法的 成功与否。

[0265] 考虑上文提及的内容,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其进一步包括在步骤iii.后测定靶核酸的量的步骤。

[0266] 此外,在本发明的意义中,一种或多种对照核酸可以充当“定性内部对 照核酸”。生物学样品中核酸的定性检测对于例如识别个体感染是至关重要的。由此,用于检测微生物性感染的测定法的一个重要的要求是避免假阴性 或假阳性结果,因为这类结果几乎会不可避免地导致就相应患者的治疗而言 的严重后果。因此,特别是在基于PCR的方法中,向检测混合物添加定性内 部对照核酸。所述对照对于确定测试结果的有效性是特别重要的:至少在就 相应的靶核酸而言阴性结果的情况下,定性内部对照反应在特定背景内必须 表现为反应性的,即必须检测出定性内部对照,否则认为该测试自身是无效的。然而,在定性设置中,在阳性结果的情况下没有必要必须检出所述定性 内部对照。对于定性测试,特别重要的是,保证灵敏度,并且因此对其严格 控制。因此,定性内部对照的浓度必须相对较低,从而即使在例如略微抑制 的情况下,没有检测出定性内部对照,并且因此该测试是无效的。必须注意 使其适应相应的测定法及其灵敏度。优选地,定性内部核酸,即第二对照核酸的浓度范围会包含每个反应1个拷贝至每个反应1000个拷贝的范围。就相 应测定法的检测限(LOD)而言,优选地,其浓度在测定法的LOD和LOD的25 倍数之间,更优选地在LOD和10倍LOD之间。更优选地,其在2倍和10倍 LOD之间。甚至更优选地,其在5倍和10倍LOD之间。

最优选地,其为5倍或 10倍LOD。

[0267] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述内部对照核酸的扩增产物的存在即使在缺乏一种或多种所述靶核酸的扩增产物的 情况中指示反应混合物中发生扩增。

[0268] 本发明特别可用于开发对多种参数和/或核酸类型在对所述不同参数和/ 或核酸类型使用相同内部对照核酸序列的情况中进行的的同时测定法。因此, 它促成在多种水平上降低相应实验的总体复杂性:例如,仅必须设计一种内 部对照核酸序列,并且添加至相应的扩增混合物,如此节省用于设计和合成 或购买多种对照核酸序列的时间和成本。可以将一种或多种测定法流线化 (streamline),并且减少操作错误。另外,在相同条件下同时实施的一个测定 法或平行测定法中采用的不同对照核酸序列越多,可发生的相应条件的调节 越复杂。此外,凭借适合于多种核酸的单一对照,可以将所述对照从单一来源分配入例如含有所述不同靶核酸的不同容器中。在本发明的范围内,单一 对照核酸序列也可以充当定性和定量对照。

[0269] 因此,本发明的一个优选方面是一种用于分离和同时扩增可以存在于一 种或多种流体样品的至少第一和第二靶核酸的方法,所述方法包括下列自动 化步骤:

[0270] a.向每种所述流体样品添加内部对照核酸

[0271] b.在一个或多个容器中将固体支持材料和所述一种或多种流体样品于 一定条件下组合在一起达一段时间,所述条件和时间段足以允许包含所述靶 核酸和内部对照核酸的核酸在所述固体支持材料上固定化

[0272] c.在分离站中将所述固体支持材料自存在于所述流体样品中的其它物 质分离

[0273] d.在所述分离站中纯化所述核酸,并将所述固体支持材料用清洗缓冲液 清洗一次或多次

[0274] e.在至少两个反应容器中使所述纯化的靶核酸和所述纯化的内部对照 核酸与一种或多种扩增试剂接触,所述扩增试剂包含针对每种所述靶核酸和 所述内部对照核酸的至少一组独特引物,其中至少第一反应容器至少包含所 述第一靶核酸,而至少第二反应容器至少包含所述第二靶核酸,且其中所述 第二靶核酸不存在于第一反应容器中

[0275] f.在所述反应容器中将所述纯化的靶核酸和所述纯化的内部对照核酸 与所述一种或多种扩增试剂在一定的条件下一起温育达到一段时间,所述条 件和时间段足以发生指示所述靶核酸存在或缺乏的扩增反应,

[0276] g.检测并测量由所述靶核酸的扩增产物生成并与所述靶核酸浓度成比 例的信号,以及检测并测量由所述内部对照核酸生成的信号,

[0277] 其中步骤d.至g.中用于扩增和检测的条件对于所述至少第一和第二纯化 的靶核酸和所述内部对照核酸是等同的,且其中所述内部对照核酸的序列对 所述至少第一和第二纯化的靶核酸是等同的。

[0278] 作为上文所描述的方法的进一步的优点,在可能的后续实验中对特定生 物学样品测试其它核酸不需要牵涉添加不同内部对照核酸的另一个样品制 备规程,因为可以使用本发明中使用的对照来检验不同核酸的扩增。因此, 一旦已经添加内部对照核酸,可以在相同条件下在相同样品中测试其它参 数。

[0279] 内部对照核酸可以是竞争性、非竞争性或部分竞争性的。

[0280] 竞争性内部对照核酸携带与靶物基本相同的引物结合位点,并且由此与靶物竞争相同引物。虽然此原理允许对相应靶核酸的良好模仿(由于其类似结构),但是它可以降低就一种或多种靶核酸而言的扩增效率,并且因此导致测定法不太灵敏。

[0281] 非竞争性内部对照核酸具有不同于靶物的引物结合位点,并且如此结合不同引物。这类设置的优点包含如下的事实,即反应混合物中不同核酸的单一扩增事件可以在没有任何竞争效应的情况中彼此独立发生,等等。因此,对该测定法的检测限没有发生不利影响(如可以是在竞争性设置中的情况)。

[0282] 最后,在使用部分竞争性设置的扩增中,相应的对照核酸和至少一种靶核酸竞争相同引物,而至少一种其它靶核酸结合不同引物。

[0283] 如下的事实使所述方法变得相当灵活,即上文所描述的方法牵涉针对每种所述靶核酸和所述内部对照核酸的一组独特引物。在此非竞争性设置中,没有必要将靶物特异性结合位点引入对照核酸中(如在竞争性设置的情况中),并且避免如上文提及的竞争性设置的缺点。在非竞争性设置中,内部对照核酸具有不同于任何靶序列的序列,从而不竞争它们的引物和/或探针。优选地,内部对照核酸的序列不同于流体样品中的其它核酸序列。例如,如果流体样品自人衍生,那么优选地,内部对照核酸没有也内源性存在于人内的序列。如此,序列差异应该至少足够显著,从而不容许引物和/或探针在严格条件下对相应的一种或多种内源核酸的结合,并且如此,使得设置变为竞争性的。为了避免这类干扰,优选地,本发明中使用的内部对照核酸序列自与流体样品起源不同的来源衍生。优选地,其自天然存在的基因组,优选地植物基因组,进一步优选地葡萄基因组衍生。在一个非常优选的实施方案中,自天然存在的基因组衍生的核酸是混杂的。如本领域中已知的,“混杂”意味着在序列中以某种程度引入碱基突变。优选地,本发明中使用的内部对照核酸的序列相对于衍生其的天然存在的基因是实质性改变的。

[0284] 在本发明的上下文中,“序列”是核酸的一级结构,即组成相应核酸的单个核碱基的特定排列。应当理解的是,术语“序列”并非指特定类型的核酸诸如RNA或DNA,而是适用于这两者以及其它类型的核酸诸如例如PNA或其它。在核碱基彼此对应的情况中,特别是在尿嘧啶(存在于RNA中)和胸腺嘧啶(存在于DNA中)的情况中,可以认为这些碱基在RNA和DNA序列之间是等同的,如相关领域中公知的。

[0285] 临床相关核酸经常是DNA,其可以自例如DNA病毒如例如乙肝病毒(HBV)、巨细胞病毒(CMV)等,或细菌如例如沙眼衣原体(CT)、淋病奈瑟氏球菌(NG)等衍生。在这类情况中,可以有利的是,使用由DNA组成的内部对照核酸,以反映靶核酸特性。

[0286] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述内部对照核酸是DNA。

[0287] 在另一方面,临床诊断学相关的众多核酸是核糖核酸,如例如来自RNA病毒诸如例如人免疫缺陷病毒(HIV)、丙肝病毒(HCV)、西尼罗病毒(WNV)、人乳头状瘤病毒(HPV)、日本脑炎病毒(JEV)、圣路易斯脑炎病毒(SLEV)等的核酸。可以将本发明容易地应用于这类核酸。在此情况中,可以有利的是使用由RNA组成的内部对照核酸,以反映靶核酸特性。如果要在上文所描述的方法中分析RNA和DNA两者,那么优选的是内部对照核酸是RNA,因为优选地,内部对照核酸模拟牵涉多种靶物的测定法中最灵敏的靶物,并且RNA靶物通常必须更紧密地控制。

[0288] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述内部对照核酸是RNA。

[0289] 由于RNA比DNA更易降解(由于诸如碱性pH、核糖核酸酶等影响所致),优选地,由RNA构成的内部对照核酸以装甲颗粒提供。装甲颗粒诸如特别是装甲RNA记载于例如EP910643中。简言之,至少部分将RNA在病毒外壳蛋白中包囊,所述RNA可以用化学法或者优选地,例如由细菌诸如例如大肠杆菌(E.coli)异源生成。后者赋予RNA对外部影响,特别是核糖核酸酶的抗性。必须理解的是,内部对照DNA也可以以装甲颗粒提供。装甲RNA和DNA两者在本发明上下文中可用作内部对照核酸。在一个优选的实施方案中,在大肠杆菌中用MS2外壳蛋白装甲RNA对照核酸。在一个进一步优选的实施方案中,使用λ噬菌体GT11装甲DNA对照核酸。

[0290] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述内部对照核酸是装甲核酸。

[0291] 上文所描述的测定法的结果可以是掺杂的,并且例如包括假阳性(在与来自与流体样品不同的来源的核酸交叉污染的情况中)。特别地,前者实验的扩增物可以促成这类不期望的效果。一种用于使核酸扩增的交叉污染的效应最小化的具体方法记载于美国专利号5,035,996中。该方法牵涉将非常规的核苷酸碱基诸如dUTP引入扩增产物中,并将遗留产物暴露于酶和/或物理化学处理以使产物DNA不能充当后续扩增的模板。用于这类处理的酶是本领域中已知的。例如,尿嘧啶DNA糖基化酶(也称为尿嘧啶-N-糖基化酶或UNG)从含有所述碱基的PCR产物中除去尿嘧啶残基。酶处理导致对污染性遗留PCR产物的降解,并且用来使扩增反应“绝育”。

[0292] 因此,本发明的一个优选的方面是上文所描述的方法,其在步骤i.和步骤ii.之间进一步包括下列步骤

[0293] • 在一定条件下用酶处理流体样品,其中酶促降解来自自其它样品扩增交叉污染性核酸的产物;

[0294] • 将所述酶失活。

[0295] 优选地,所述酶是尿嘧啶-N-糖基化酶。

[0296] 在上文所描述的方法中,优选的是所有步骤都是自动化的。“自动化”意味着方法的步骤适合于用仪器或机器实施,所述仪器或机器能够在很少或没有人为外部控制或影响的情况下运行。仅可能必须手动完成该方法的制备步骤,例如必须将贮存容器充满并放好位置,样品的选择必须人为实施以及本领域技术人员已知的其它步骤,例如控制计算机的操作。仪器或机器可以例如自动添加液体,混合样品或于特定温度实施温育步骤。典型地,这类机器或仪器是由计算机控制的机器人,该计算机实施规定单一步骤和命令的程序。

[0297] 本发明的另一个方面是用于分离和同时扩增可以存在于流体样品中的至少两种靶核酸的分析系统(440),所述分析系统包含下列模块:

[0298] • 包含固体支持材料的分离站(230),所述分离站构建并排列为分离并纯化流体样品中包含的靶核酸

[0299] • 包含至少两个反应容器的扩增站(405),所述反应容器包含扩增试剂、在至少第一反应容器中的至少第一纯化的靶核酸和在至少第二反应容器中的至少第二纯化的核

酸(其中所述第二核酸不存在于所述第一反应容器中), 以及具有逆转录酶活性的聚合酶, 所述聚合酶相对于相应的野生型聚合酶进一步包含如下的突变, 该突变赋予改善的核酸延伸速率和/或改善的逆转录酶活性。

[0300] “分析系统”是以分析给定的样品为最终目的, 彼此相互作用的组件诸如仪器的排列。

[0301] 本发明的分析系统(440, 图11)是包含用于分离和/或纯化分析物的模块(401)的系统(440)。此外, 系统(440)另外包含用于分析所述分析物以获得可检测信号的模块(403)。可以在相同模块(401、402、403)中或者备选地在分开模块中检测可检测信号。如本文中使用的, 术语“模块”指分析仪(400)内的任何空间限定位置。两个模块(401、403)可以以壁分开, 或者可以处于开放关系。任一个模块(401、402、403)可以自主控制, 或者模块(401、402、403)的控制可以与其它模块共享。优选地, 中央控制所有模块。模块(401、402、403)间的转移可以是手动的, 但是优选是自动的。因此, 本发明涵盖自动化分析仪(400)的许多不同实施方案。

[0302] “分离站”在上文有描述。

[0303] “扩增站”包含用于温育至少两个反应容器的内容物的温度受控型恒温箱。其进一步包含多个反应容器如管或板, 其中发生用于样品分析的反应诸如PCR。这类容器的外部界限或壁是化学惰性的, 使得其不干扰之内发生的扩增反应。为了易于操作并促进自动化, 优选的是, 将至少两个反应容器在整体排列中组合, 因此可以对它们一起操作。

[0304] 因此, 本发明的一个优选的方面是上文描述的分析系统, 其中所述至少两个反应容器在整体排列中组合。

[0305] 整体排列可以是例如可逆或不可逆地彼此附着或在架中排列的管形瓶或管。优选地, 所述整体排列是多孔板。

[0306] 优选地, 所述多孔板在固定站(holding station)中容纳。在一个更优选的实施方案中, 一个输送装置将多孔容器从固定站运输到气锁(air-lock)(460), 而第二输送装置将所述多孔板从所述气锁运输到所述扩增站, 其中这两个输送装置通过形式锁定相互作用与所述多孔板相互作用。

[0307] 在一个优选的实施方案中, 分析系统是全自动化的。

[0308] 在一个实施方案中, 在系统的各站间运输整体排列中组合的至少两个反应容器。

[0309] 在第二个实施方案中, 将纯化的靶核酸从所述分离站转移到所述扩增站。优选地, 用包含附着有移液管尖端的移液管的移液器转移包含纯化的核酸的液体。

[0310] 在第三个实施方案中, 将纯化的核酸从所述分离站转移到固定站中容纳的整体排列中的反应容器。优选地, 然后, 将整体排列中的所述反应容器从所述固定站转移到所述扩增站。

[0311] 优选地, 依照本发明的分析系统进一步包含移液单元。所述移液单元包含至少一个移液管, 优选地多个移液管。在一个优选的实施方案中, 所述多个移液管在一个或多个整体排列中组合, 优选地, 在所述整体排列内可以个别操作移液管。优选地, 在本发明的上下文中使用的移液管是包含移液管尖端的移液管, 如上文描述的。在另一个优选的实施方案中, 所述移液管是移液针。

[0312] 或者, 可以将用于分离站中样品制备并含有包含纯化的靶核酸的流体的反应容

器或反应容器排列从分离站转移到扩增站。

[0313] 为此目的,优选地,依照本发明的分析系统进一步包含转移单元,优选地,所述转移单元包含机器人装置,优选地,所述装置包含输送装置。

[0314] 出于上文在依照本发明的方法的背景中提出的原因,以下是本发明进一步优选的方面:

[0315] • 上文描述的分析系统(440),其中至少一个反应容器包含RNA靶核酸和DNA靶核酸。

[0316] • 上文描述的分析系统(440),其中至少一个反应容器包含RNA靶核酸,而至少一个另一反应容器包含DNA靶核酸。

[0317] 优选地,上文描述的分析系统(440)进一步包含一个或多个选自下组的元件:

[0318] • 用于检测由分析物引起的信号的检测模块(403)

[0319] • 密封器(410)

[0320] • 用于试剂和/或一次性用品的贮存模块(1008)。

[0321] • 用于控制系统组件的控制单元(1006)。

[0322] “检测模块”(403)可以例如是用于检测扩增规程结果或效果的光学检测单元。光学检测单元可以包含光源,例如氙气灯,用于引导和过滤光的光学镜诸如镜、透镜、光学滤光片、纤维光学镜,一个或多个参照通道,或CCD照相机或不同的照相机。

[0323] “密封器”(410)构建并排列为密封与依照本发明的分析系统结合使用的任何容器。这类密封器可以例如用合适的盖密封管,或用箔或其它合适的密封材料密封多孔板。

[0324] “贮存模块”(1008)贮存对于引起对分析流体样品重要的化学或生物学反应必需的试剂。其还可以包含对本发明的方法有用的其它组分,例如一次性用品诸如移液管尖端或在分离站和/或扩增站内要用作反应容器的容器。

[0325] 优选地,依照本发明的分析系统进一步包含用于控制系统组件的控制单元。

[0326] 这类“控制单元”(1006)可以包含用于确保所述分析系统的不同组件正确且以正确的时机工作并相互作用(例如以协调方式移动并操作组件诸如移液管)的软件。控制单元还可以包含运行实时操作系统(RTOS)(其是意图用于实时应用的多任务操作系统)的处理器。换言之,该系统处理器能够管理实时约束,即从事件到系统应答的操作最后期限(与系统加载无关)。其以实时控制系统内的不同单元依照给定的指令正确运行并应答。

[0327] 在一个优选的实施方案中,本发明涉及用于处理分析物的分析系统(440),其包含

[0328] a. 第一位置,该第一位置包含以线性排列且包含流体样品(1010)的第一接受器(receptacle)(1001)、包含以 $n \times m$ 排列且用于容纳流体样品(1011)的接受器(103)的加工板(101)、包含线性排列的至少两个移液单元(702)的第一移液装置(700)(其中所述移液单元(702)与移液管尖端(3、4)偶联)、以及包含以 $a \times (n \times m)$ 排列的移液管尖端(3、4)的尖端架(70);

[0329] b. 第二位置,该第二位置包含用于所述加工板(101)的固定器(201、128)、用于多孔板的固定器(330)、用于所述尖端架(70)的固定器(470)和第二移液装置(35),所述第二移液装置(35)包含以 $n \times m$ 排列且与移液尖端(3、4)偶联的移液单元(702)(图12)。如本文中使用的,术语“固定器”指任何能够接受架或加工板的排列。

[0330] 本发明的分析系统(440)的优点如上文对本发明的方法所描述的。

[0331] 优选地,第一移液装置(700)的所述移液单元(702)的位置是可变的。所述第一移液装置(700)的优选实施方案在下文中进行描述。

[0332] 在一个实施方案中,所述尖端架(70)包含以 $a \times (n \times m)$ 排列的移液管尖端(3、4)。优选地,尖端架(70)中包含第一类(4)和第二类(3)移液管尖端。在此实施方案中,第一类移液管尖端(4)以 $n \times m$ 排列形式排列,而第二类移液管尖端(3)以 $n \times m$ 排列形式排列。在此背景中,“n”指行数,而m指列数,其中优选地,n是6,且优选地,m是8。更优选地,第一类移液管尖端(4)与第二类移液管尖端(3)具有不同体积,最优选地,第一类移液管尖端(4)的体积超过500 μ l,而第二类移液管尖端(3)的体积小于500 μ l。在此实施方案中, $a=2$ 。然而,本发明中还包括具有超过两类移液管尖端,并且因此 $a>2$ 的本发明实施方案。

[0333] 在一个方面,本发明的分析系统(440)包含用于向所述加工板(101)各个位置分配样品类型和各个测试的控制单元(1006)。优选地,所述位置是分开的室(401、402)。

[0334] 在本发明的一个方面,所述系统另外包含转移系统(480),其用于在所述第一(402)和第二(401)位置之间转移所述加工板(101)和所述架(70)。所述转移系统(480)的优选实施方案是传送带,或更优选地,一个或多个输送装置。

[0335] 此外,优选地,所述第二移液装置(35)的所述移液管单元与在第一位置(402)中使用的移液管尖端(3、4)衔接。

[0336] 另外,本发明的系统(440)的一个优选实施方案包含第三站(403),所述第三站包含温度受控型温育箱,其用于将所述分析物与获得可检测信号必需的试剂一起温育。此系统的进一步优选的实施方案在下文中描述。

[0337] 用第一处理器(1004)和第二处理器(1005)对 $n \times m$ 排列实现样品和测试定位的更加优化控制,所述第一处理器(1004)包含在所述第一位置(402)中且所述控制单元(1006)对其转移指令,该指令关于将样品类型和各个测试分配到加工板(101)的 $n \times m$ 排列的容器(103)中的特定位置,所述第二处理器(1005)包含在所述第二位置(401)中且所述控制单元(1006)对其转移指令,该指令关于将样品类型和各个测试分配到加工板的 $n \times m$ 排列的容器(103)中的特定位置。

[0338] 优选地,另外,所述系统包含位于所述第一位置中的第一处理器,和位于所述第二位置中的第二处理器。

[0339] 更优选地,所述第一处理器(1004)控制所述第一移液装置(700),而所述第二处理器(1005)控制所述第二移液装置(35)。

[0340] 依照本发明的分析系统的所有其它优选实施方案和实施方案的具体描述是那些对依照本发明的方法提述的。

[0341] 附图简述

[0342] 图1:

[0343] 如本发明的一个实施方案中使用的样品制备工作流的示意图。

[0344] 朝下的箭表示向上文提及的深孔板的每个相应孔添加组分或试剂,朝上的箭表示其相应的除去。这些动作在步骤2、3、4、21和22中手动实施,在步骤10、14、16、18和24中通过装置的加工头(process head)实施,以及在步骤5、6、7、11、15和19中通过装置的试剂头(reagent head)实施。

[0345] 必须理解的是,可以在本发明的精神内灵活调节使用的体积,优选地,至少约多至公开值的30%。具体地,在步骤2的情况中,优选地,样品体积是可变的,从而考虑到不同类型的流体样品,其可以需要或多或少的起始材料来获得正确的结果,如技术人员已知的。优选地,范围是约100u1至约850u1。更优选地,其是约100u1、约500u1或约850u1。优选地,在步骤3中用稀释剂将相应容器中的体积调节至相同总体积。优选地,如在图1中显示的方案中,总体积合计多至约850u1。

[0346] 图2a至2g:

[0347] 如实施例1中描述的,在LightCycler480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE) 上实施扩增自HIV、HBV和CT衍生的靶核酸的增长曲线。y轴上标示的“信号”是标准化的荧光信号。x轴显示相应PCR循环的数目。

[0348] 与相应的内部对照核酸的增长曲线一起显示HIV和HBV的增长曲线。相应的靶核酸曲线以直线表示,对照核酸曲线以点线表示。

[0349] 图2a:定性HIV测定法,其在用于检测靶探针的通道中测量。

[0350] 图2b:定性HIV测定法,其在用于检测对照探针的通道中测量。

[0351] 图2c:定量HIV测定法,其在用于检测靶探针的通道中测量。

[0352] 图2d:定量HIV测定法,其在用于检测对照探针的通道中测量。

[0353] 图2e:定量HBV测定法,其在用于检测靶探针的通道中测量。

[0354] 图2f:定量HBV测定法,其在用于检测对照探针的通道中测量。

[0355] 图2g:CT测定法,其在用于检测靶探针的通道中测量。

[0356] 图3:

[0357] 加工板的透视图。

[0358] 图4:

[0359] 从对角看,加工板的透视图。

[0360] 图5:

[0361] 加工板的俯视图。

[0362] 图6:

[0363] 沿加工板较长侧的横截面视图。

[0364] 图7:

[0365] 横截面视图的局部视图。

[0366] 图8:

[0367] 加工板较长侧的透视图。

[0368] 图9:

[0369] a) 至d) 显示磁性分离站的第二个实施方案的不同视图。

[0370] 图10:

[0371] (a) 至(c) 显示容纳加工板的磁性分离站的第一个实施方案的视图,第一类磁体在最高的Z位置中,而第二类磁体在最低的Z位置中。

[0372] 图11:

[0373] 包含不同站、模块或室的分析仪的示意图。

[0374] 图12:

- [0375] 显示本发明的分析系统。
- [0376] 图13:
- [0377] 依照实施例2中的数据,EDTA血浆中定量HBV测定法的线性。
- [0378] 图14:
- [0379] 依照实施例2中的数据,血清中定量HBV测定法的线性。
- [0380] 图15:
- [0381] 依照实施例2中的数据,EDTA血浆中定量HCV测定法的线性。
- [0382] 图16:
- [0383] 依照实施例2中的数据,血清中定量HCV测定法的线性。
- [0384] 图17:
- [0385] 依照实施例2中的数据,EDTA血浆中定量HIV测定法的线性。

实施例

[0386] 以下实施例描述了可以运行本发明的实施方案。本领域技术人员清楚的是,这些实施例并非限制性的,并且可以在不背离本发明的精神的情况中修改。

[0387] 实施例1:

[0388] 本实施例描述了一种用于分离和同时扩增至少第一和第二靶核酸的方法,其使用单一通用内部对照核酸。

[0389] 简言之,在描述的实施方案中,对一组数种不同靶物同时且在相同条件下实施实时PCR,所述靶物包含细菌(沙眼衣原体,CT)以及DNA病毒(HBV)和RNA病毒(HIV)。所有样品分别在相同实验内,即在同一深孔板(用于样品制备)或多孔板(用于扩增和检测)上加工并分析。

[0390] 制备下列样品,随后分析:

[0391]

试剂	制造商:
HIV-1M二级标准品, 50' 000cp/ML	Roche
HBV二级标准品, 400IU/ml	Roche
CT (DNA POS CTL pCHL-1)	Roche

[0392] 熟练技术人员可获得合适的标准品或其它类型的靶物。

[0393] 依照相应制造商的用法说明书使用下表中列出的仪器:

仪器	制造商
Hamilton Star	Hamilton Medical AG (Bonaduz, CH)
Light Cycler 480	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, DE)
Chameleon密封器	K biosystems (Essex, UK)
压缩器	K biosystems (Essex, UK)

[0396] 对于样品制备,使用下列试剂作为稀释剂:

[0397]

试剂	制造商:
PreservCyt	Thin Prep
K3EDTA血浆,PCR阴性	Roche

[0398] 预先制备下列稀释物,并贮存过夜(血浆稀释物于-60至-90℃,PreservCyt 稀释物于2-8℃):

[0399]

靶物	浓度		基质
HBV	50	IU/ml	K3 EDTA血浆
HIV-1M	100	cp/ml	K3 EDTA血浆
CT	2.5	fg/ml	PreservCyt

[0400] 将每份相应的样品(500u1)和每份相应的标本稀释剂(350u1)手动移液入深孔板中,其中将每种样品添加至三个不同的孔,用于一式三份分析。对每个含有HIV或HBV样品的孔,手动添加50u1内部对照核酸。对于定性HIV测定法,添加充当定性对照的RNA(100个装甲颗粒/样品)。对于定量HIV测定法,添加充当定量标准品的RNA(500个装甲颗粒/样品)。对于定量HBV测定法,添加充当定量标准品的DNA(1E4个拷贝/样品)。所述对照核酸的序列在所有情况中是相同的,并且选自SEQ ID NO 45-48的组。

[0401] 将相应的对照核酸在下列缓冲液中贮存:

[0402]

IC/IQS-贮存缓冲液	浓度或pH
Tris (mM)	10
EDTA (mM)	0.1
叠氮化钠(w/v, %)	0.05
多聚rA RNA (mg/l)	20
pH	8

[0403] 遵循依照图1中描述的方案的工作流并使用下列试剂在Hamilton Star (Hamilton, Bonaduz, CH)上实施样品制备:

[0404]

蛋白酶试剂	浓度或pH
Tris (mM)	10
EDTA (mM)	1
氯化钙(mM)	5
醋酸钙(mM)	5
Esperase (mg/ml)	80
甘油(w/v, %)	50
pH	5.5

[0405]

MGP试剂	浓度或 pH
MPG粉末(mg/ml)	60
Tris (mM)	30
对羟基苯甲酸甲酯(w/v, %)	0.1
叠氮化钠(w/v, %)	0.095
pH	8.5

[0406]

裂解试剂	浓度或 pH
硫氰酸胍(M)	4
柠檬酸钠(mM)	50
聚多卡醇(w/v, %)	5
二硫苏糖醇(w/v, %)	2
pH	5.8

[0407]

清洗缓冲液	浓度或 pH
柠檬酸钠(mM)	7.5
对羟基苯甲酸甲酯(w/v, %)	0.1
pH	4.1

[0408]

洗脱缓冲液	浓度或 pH
-------	----------

[0409]

Tris (mM)	30
对羟基苯甲酸甲酯(w/v, %)	0.2
pH	8.5

[0410] 在最终步骤后,Hamilton Star装置的加工头将含有扩增试剂的相应主混合物(mastermix) (Mmx)添加至每孔,将含有分离的核酸的流体与Mmx混合,并将每种所得的混合物转移到实施扩增的深孔板的相应孔。

[0411] 使用下列主混合物(各由两种试剂R1和R2组成):

[0412] 对于HIV:

[0413]

R1 试剂	浓度/50 μ l-PCR [μ M]
水(PCR级)	
Mn(Ac) ₂ * 4H ₂ O (用乙酸调节为pH 6.1)	3'000
NaN3/Ri, 用10 mM Tris (pH7)缓冲[%]	0.018
R2 试剂	浓度/50 μ l-PCR [μ M]
DMSO [%]	5.000 %
NaN3/Ri, 用10 mM Tris (pH7)缓冲[%]	0.027 %
乙酸钾pH 7.0	110'000
甘油[%]	3.000 %
Tricine pH 8.0	50'000
Igepal [%]	0.024 %
dGTP	337.5
dATP	337.5
dCTP	337.5
dUTP	675
选自SEQ ID NO 1-35的引物/探针	0.1-0.15
SEQ ID NO 42	0.1
SEQ ID NO 43	0.1
SEQ ID NO 44	0.1
尿嘧啶-N-糖基化酶	10 (U/反应)
Z05-D聚合酶	40 (U/反应)

[0414]

NTQ21-46A -适体	0.222
水	

[0415] 对于HBV:

[0416]

R2 试剂	浓度/50 μ l-PCR	
H ₂ O	100	%
Tricine 7.7	40	mM
Tween	0.03	% (v/v)
甘油	5	% (v/v)
KOH	25.2	mM
KOAc	121.8	mM
NTQ21-46A (适体)	0.2625	μ M
dGTP	0.42	μ M
dATP	0.42	μ M
dCTP	0.42	μ M
dUTP	0.84	μ M
SEQ ID NO 36	1.2	μ M
SEQ ID NO 37	0.1	μ M
SEQ ID NO 38	1.2	μ M
SEQ ID NO 42	0.6	μ M
SEQ ID NO 43	0.6	μ M
SEQ ID NO 44	0.15	μ M
Z05D聚合酶	35	(U/反应)
尿嘧啶-N-糖基化酶	2	(U/反应)
叠氮化钠	0.027	% (m/v)
R1 试剂	浓度/50 μ l-PCR	
H ₂ O	100	%
MgOAc	2.5	mM
MnOAc pH6.1	2.5	mM
叠氮化钠	0.018	% (m/v)

[0417] 对于CT:

[0418]

R1试剂	浓度/50 μ l-PCR
水 (PCR级)	
Mn (Ac) ₂ (在0.002% (V/V) 冰醋酸中pH 6.5)	2.7mM
NaN ₃	0.0135% (W/V)
R2试剂	浓度/50 μ l-PCR
NaN ₃ /Ri, 用10mM Tris (pH7) 缓冲[%]	0.0315%
乙酸钾	112.4mM
甘油[%]	3.5%
Tricine	61mM
氢氧化钾	28.4mM
dGTP	525uM
dATP	525uM
dCTP	525uM
dUTP	1.05mM
SEQ ID NO 39	750nM
SEQ ID NO 40	600nM
SEQ ID NO 41	116nM
适体NTQ-46A	175nM
尿嘧啶-N-糖基化酶	5U/反应
Z05-D聚合酶	31U/反应

[0419] 对于扩增和检测, 将微孔板用自动化板密封器 (见上文) 密封, 并将板转 移到 LightCycler 480 (见上文)。

[0420] 使用下列PCR概况:

[0421] 热循环概况

[0422]

程序名称	目标 (°C)	采集模式	保持 (时:分:秒)	变速速率 (°C/s)	循环	分析模式
预PCR	50	无	00:02:00	4.4	1	无
	94	无	00:00:05	4.4		

[0423]

	55	无	00:02:00	2.2		
	60	无	00:06:00	4.4		
	65	无	00:04:00	4.4		
第一次测量	95	无	00:00:05	4.4	5	量化
	55	单一	00:00:30	2.2		
第二次测量	91	无	00:00:05	4.4	45	量化
	58	单一	00:00:25	2.2		
冷却	40	无	00:02:00	2.2	1	无

[0424] 检测形式(手动)

[0425]

滤光器组合	积分时间(秒)
435-470	1
495-525	0.5
540-580	0.5
610-645	0.5
680-700	1

[0426] 预PCR程序包含起始变性和于55、60和65℃温育以逆转录RNA模板。于三个温度温育组合如下的有利效果,即于较低的温度,也转录略有错配的靶序列(诸如生物体的遗传变体),而于较高的温度,抑制RNA二级结构的形成,如此导致更有效的转录。

[0427] 将PCR循环分成两次测量,其中两次测量都应用一步设置(组合退火和延伸)。于55℃的前5个循环通过预扩增略有错配的靶序列允许升高的包容性,而第二次测量的45个循环通过使用58℃的退火/延伸温度提供升高的特异性。

[0428] 对上文提及的微孔板上包含的所有样品使用此概况,在所有样品中都实现了扩增和检测,如图2a至2g中描绘的。这显示也成功实施了扩增前的样品制备。

[0429] 为了清楚,在图2a至2g中分开描绘了定性和定量HIV内部对照以及定量HBV内部对照的结果。可以看到的是,在所有情况中也成功扩增了对照。通过与充当定量标准的内部对照核酸比较来计算定量设置中HIV和HBV靶物的定量。

[0430] 实施例2:

[0431] 在别的实验中,但在相同条件下对多种不同靶核酸实施上文中描述的通用扩增方法。如在实施例1下描述的,实施相应核酸的分离。

[0432] 相应的通用内部对照核酸选自SEQ ID NO 45-49,并且是装甲RNA(对于RNA靶物)和λ包装的DNA(对于DNA靶物)。对于定性RNA测定法,每份样品添加300个颗粒,对于定量RNA测定法,每份样品添加3000个颗粒,而对于所有DNA测定法,每份样品添加500个颗粒。

[0433] 对所有靶物使用下列PCR概况:

[0434]

		目标 [°C]	采集模式	平台 [时:分:秒]	测量 [时:分:秒]	变速速率 [°C/s]
预 PCR	UNG 步骤	50	无	00:02:00	00:00:00	2.2
	UNG/ 模板变性	94	无	00:00:05	00:00:00	4.4
	RT 步骤	55	无	00:02:00	00:00:00	2.2
		60	无	00:06:00	00:00:00	4.4
		65	无	00:04:00	00:00:00	4.4
第一次测量		95	无	00:00:05	00:00:00	4.4
		55	单一	00:00:30	00:00:08	2.2
第二次测量		91	无	00:00:05	00:00:00	4.4
		58	单一	00:00:25	00:00:08	2.2
冷却		40	无	00:02:00	00:00:00	2.2

[0435]

名称	循环
预PCR	1
第一次测量	5
第二次测量	45
冷却	1

[0436] 详细地,实施以下实验:

[0437] 1. 对HBV、HCV和HIV的定性多重分析

[0438] a. 主混合物

[0439] R1:

[0440]

	50u1-PCR中的浓度 (uM)
Mn (Ac) 2*4H2O (用乙酸调节为pH 6.1)	3' 300
NaN3/Ri, 用10mM Tris (pH7) 缓冲	0.018
	pH:6.41

[0441] R2:

[0442]

试剂	50u1-PCR中的浓度 (uM)
DMSO (%)	5.4
NaN3/Ri, 用10mM Tris (pH7) 缓冲	0.027
KOAc (pH 7.0)	120' 000

甘油 (%)	3
Tween 20 (%)	0.015
Tricine pH 8.0	60' 000
NTQ21-46A-适体	0.2222
尿嘧啶-N-糖基化酶 (U/uL)	0.2
dGTP	400.0
dATP	400.0
dCTP	400.0
dUTP	800.0
Z05-D聚合酶 (U/uL) *	0.9
选自SEQ ID NO 1-35的引物/探针	0.125-0.3
SEQ ID NO 36	0.100
SEQ ID NO 37	0.100
SEQ ID NO 38	0.150
选自SEQ ID NO 60-76的引物/探针	0.050-0.250
SEQ ID NO 42	0.200
SEQ ID NO 43	0.200
SEQ ID NO 44	0.100

[0443] 分析灵敏度/LOD

[0444] 对于每种检测的病毒 (HIV-1M组、HIV-10组、HIV-2、HBV和HCV)，对于EDTA-血浆，于处于预期LOD及其左右的数个浓度/水平。以每个浓度至少20个有效重复，每个病毒和浓度测试一个组。通过Probit分析测定LOD (参见表1-5)。

[0445] HIV

[0446] 表1:来自单个组的HIV-1M组命中率和Probit LOD

[0447]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
32 cp/mL	21	21	100 %
16 cp/mL	21	21	100 %
8 cp/mL	21	21	100 %
4 cp/mL	21	20	95 %
2 cp/mL	21	15	71 %
1 cp/mL	21	9	43 %
0 cp/mL (阴性对照)	12	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			4.06 cp/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			2.85-9.24 cp/mL

[0448] 将HIV-1M组的WHO标准的滴度转化为IU/mL。

$$[0449] \quad \text{滴度}(\ln \frac{\text{IU}}{\text{mL}}) = \frac{\text{滴度}(\ln \frac{\text{cp}}{\text{mL}})}{0.6}$$

[0450] 因此,HIV-1M组LOD (以 IU/mL计) 是

[0451] 通过Probit分析 (95%命中率) 得到的LOD:6.77IU/mL

[0452] 通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间:4.75-15.4IU/mL

[0453] 表2:来自单个组的HIV-10组命中率和Probit LOD

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
60 cp/mL	21	21	100 %
30 cp/mL	20	20	100 %
[0454] 20 cp/mL	21	21	100 %
14 cp/mL	21	19	90 %
7 cp/mL	21	15	71 %
4.5 cp/mL	21	12	57 %
0 cp/mL (阴性对照)	12	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			14.9 cp/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			10.9-31.5 cp/mL

[0456] 将HIV-10组的一级标准品的滴度再分配给CBER HIV-10组的组;计算 因子是0.586。

[0457] 因此,HIV-10组LOD是

[0458] 通过Probit分析 (95%命中率) 得到的LOD:8.8cp/mL

[0459] 通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间:6.4-18.5cp/mL

[0460] 表3:来自单个组的HIV-2命中率和Probit LOD

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
4 cp/mL	21	21	100 %
2 cp/mL	21	21	100 %
1 cp/mL	21	20	95 %
0.5 cp/mL	21	13	62 %
[0461] 0.25 cp/mL	21	13	62 %
0.125 cp/mL	21	7	33 %
0 cp/mL (阴性对照)	12	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			1.29 cp/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			0.82-3.11 cp/mL

[0462] 将HIV-2的一级标准品的滴度再分配给CBER HIV-2组;计算因子是26.7。

[0463] 因此,HIV-2LOD是

[0464] 通过Probit分析 (95%命中率)得到的LOD:34.44cp/mL

[0465] 通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间:21.89-83.04cp/mL

[0466] HBV

[0467] 表4:来自单个组的HBV命中率和Probit LOD

[0468]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
7.6 IU/mL	21	21	100 %
3.8 IU/mL	21	21	100 %

[0469]

1.9 IU/mL	21	20	95 %
0.95 IU/mL	21	14	67 %
0.6 IU/mL	19	12	63 %
0.4 IU/mL	21	12	57 %
0 IU/mL (阴性对照)	12	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			2.27 IU/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			1.48-6.54 IU/mL

[0470] HCV

[0471] 表5:来自单个组的HCV命中率和Probit LOD

[0472]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
24 IU/mL	21	21	100 %
12 IU/mL	21	21	100 %
6 IU/mL	21	21	100 %
3 IU/mL	21	17	81 %
1.5 IU/mL	21	14	67 %
0.75 IU/mL	21	9	43 %
0 IU/mL (阴性对照)	18	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			4.76 IU/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			3.14-11.61 IU/mL

[0473] 2.对WNV的定性分析

[0474] 主混合物

[0475] R1:

[0476]

试剂	50ul-PCR中的浓度 (uM)
Mn (Ac) 2*4H2O (用乙酸调节为pH 6.1)	3' 300
NaN3/Ri, 用10mM Tris (pH7) 缓冲	0.018
	pH:6.41

[0477] R2:

[0478]

试剂	50ul-PCR中的浓度(uM)
----	------------------

[0479]

DMSO (%)	5.4
NaN3/Ri, 用10 mM Tris (pH7)缓冲	0.027
乙酸钾pH 7.0	120'000
甘油(%)	3
Tween 20 (%)	0.015
Tricine pH 8.0	60'000
NTQ21-46A -适体	0.2222
尿嘧啶-N-糖基化酶(U/uL)	0.2
dGTP	400.0
dATP	400.0
dCTP	400.0
dUTP	800.0
ZO5-D聚合酶(U/ul)*	0.9
选自SEQ ID NO 53-59的引物/探针	0.08-0.4
SEQ ID NO 42	0.150
SEQ ID NO 43	0.150
SEQ ID NO 44	0.100

[0480] 分析灵敏度/LOD

[0481] 对于病毒(WNV、SLEV和JEV),以稀释系列制备独立组,包括处于预期 LOD及其左右的数种浓度/水平的相应标准品。以每个浓度至少20个有效重 复,每个病毒和浓度测试一个组。通过Probit分析测定LOD。

[0482] 表6:来自单个组的WNV命中率和Probit LOD

[0483]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
20 cp/mL	21	21	100 %
12 cp/mL	21	21	100 %
8 cp/mL	21	21	100 %
5 cp/mL	21	17	81 %
2.5 cp/mL	21	15	71.4 %
0.5 cp/mL	21	1	4.8 %
0 cp/mL (阴性对照)	12	0	0 %

[0484]

通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD		6.57 cp/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间		4.74-11.03 cp/mL

[0485] 表7:来自单个组的SLEV命中率和Probit LOD

[0486]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
140 cp/mL	21	21	100 %
100 cp/mL	21	20	95.2 %
70 cp/mL	21	20	95.2 %
40 cp/mL	21	17	81.0 %
20 cp/mL	21	11	52.4 %
10 cp/mL	21	6	28.6 %
0 cp/mL (阴性对照)	12	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			78.9 cp/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			55.4-145.7 cp/mL

[0487] 表8:来自单个组的JEV命中率和Probit LOD

[0488]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
20 cp/mL	21	20	95.2 %
12 cp/mL	21	20	95.2 %
8 cp/mL	21	18	85.7 %
5 cp/mL	21	17	81.0 %
2.5 cp/mL	21	14	66.7 %
0.5 cp/mL	21	2	9.52 %
0 cp/mL (阴性对照)	12	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			13.55 cp/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			8.78-27.7 cp/mL

[0489] 3. 对HBV的定量分析

[0490] 主混合物

[0491] R1:

[0492]

试剂	50u1-PCR中的终浓度 (uM)
Mn (Ac) 2*4H2O (用乙酸调节为pH 6.1)	3' 300
NaN3/Ri, 用10mM Tris (pH7) 缓冲	0.018
	pH:6.41

[0493] R2:

[0494]

试剂	50u1-PCR中的终浓度 (uM)
甘油 (% ,w/v)	3%
Tricine	60mM
DMSO (% ,v/v)	5.4%
KOAc	120mM
Tween 20 (v/v)	0.015%
适体NTQ21-46A	0.222μM
Z05D聚合酶	0.9U/μL (45U/rxn)
尿嘧啶-N-糖基化酶	0.2U/μL (10U/rxn)
叠氮化钠 (w/v)	0.027%
dCTP	400μM
dGTP	400μM
dATP	400μM
dUTP	800μM

SEQ ID NO 36	1.2μM
SEQ ID NO 37	1.2μM
SEQ ID NO 50	0.6μM
SEQ ID NO 51	0.6μM
SEQ ID NO 38	0.1μM
SEQ ID NO 52	M

[0495] 分析灵敏度/LOD

[0496] 用HBV二级标准品(代表基因型A)制备四个稀释组,即在HBV阴性血清中两个(对于200μL和500μL的样品输入体积),以及在HBV阴性EDTA-血浆中两个(对于200μL和500μL的样品输入体积)。每组包括处于预期LOD及其左右的7个浓度水平。以每个浓度水平 ≥ 21 个重复,每个基质测试一个组。至少20个重复需要是有效的。通过 $\geq 95\%$ 命中率的Probit分析以及通过 $\geq 95\%$ 命中率分析测定LOD。

[0497] 表9:对EDTA血浆中200μL输入体积的LOD分析。*

[0498]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
25 IU/mL	41	41	100 %
15 IU/mL	41	39	95.1 %
10 IU/mL	41	40	97.6 %
7 IU/mL	41	40	97.6 %
4 IU/mL	24	20	83.3 %
1 IU/mL	24	4	16.7 %
0 IU/mL (阴性对照)	24	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			8.2 IU/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			4.8-26.0 IU/mL

[0499] *测试额外的重复以使观察到的95%置信区间变窄。

[0500] 表10:对EDTA血浆中500μL输入体积的LOD分析

[0501]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
10 IU/mL	21	21	100 %
7 IU/mL	21	21	100 %
4 IU/mL	21	21	100 %
2.5 IU/mL	21	20	95.2 %
1 IU/mL	21	14	66.7 %
0.2 IU/mL	21	1	4.8 %
0 IU/mL (阴性对照)	21	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			2.3 IU/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			1.6-4.2 IU/mL

[0502] 表11:对血清中200 μ L输入体积的LOD分析

[0503]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
25 IU/mL	21	21	100 %

[0504]

15 IU/mL	21	20	95.2 %
10 IU/mL	21	21	100 %
7 IU/mL	21	20	95.2 %
4 IU/mL	21	15	71.4 %
1 IU/mL	21	8	38.1 %
0 IU/mL (阴性对照)	21	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			9.4 IU/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			6.2-19.0 IU/mL

[0505] 表12:对血清中500 μ L输入体积的LOD分析

[0506]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
10 IU/mL	21	21	100 %
7 IU/mL	21	21	100 %
4 IU/mL	21	21	100 %
2.5 IU/mL	21	16	76.2 %
1 IU/mL	21	16	76.2 %
0.2 IU/mL	21	7	33.3 %
0 IU/mL (阴性对照)	21	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			4.1 IU/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			2.4-10.0 IU/mL

[0507] 汇总的LOD:

[0508] EDTA-血浆:对于EDTA血浆,于95%命中率的Probit分析产生8.2IU/mL (对于200 μ L样品输入体积)和2.3IU/mL (对于500 μ L样品输入体积)的LOD。

[0509] 这些浓度的95%置信区间范围是4.8-26.0IU/mL (对于200 μ L样品输入体积)和1.6-4.2IU/mL (对于500 μ L样品输入体积)。

[0510] 血清:对于血清,于95%命中率的Probit分析产生9.02IU/mL (对于200 μ L样品输入体积)和4.1IU/mL (对于500 μ L样品输入体积)的LOD。

[0511] 这些浓度的95%置信区间范围是6.2-19.0IU/mL (对于200 μ L样品输入体积)和2.4-10.0IU/mL (对于500 μ L样品输入体积)。

[0512] 线性

[0513] 通过使用HBV基因型A (由RMD Research Pleasanton提供,线性化质粒, pHBV-PC_ADW2) 制备一个EDTA血浆组和一个血清组。以12个浓度水平分析每组以测定测定法的预期动力学范围 (4-2E+09IU/mL)。所有浓度水平/组成员 (PM) 都以21个重复测试。

[0514] 用500 μ L样品输入体积完成此研究。如下选择浓度水平:一个水平低于预期的定量下限 (LLOQ), 一个处于预期的LLOQ, 一个高于预期的LLOQ, 数个浓度处于中间水平, 处于预期的定量上限 (ULOQ), 而一个高于预期的 ULOQ:

[0515] PM 12-2.0E+09IU/mL-高于预期的ULOQ

[0516] PM 11-1.0E+09IU/mL-处于预期的ULOQ

[0517] PM 10-1.0E+08IU/mL-低于预期的ULOQ

[0518] PM 9-1.0E+07IU/mL-中间浓度水平

[0519] PM 8-1.0E+06IU/mL-中间浓度水平

[0520] PM 7-1.0E+05IU/mL-中间浓度水平

[0521] PM 6-1.0E+04IU/mL-中间浓度水平

[0522] PM 5-1.0E+03IU/mL-中间浓度水平

[0523] PM 6a-2.0E+02IU/mL-中间浓度水平(将PM 6稀释到2.0E+02IU/mL, 用于血清组的滴度分配)

[0524] PM 4-1.0E+02IU/mL-中间浓度水平(也用于血浆组的滴度分配)

[0525] PM 3-5.0E+01IU/mL-高于预期的LLOQ

[0526] PM 2-1.0E+01IU/mL-处于预期的LLOQ

[0527] PM 1-4.0E+00IU/mL-低于预期的LLOQ

[0528] 对于线性组的每份有效样品,将观察到的HBV DNA滴度转化为log10滴度,并且对每个浓度水平计算均值log10滴度。

[0529] 表13:EDTA血浆中的线性

[0530]

名义滴度 (IU/mL)	分配的滴度 (IU/mL)	分配的 Log10滴度	均值Log 10 观察到的滴度	重复
4.00E+00	3.50E+00	0.54	0.52	17
1.00E+01	8.70E+00	0.94	0.91	21
5.00E+01	4.40E+01	1.64	1.69	21

[0531]

1.00E+02	8.70E+01	1.94	2.04	21
1.00E+03	8.70E+02	2.94	3.01	21
1.00E+04	8.70E+03	3.94	3.9	21
1.00E+05	8.70E+04	4.94	4.88	21
1.00E+06	8.70E+05	5.94	5.87	21
1.00E+07	8.70E+06	6.94	6.92	21
1.00E+08	8.70E+07	7.94	8.01	21
1.00E+09	8.70E+08	8.94	9.04	21
2.00E+09	1.70E+09	9.24	9.38	21

[0532] 在图13中显示了此结果的图形。

[0533] 表14:血清中的线性

[0534]

名义滴度 (IU/mL)	分配的滴度 (IU/mL)	分配的 Log10滴度	均值Log 10 观察到的滴度	重复
4.00E+00	3.30E+00	0.52	0.7	21
1.00E+01	8.30E+00	0.92	0.99	21
5.00E+01	4.10E+01	1.62	1.73	21
1.00E+02	8.30E+01	1.92	2.03	21
1.00E+03	8.30E+02	2.92	2.93	21
1.00E+04	8.30E+03	3.92	3.8	21
1.00E+05	8.30E+04	4.92	4.78	21
1.00E+06	8.30E+05	5.92	5.75	21
1.00E+07	8.30E+06	6.92	6.73	21
1.00E+08	8.30E+07	7.92	7.78	21
1.00E+09	8.30E+08	8.92	8.92	21
2.00E+09	1.70E+09	9.22	9.22	21

[0535] 在图14中显示了此结果的图形。

[0536] 汇总的线性：

[0537] 线性范围（其定义为均值log10观察到的滴度的log10偏差在log10名义滴度±0.3内的浓度范围）测定为：对于EDTA-血浆为3.5E+00IU/mL-1.7E+09 IU/mL，而对于血清为3.3E+00IU/mL-1.7E+09IU/mL。发现定量下限为：对于EDTA-血浆和血清为4.0E+00IU/mL。

[0538] 4. 对HCV的定量分析

[0539] 主混合物

[0540] R1：

[0541]

试剂	50u1-PCR中的终浓度 (uM)
Mn (Ac) 2*4H2O (用乙酸调节为pH 6.1)	3' 300
NaN3/Ri, 用10mM Tris (pH7) 缓冲	0.018
	pH:6.41

[0542] R2：

[0543]

试剂	50u1-PCR (uM) 中的终浓度
甘油 (% ,w/v)	3%
Tricine	60mM
DMSO (% ,v/v)	5.4%
KOAc	120mM

吐温20 (v/v)	0.015%
NTQ21-46A	0.222μM
Z05D	0.9U/μL (45U/rxn)
UNG	0.2U/μL (10U/rxn)
叠氮化钠 (w/v)	0.027
dCTP	400μM
dGTP	400μM
dATP	400μM
dUTP	800μM
选自SEQ ID NO 60-76的引物/探针	0.1μM
SEQ ID NO 42	0.3μM
SEQ ID NO 43	0.3μM
SEQ ID NO 44	μM

[0544] 分析灵敏度/LOD

[0545] 使用200μL和500μL的样品输入体积,在HCV阴性EDTA血浆和血清中用 Roche HCV 二级标准品制备稀释组。以21个重复测试每个浓度水平。至少≥20 个重复必须是有效的。通过于95%命中率的Probit分析及通过≥95%命中率分析测定LOD。

[0546] 表15:在EDTA血浆的200μL样品加工输入体积情况中的命中率和Probit

[0547]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
55 IU/mL	21	21	100 %
38 IU/mL	21	21	100%
25 IU/mL	21	20	95 %
12.5 IU/mL	21	19	90 %
6 IU/mL	21	15	71 %
3 IU/mL	21	6	29 %
0 IU/mL (阴性对照)	21	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			17.4 IU/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			12.1-34.3 IU/mL

[0548] 表16:在EDTA血浆的500μL样品加工输入体积情况中的命中率和Probit

[0549]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
22 IU/mL	21	21	100 %
15 IU/mL	21	21	100%
10 IU/mL	20	20	100 %
5 IU/mL	21	19	76 %
2.5 IU/mL	21	15	71 %
1 IU/mL	21	6	57 %
0 IU/mL (阴性对照)	21	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			9.0 IU/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			5.5-25.4 IU/mL

[0550] 表17:在血清的200 μ L样品加工输入体积情况中的命中率和Probit

[0551]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
55 IU/mL	21	21	100 %
38 IU/mL	21	21	100%

[0552]

25 IU/mL	21	20	95 %
12.5 IU/mL	21	18	86 %
6 IU/mL	21	13	62 %
3 IU/mL	21	6	29 %
0 IU/mL (阴性对照)	21	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			20.2 IU/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			14.0-39.3 IU/mL

[0553] 表18:在血清的500 μ L样品加工输入体积情况中的命中率和Probit

[0554]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
22 IU/mL	21	21	100 %
15 IU/mL	21	21	100%
10 IU/mL	21	20	95 %
5 IU/mL	21	18	86 %
2.5 IU/mL	21	12	57 %
1 IU/mL	21	4	19 %
0 IU/mL (阴性对照)	21	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			8.2 IU/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			5.8-15.0 IU/mL

[0555] 汇总的LOD:

[0556] 1.对于EDTA血浆,于95%命中率的Probit分析产生17.4IU/mL (对于 200 μ L样品加工输入体积)和9.0IU/mL (对于500 μ L样品加工输入体积)的 LOD。这些浓度的95%置信区间是12.1-34.3IU/mL (对于200 μ L样品加工输入 体积)和5.5-25.4IU/mL (对于500 μ L样品加工输入体积)。

[0557] 2.对于血清,于95%命中率的Probit分析值是20.2IU/mL (对于200 μ L样品加工输入体积)和8.2IU/mL (对于500 μ L样品加工输入体积)。这些浓度的 95%置信区间是14.0-39.3IU/mL (对于200 μ L样品加工输入体积)和5.8-15.0 IU/mL (对于500 μ L样品加工输入体积)。

[0558] 线性

[0559] 分析起源于HCV WHO标准品的HCV aRNA的EDTA-血浆组的制备物和 血清组的制备物。通过连续稀释制备线性组,并在10个不同浓度分析。用 500 μ L样品加工输入体积完成该研究。如下选择浓度:一个水平低于预期的 量化下限 (LLoQ),一个处于LLoQ,一个高于LLoQ,数个浓度处于中间水平, 处于预期的量化上限 (ULoQ),而一个处于或高于ULoQ。对于所有浓度,测试21个重复。

[0560] PM 1-2.0E+08IU/mL-高于预期的ULoQ

[0561] PM 2-1.0E+08IU/mL-处于预期的ULoQ

[0562] PM 3-1.0E+07IU/mL-低于预期的ULoQ

[0563] PM 4-1.0E+06IU/mL-中间浓度水平

[0564] PM 5-1.0E+05IU/mL-中间浓度水平

[0565] PM 6-1.0E+04IU/mL-用于滴度分配的中间浓度水平

[0566] PM 7-1.0E+03IU/mL-中间浓度水平

[0567] PM 8-1.0E+02IU/mL-高于预期的LLoQ

[0568] PM 9-1.0E+01IU/mL-处于预期的LLoQ

[0569] PM 10-8.0E+00IU/mL-低于预期的LLOQ

[0570] 表19:EDTA血浆中的线性

[0571]

名义滴度 (IU/mL)	分配的滴度 (IU/mL)	分配的 Log10滴度	均值Log 10 观察到的滴度	重复
8.00E+00	4.87E+00	0.7	0.6	15
1.00E+01	6.09E+00	0.8	0.8	17
1.00E+02	6.09E+01	1.8	1.7	21
1.00E+03	6.09E+02	2.8	2.8	21
1.00E+04	6.09E+03	3.8	3.8	21
1.00E+05	6.09E+04	4.8	4.7	21/20
1.00E+06	6.09E+05	5.8	5.6	21/20
1.00E+07	6.09E+06	6.8	6.7	21
1.00E+08	6.09E+07	7.8	7.8/7.7	21/18
2.00E+08	1.22E+08	8.1	8	21/20

[0572] 在图15中显示了此结果的图形。

[0573] 表20:血清中的线性

[0574]

名义滴度 (IU/mL)	分配的滴度 (IU/mL)	分配的 Log10滴度	均值Log 10 观察到的滴度	重复
8.00E+00	3.90E+00	0.6	0.7	10
1.00E+01	4.96E+00	0.7	0.7	14
1.00E+02	4.96E+01	1.7	1.6	21
1.00E+03	4.96E+02	2.7	2.8	21
1.00E+04	4.96E+03	3.7	3.7	21
1.00E+05	4.96E+04	4.7	4.7	21
1.00E+06	4.96E+05	5.7	5.7	21
1.00E+07	4.96E+06	6.7	6.7	21
1.00E+08	4.96E+07	7.7	7.7	21
2.00E+08	9.92E+07	8	8.1	21

[0575] 在图16中显示了此结果的图形。

[0576] 汇总的线性:

[0577] 线性范围 (其定义为均值 $\log_{10}$ 观察到的滴度的 $\log_{10}$ 偏差在 $\log_{10}$ 名义滴度 ± 0.3 内的浓度范围) 测定为: 对于EDTA-血浆为 $4.87\text{E}+00\text{IU/mL}$ - $1.22\text{E}+08\text{ IU/mL}$, 而对于血清为 $3.90\text{E}+00\text{IU/mL}$ - $9.92\text{E}+07\text{IU/mL}$ 。

[0578] 5. 对HIV的定量分析

[0579] 主混合物

[0580] R1:

[0581]

试剂	50 μL -PCR中的终浓度 (μM)
Mn (Ac) 2*4H ₂ O (用乙酸调节为pH 6.1)	3' 300
NaN ₃ /Ri, 用10mM Tris (pH7) 缓冲	0.018
	pH:6.41

[0582] R2:

[0583]

试剂	50 μL -PCR中的终浓度(μM)
甘油(%, w/v)	3%
Tricine	60 mM
DMSO (%, v/v)	5.4%

[0584]

KOAc	120 mM
Tween 20 (v/v)	0.02%
适体NTQ21-46 A	0.222 μM
ZO5D聚合酶	0.9 U/ μL (45 U/rxn)
UNG	0.2 U/ μL (10 U/rxn)
叠氮化钠(w/v)	0.027
dCTP	400 μM
dGTP	400 μM
dATP	400 μM
dUTP	800 μM
选自SEQ ID NO 1-35的引物/探针	0.1 μM -0.3 μM
SEQ ID NO 50	0.3 μM
SEQ ID NO 51	0.3 μM
SEQ ID NO 52	μM

[0585] 分析灵敏度/LOD

[0586] 对于200 μL 和500 μL 样品输入体积, 在HIV-1阴性EDTA血浆中用HIV-1M 二级标准品

制备稀释组。以21个重复测试每个浓度水平。至少 ≥ 20 个重复必须是有效的。通过于95%命中率的Probit分析及通过 $\geq 95\%$ 命中率分析测定 LOD。

[0587] 表21:对EDTA-血浆中200 μ L输入体积的LOD分析

[0588]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
200 cp/mL	21	21	100 %
100 cp/mL	21	21	100 %
80 cp/mL	21	21	100 %
50 cp/mL	21	20	95.2 %
30 cp/mL	21	18	85.7 %
20 cp/mL	21	17	81.0 %
10 cp/mL	21	8	38.1 %
0 cp/mL (阴性对照)	21	0	0 %

[0589]

通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD		41.8 cp/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间		30.9-74.9 cp/mL

[0590] 表22:对500 μ L输入体积的LOD分析

[0591]

浓度	重复数目	阳性数目	命中率
30 cp/mL	21	21	100 %
25 cp/mL	21	20	95.2 %
20 cp/mL	21	21	100 %
13.5 cp/mL	21	18	85.7 %
9 cp/mL	21	13	61.9 %
6 cp/mL	21	9	42.9 %
0 cp/mL (阴性对照)	21	0	0 %
通过Probit分析(95%命中率)得到的LOD			18.9 cp/mL
通过Probit分析得到的LOD的95%置信区间			14.9-29.4 cp/mL

[0592] 汇总的LOD:

[0593] 1. 于95%命中率的Probit分析产生41.8cp/mL (对于200 μ L输入体积) 和 18.9cp/

mL (对于500 μ L输入体积)的LOD。

[0594] 2. 这些浓度的95%置信区间是30.9–74.9cp/mL (对于200 μ L输入体积) 和 14.9–29.4cp/mL (对于500 μ L输入体积)。

[0595] 线性

[0596] 在线性/动力学范围/准确度研究中使用的样品由HIV-1细胞培养物上清液材料HIV-1M组B亚型的稀释组组成。

[0597] 通过连续稀释制备线性组。在10个浓度水平分析此组。

[0598] 如下选择浓度：一个水平低于预期的定量下限 (LLOQ)，一个处于LLOQ，一个高于LLOQ，数个浓度处于中间水平，处于预期的定量上限 (ULOQ)，而一个高于ULOQ。对于所有浓度，测试21个重复。用500 μ L输入体积完成该线性研究：

[0599] PM 1–2.0E+07cp/mL–高于预期的ULOQ

[0600] PM 2–1.0E+07cp/mL–处于预期的ULOQ

[0601] PM 3–1.0E+06cp/mL–低于预期的ULOQ

[0602] PM 4–1.0E+05cp/mL–中间浓度水平

[0603] PM 5–3.0E+04cp/mL–用于滴度分配的中间浓度水平

[0604] PM 6–1.0E+04cp/mL–中间浓度水平

[0605] PM 7–1.0E+03cp/mL–中间浓度水平

[0606] PM 8–1.0E+02cp/mL–中间浓度水平

[0607] PM 9–5.0E+01cp/mL–高于预期的LLOQ

[0608] PM 10–2.0E+01cp/mL–处于预期的LLOQ

[0609] PM 11–1.5E+01cp/mL–低于预期的LLOQ

[0610] 表23:EDTA血浆中的线性

[0611]

名义滴度 (cp/mL)	分配的滴度 (cp/mL)	分配的 Log10滴度	均值Log 10 观察到的滴度	重复
1.50E+01	1.50E+01	1.2	1.3	21
2.00E+01	2.00E+01	1.3	1.5	21
5.00E+01	5.10E+01	1.7	1.8	21
1.00E+02	1.00E+02	2	2	21
1.00E+03	1.00E+03	3	3	21
1.00E+04	1.00E+04	4	4	21
1.00E+05	1.00E+05	5	5	21
1.00E+06	1.00E+06	6	6	21
1.00E+07	1.00E+07	7	7	21
2.00E+07	2.00E+07	7.3	7.4	21

[0612] 在图17中显示了此结果的图形。

[0613] 汇总的线性

[0614] 线性范围 (其定义为均值 $\log_{10}$ 观察到的滴度的 $\log_{10}$ 偏差在 $\log_{10}$ 名义滴 度 ± 0.3 内的浓度范围) 测定为 $1.5\text{E}+01\text{cp/mL}$ - $2.0\text{E}+07\text{cp/mL}$ 。

序列表

<110> 霍夫曼-拉罗奇有限公司 (F. HOFFMANN- LA ROCHE AG)

<120> 通用样品制备

<130> 26551 EP1

<160> 76

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物/探针

<400> 1

agtgggggga catcaagcag ccatgcaaa

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物/探针

<400> 2

agtgggggga catcaagcag ccatgcaaat

30

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物/探针

<400> 3

gctttcagcc cagaagtaat acc

23

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物/探针

<400> 4

ggacacatca agcagccatg caaat

25

<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 5	
agagaaccaa ggggaagtga	20
<210> 6	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 6	
ataatccacc tatcccagta ggagaaat	28
<210> 7	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 7	
agtgggggga caccaggcag caatgcaaa	29
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 8	
catagcagga actactagta	20
<210> 9	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 9	

ggtactagta gttcctgcta tgcacttcc	30
<210> 10	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 10	
ctatgtcact tccccttggt tctct	25
<210> 11	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 11	
ggtactagta gttcctgcta tatcacttcc	30
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 12	
tccttgtctt atgtccagaa	20
<210> 13	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 13	
tttggtcctt gtcttatgtc cagaatgc	28
<210> 14	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	

<400> 14	
tactagtagt tcctgctatg tcacttcc	28
<210> 15	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 15	
tgtgttatga tgggtgtttaa atc	23
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 16	
actctaaagg gttcctttgg	20
<210> 17	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 17	
tctgcagctt cctcattgat ggtatctttt aac	33
<210> 18	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 18	
tcagcattat cagaaggagc cacccca	29
<210> 19	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 引物/探针	
<400> 19	
tctgcagctt cctcattgag gtatctttta ac	32
<210> 20	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 20	
atcctgggat taaataaaat agtaagaatg tatagcccta c	41
<210> 21	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 21	
accatcaatg agggaagctg cagaatggg	29
<210> 22	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 22	
tgactctggt aactagagat ccetca	26
<210> 23	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 23	
tgttcaaccc tggatatctag agatccetca	30
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 24	
ggctaactag ggacccactg	20
<210> 25	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 25	
actaggaac ccactgct	18
<210> 26	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 26	
tcagcaagcc gagtcctgcg tcgaga	26
<210> 27	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 27	
ccgctaagcc gagccctttg cgtcgga	27
<210> 28	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 28	
ggtctgaggg atctcta	17
<210> 29	
<211> 24	
<212> DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 29	
ctgctagaga ttttccacac tgac	24
<210> 30	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 30	
ggctccacgc ttgcttgctt aaa	23
<210> 31	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 31	
ggctccacgc ttgcttgc	18
<210> 32	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 32	
ttcccaaagc aagaagggtc ctaacagacc a	31
<210> 33	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 33	
tctctagcag tggcgcccga acaggac	28
<210> 34	
<211> 34	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 34	
accagagtca cacaacagac gggcacacac tact	34
<210> 35	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 35	
tcctagtcgc cgcctggtca ttcggtgttc a	31
<210> 36	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 36	
catgcaactt tttcacctct gccta	25
<210> 37	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 37	
aactccacag tagctccaaa ttcttta	27
<210> 38	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 38	
ccaagctgtg ccttgggtgg ctttggggca tgg	33
<210> 39	

<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 39	
gggattcctg taacaacaag tca	23
<210> 40	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 40	
tcttccccag aacaataaga acac	24
<210> 41	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 41	
ggcttgcaga gttctatagt gctatg	26
<210> 42	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 42	
ttgatagcaa tcggctatcg actaa	25
<210> 43	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 43	
gcttcgatac tcagtcattt cggataaa	28

<210> 44	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 44	
tctctcgcca tctcctaccg cattggc	27
<210> 45	
<211> 269	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 体内对照核酸(internal control nucleic acid)	
<400> 45	
aattcaagct tagatctagc ttgacctgct tgatagcaat cggctatcga ctaatgactg	60
tctctggcggc ctctcgccat ctctcaccgc attggctcat aggtaagctc gctgtcaccc	120
agtacggagg tgccagtaga ttattagaga cagtcgccaa tcgatcggtta taccgagatg	180
actgagtatc gaagctacat tgtagccgca cataggacca cccatcttca tgttgaaaca	240
tgaggattac ccatgtggat ccaagcttg	269
<210> 46	
<211> 235	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 体内对照核酸(internal control nucleic acid)	
<400> 46	
gggctgcagg tcgactctag attctaagaa ttgatgggc ttttctact aattactatt	60
agtatatattgc catctttaac acttagaccg aagtgtgctg aagttccagt ggccggccca	120
gacctgggaa gttgcaagga cttaaaccgaa tgcaagcgat catatcttga aaaattataa	180
ccagaggatc gatgaaaaaa atttcttaga gctttggatc cccgggcgag ctccc	235
<210> 47	
<211> 350	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 体内对照核酸(internal control nucleic acid)	
<400> 47	
cgactctaga tgaaggagc cttagaacgg ggctgcgcta gctggcatca aagtcctca	60

gagctcaacc ctccaacgag gattcctgaa tactcgaaag tcagtgtgca gttactaaca 120
 acagctgctc gacctcgggg tctcgaacaa tccatacctg ctatcgctgc cttcagacat 180
 acggatgggc taggaggcaa gagctacctg tctcaacgaa ctatcggagt gggacccgat 240
 gaagctgtca gcgccacttc cggcggtaag gctttaaaac gcgcccgcg gttatcacgc 300
 gcggggagca cagcgcggac tgacgtgctg ggaagcacgc gttaaggatc 350

<210> 48

<211> 470

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 体内对照核酸(internal control nucleic acid)

<400> 48

cgactctaga aactgggtag taactgcggg ggcgatgat gcaggcttca gaaattaaac 60
 tcaatagtat ccggtgtctc aatctttttc gggccaggcg gcggtggacg acagacaatt 120
 ttacgatttt ggttcggtc acaaccgcgc catacatgtc aagaatgaag tgggcgaacg 180
 ctagaaaact gacgccagca attaatgag tcggggcgtg gtgactccca cgtaaaaagc 240
 ccctaccccg caccgttacg aagtatcaaa acgggacgcg cacgaaccga cgattggtac 300
 tgtataagcg gcccagcga ctcaaaatcc caagtgaatc tatgaaatct acatcgcggtt 360
 tataatctac ggggtgtaaa cggatgagaa ttggccaaac ggaggcacac acgcgtgcaa 420
 tgcgccgacc ctgagaaaag tatcatgtgc gtcggccaca ggatccccgg 470

<210> 49

<211> 350

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 体内对照核酸(internal control nucleic acid)

<400> 49

cgactctaga tgaaggagc cttagaacgg ggctgcgcta gctggcatca aagtccgtca 60
 gagctcaacc ctccaacgag gattcctgaa tactcgaaag tcagtgtgca gttactaaca 120
 acagctgctc gacctcgggg tctcgaacaa tccatacctg ctatcgctgc cttcagacat 180
 acggatgggc taggaggcaa gagctacctg tctcaacgaa ctatcggagt gggacccgat 240
 gaagctgtca gcgccacttc cggcggtaag gctttaaaac gcgcccgcg gttatcacgc 300
 gcggggagca cagcgcggac tgacgtgctg ggaagcacgc gttaaggatc 350

<210> 50

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物/探针

<400> 50	
acaaccgcgc catacatgtc aagaa	25
<210> 51	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 51	
gtcgggccgc ttatacagta ccaa	24
<210> 52	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 52	
gccagcaatt aagtgagtcg gggcgtggtg ac	32
<210> 53	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 53	
caacaaaaca gcatattgac acctgggagt agactaggag atcttctgct ct	52
<210> 54	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 54	
tctcctagtc tttcccaggt gtcaatatgc	30
<210> 55	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 引物/探针	
<400> 55	
ctgccccagg aggactgggt taacaaa	27
<210> 56	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 56	
tcctagtcta tcccaggtgt caa	23
<210> 57	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 57	
gtaagccctc agaaccgtct cggaa	25
<210> 58	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 58	
ggactagagg ttagaggaga ccccgagg	28
<210> 59	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 59	
aaggactaga ggtagagga gaccccgc	28
<210> 60	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 60	
aaaccactc tatgtccgt c	21
<210> 61	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 61	
gtacgccga attgccga a	21
<210> 62	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 62	
cctcaaagaa aaacaaaag a	21
<210> 63	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 63	
gcagaaagcg tctagccatg gcgtta	26
<210> 64	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 64	
gcagaaagcg tctagccatg gcgt	24
<210> 65	
<211> 21	
<212> DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 65	
tggcgtctcc cacgcggctg g	21
<210> 66	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 66	
ctttccccag gacctgccgg t	21
<210> 67	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 67	
gcaagcaccc tataggcagt accac	25
<210> 68	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 68	
ctcgcaagca ccctatcagg cagt	24
<210> 69	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 69	
gcaagcaccc tatcaggcag taccacaa	28
<210> 70	
<211> 27	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 70	
gcaagcaccc tatcaggcag taccaca	27
<210> 71	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 71	
ttgccggaaa gactgggtcc tttc	24
<210> 72	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 72	
ttgccggaaa gactgggtcc tttc	24
<210> 73	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 73	
ccagcccatc ccgaaagate ggcg	24
<210> 74	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 74	
tgtccggtca tttgggcg	18
<210> 75	

<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 75	
ccgggagagc catagtggtc tgcggaaccg gtc	33
<210> 76	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物/探针	
<400> 76	
tctctcgccc atctcctacc gcattggc	28

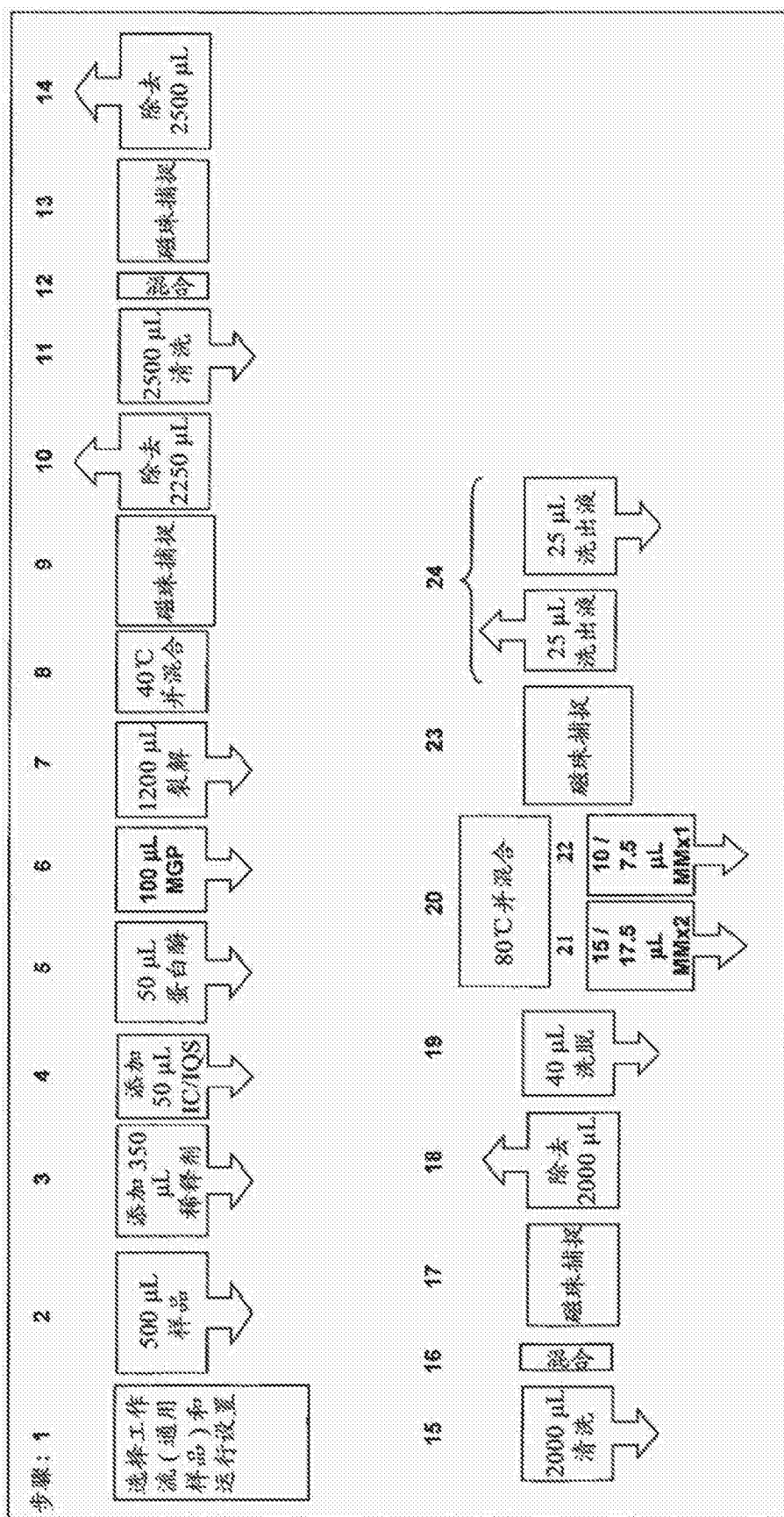


图1

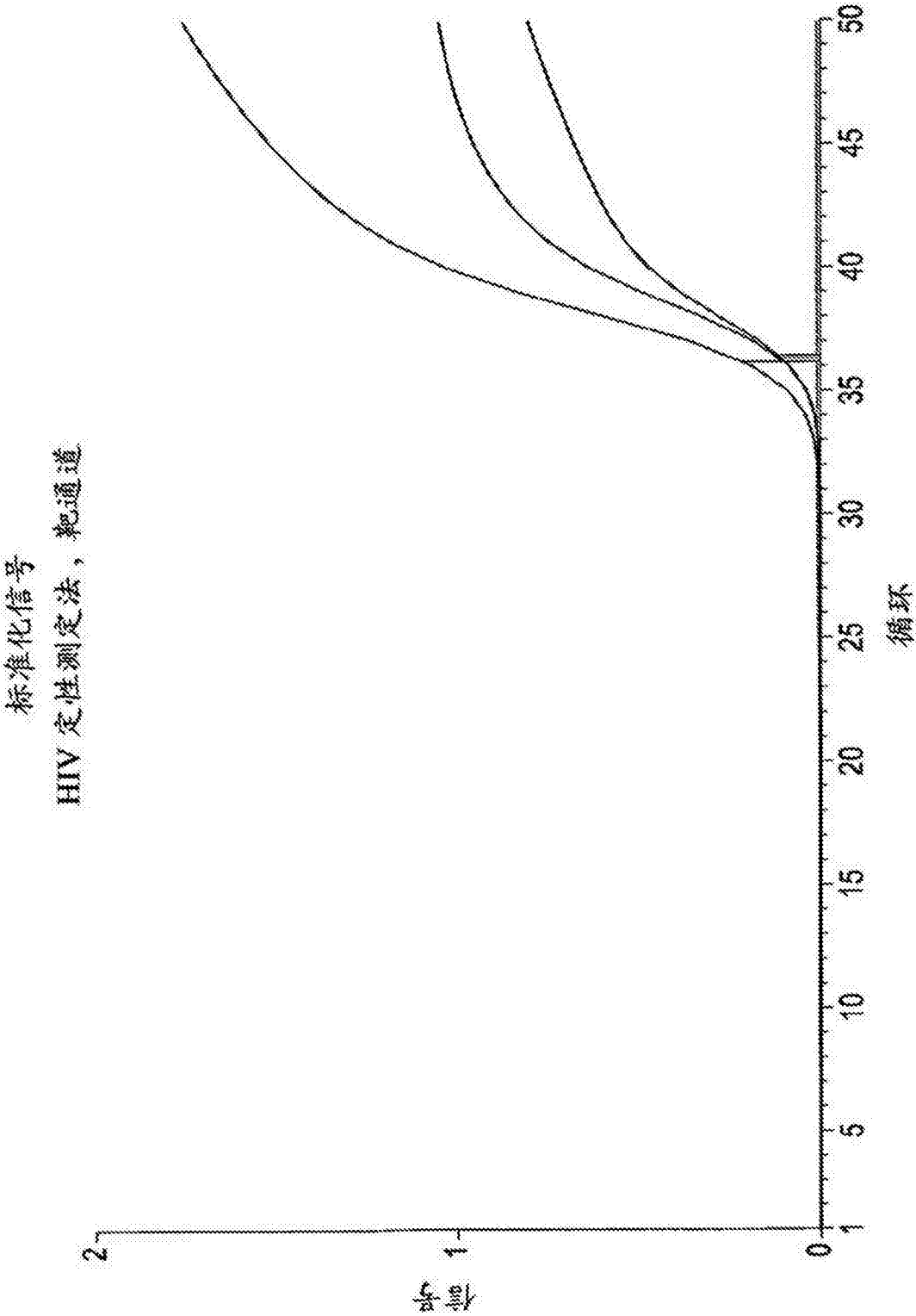


图2a

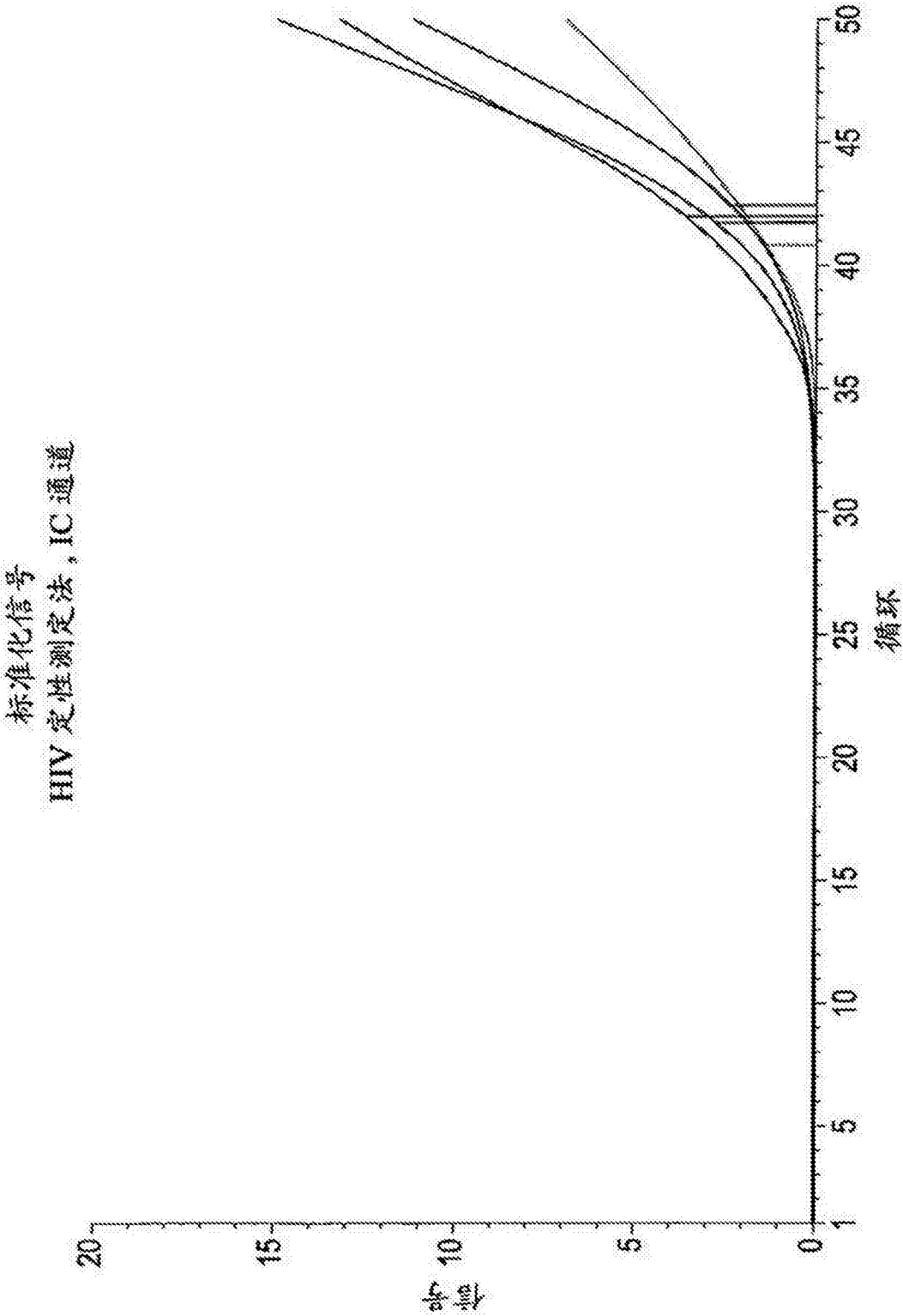


图2b

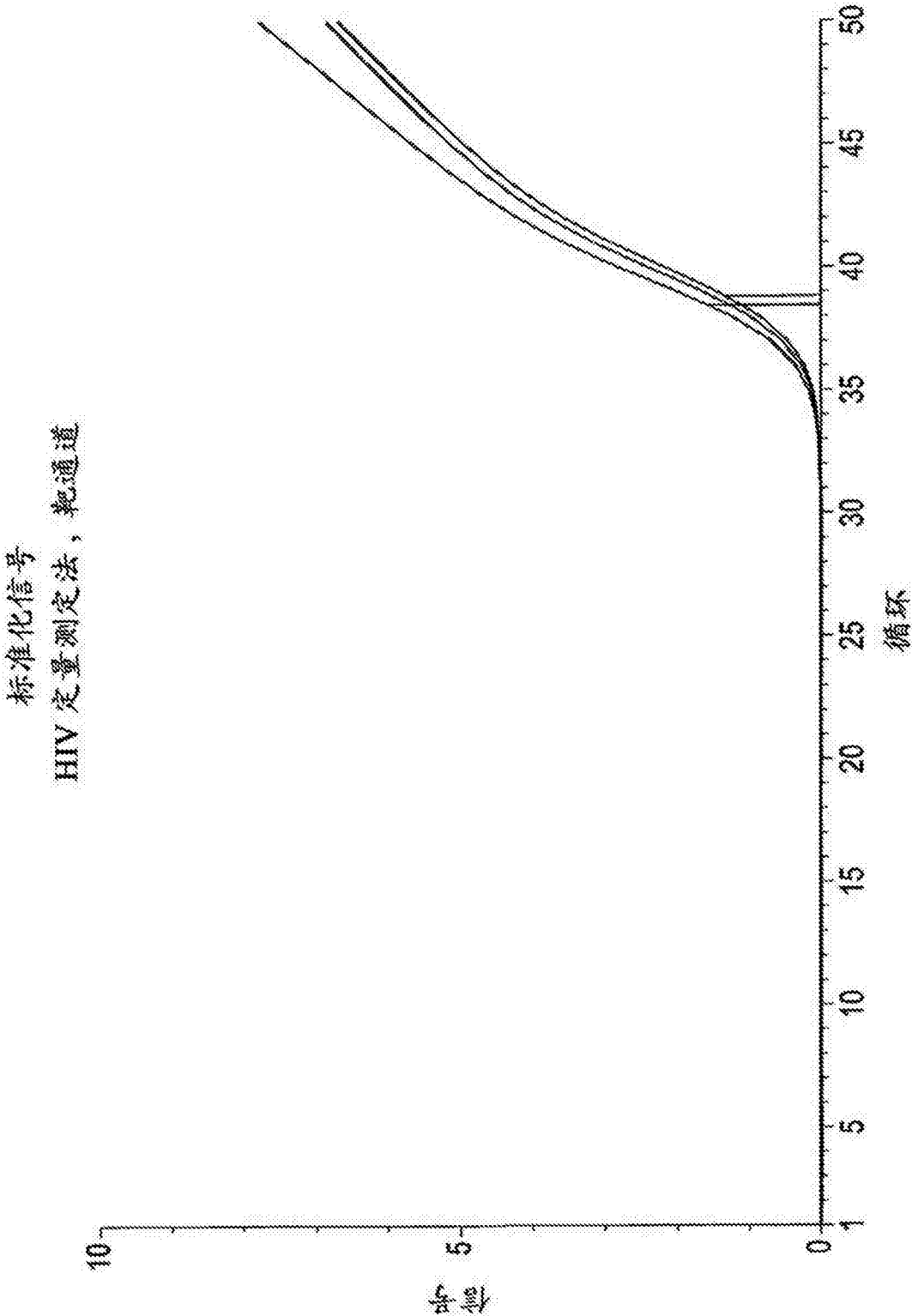


图2c

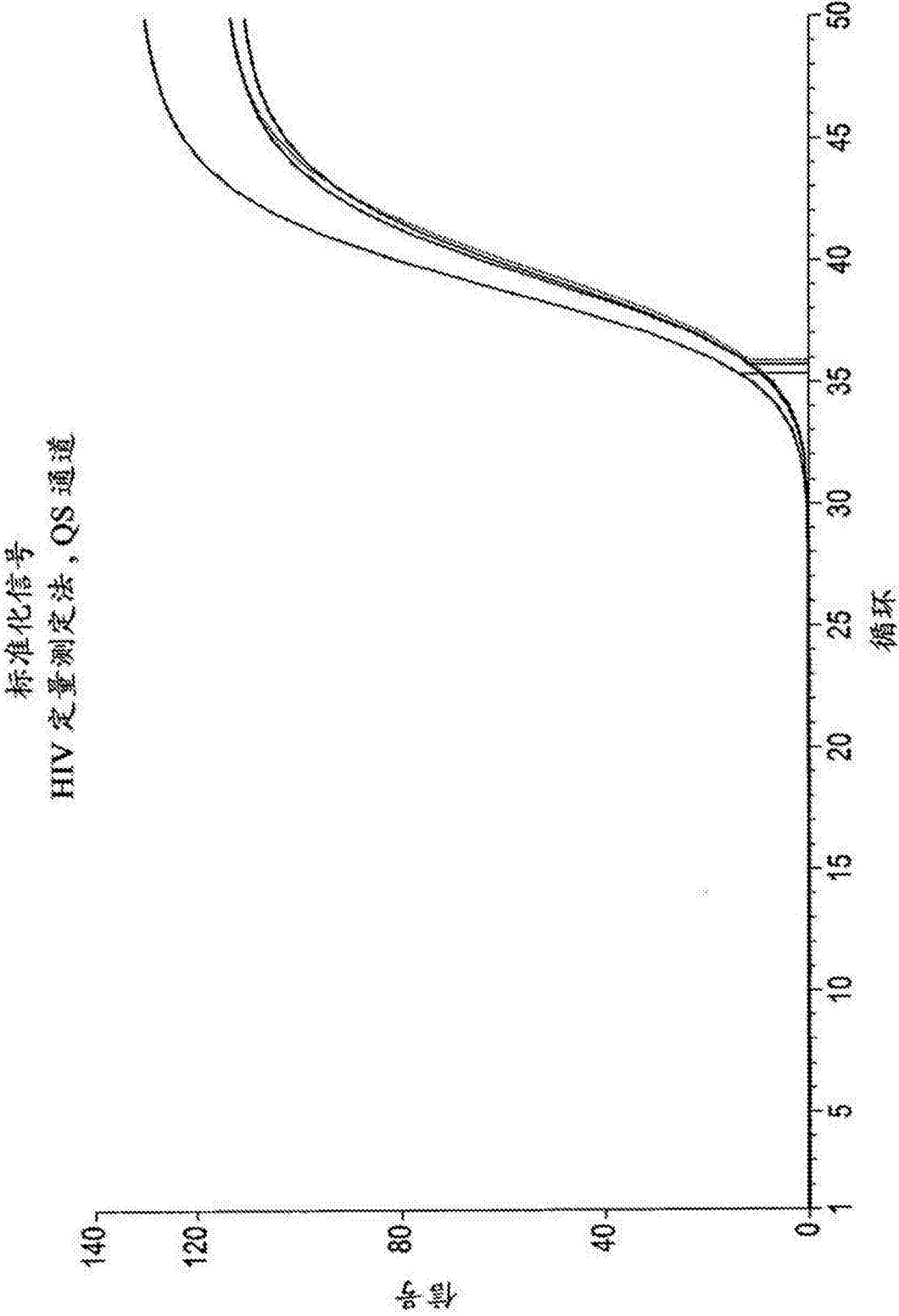


图2d

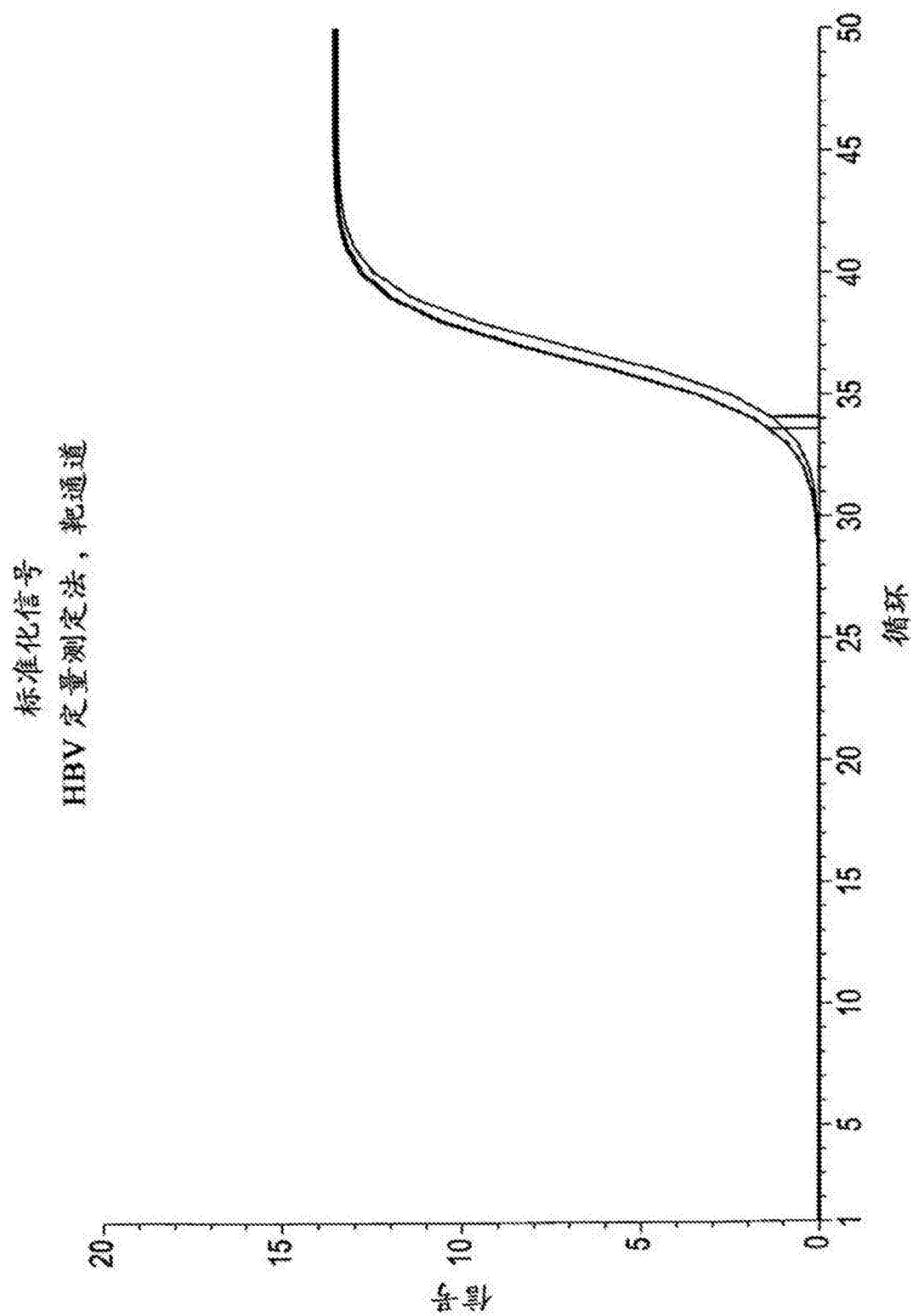


图2e

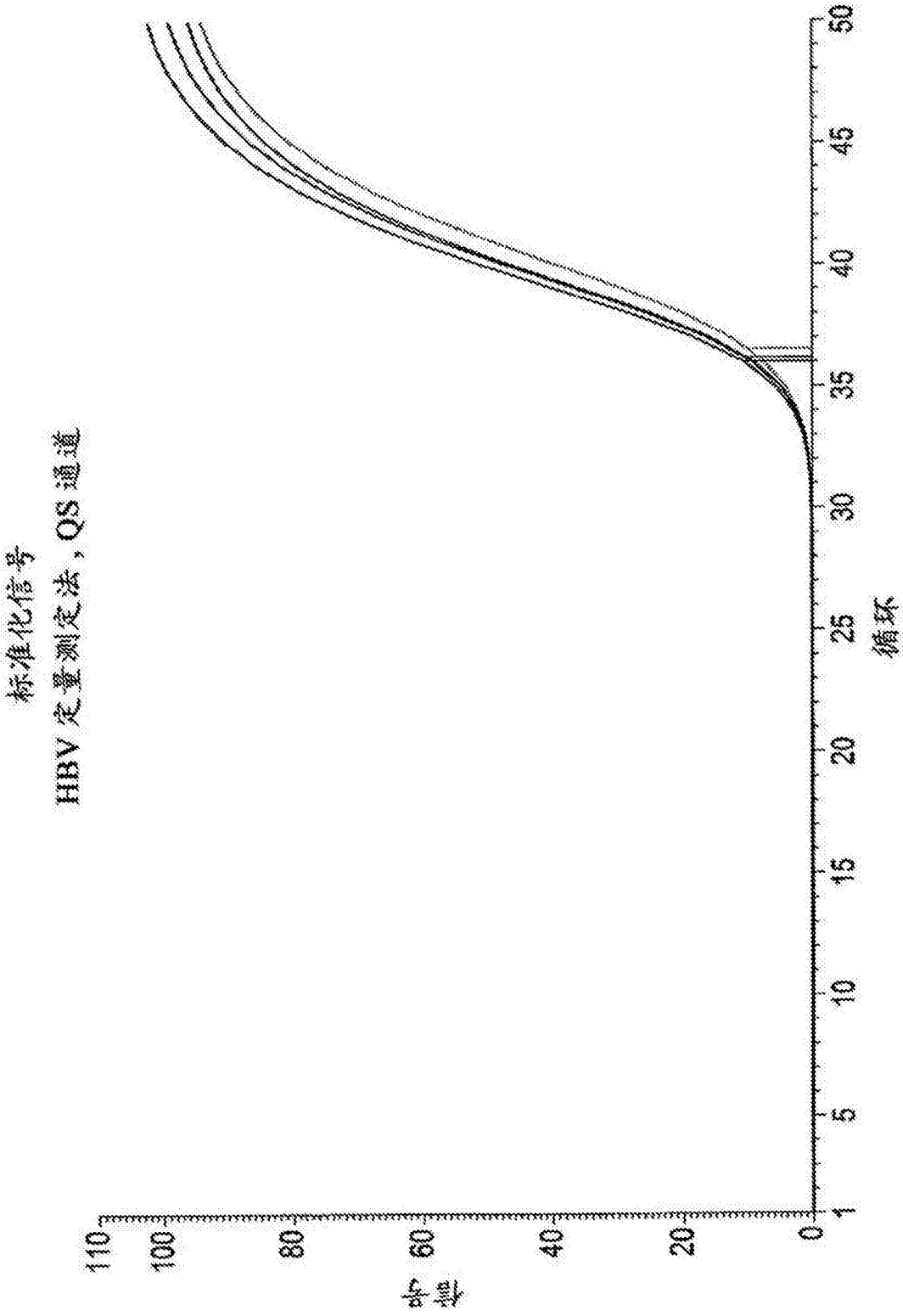


图2f

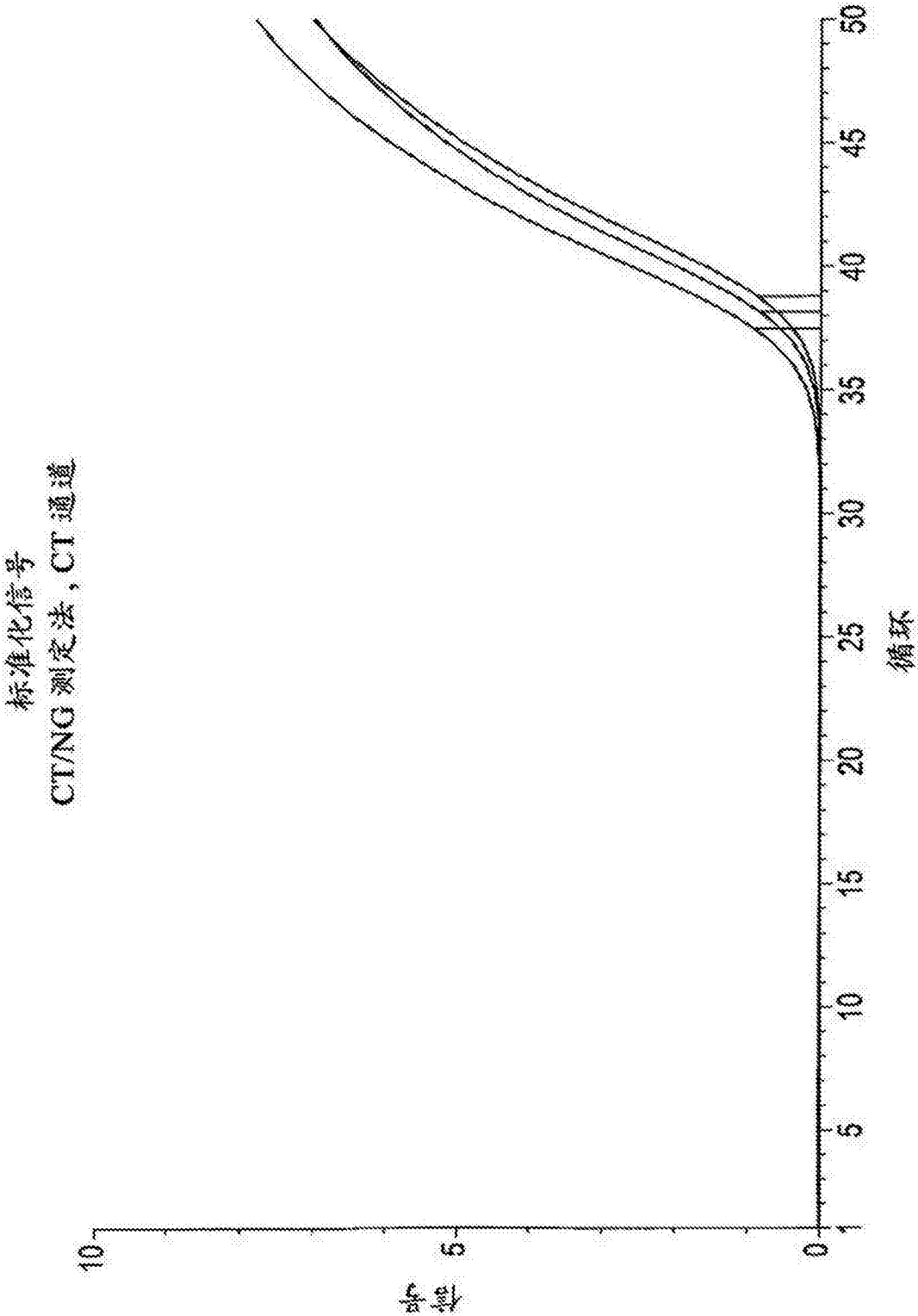


图2g

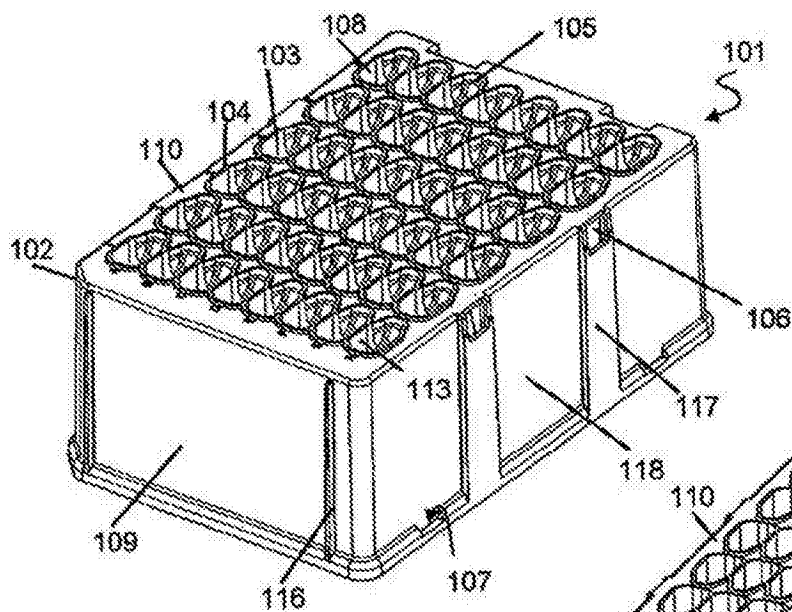


图 3

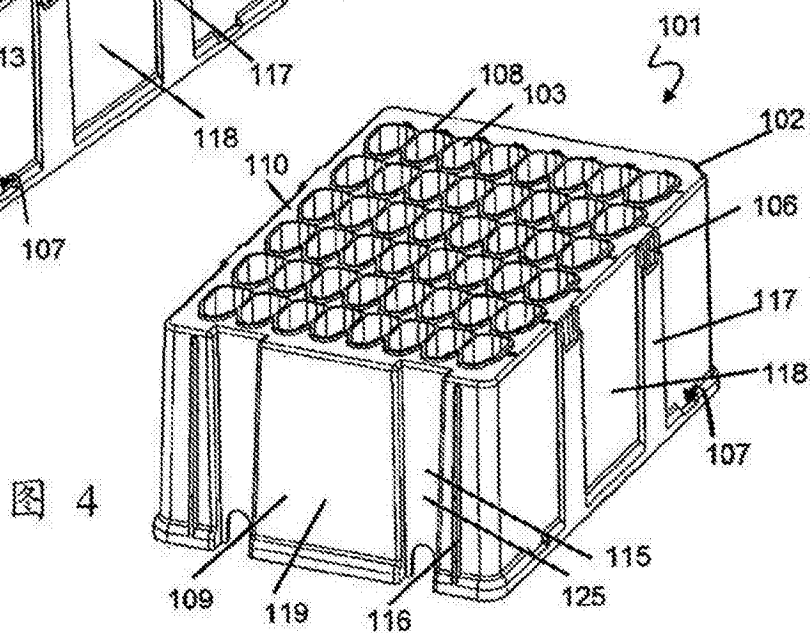


图 4

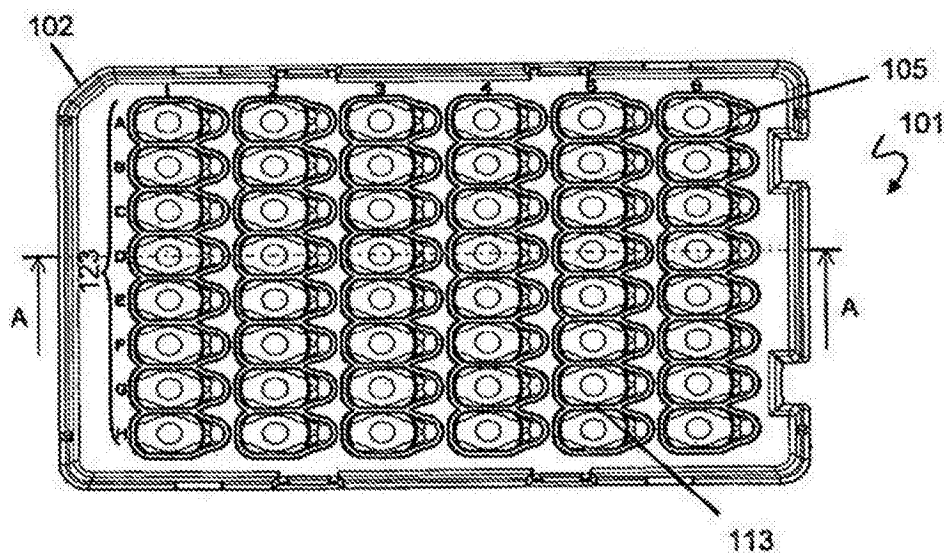


图5

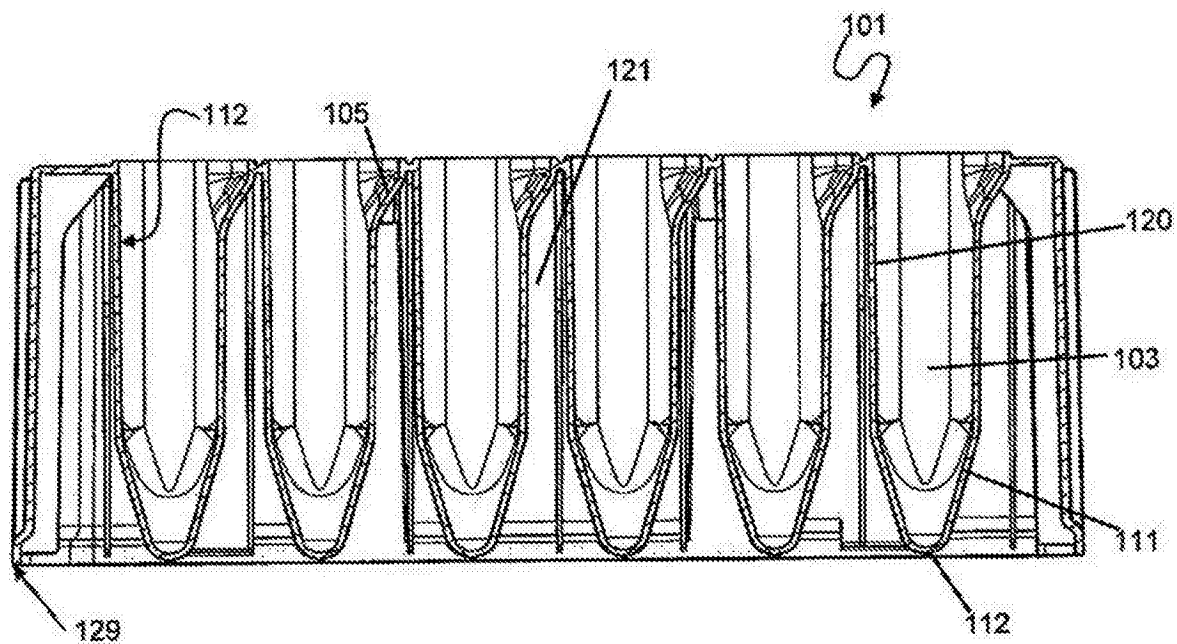


图6

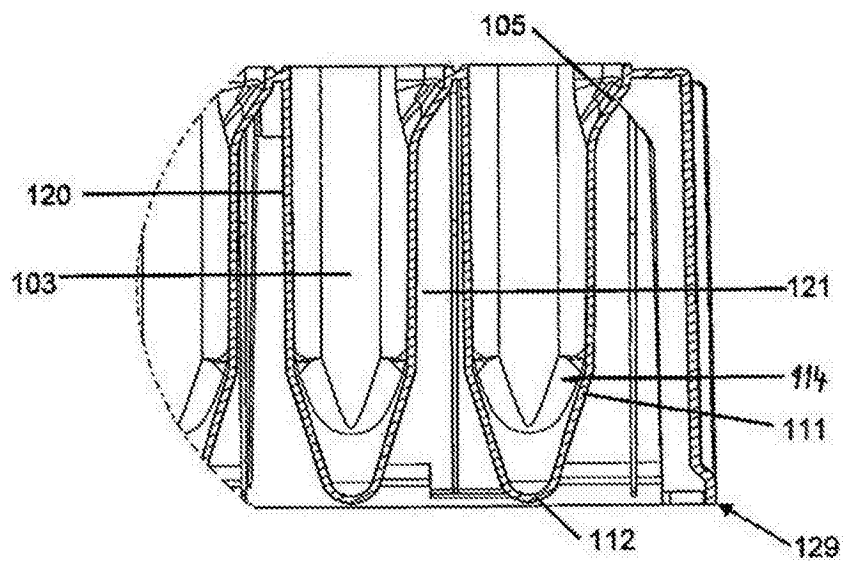


图7

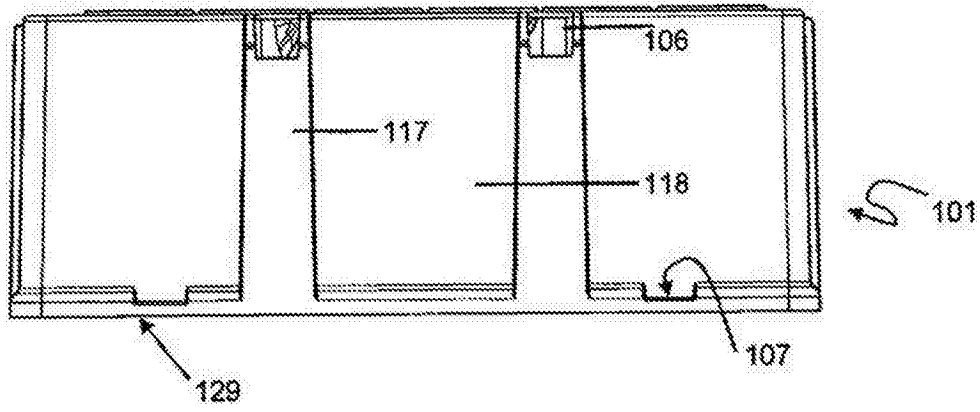


图8

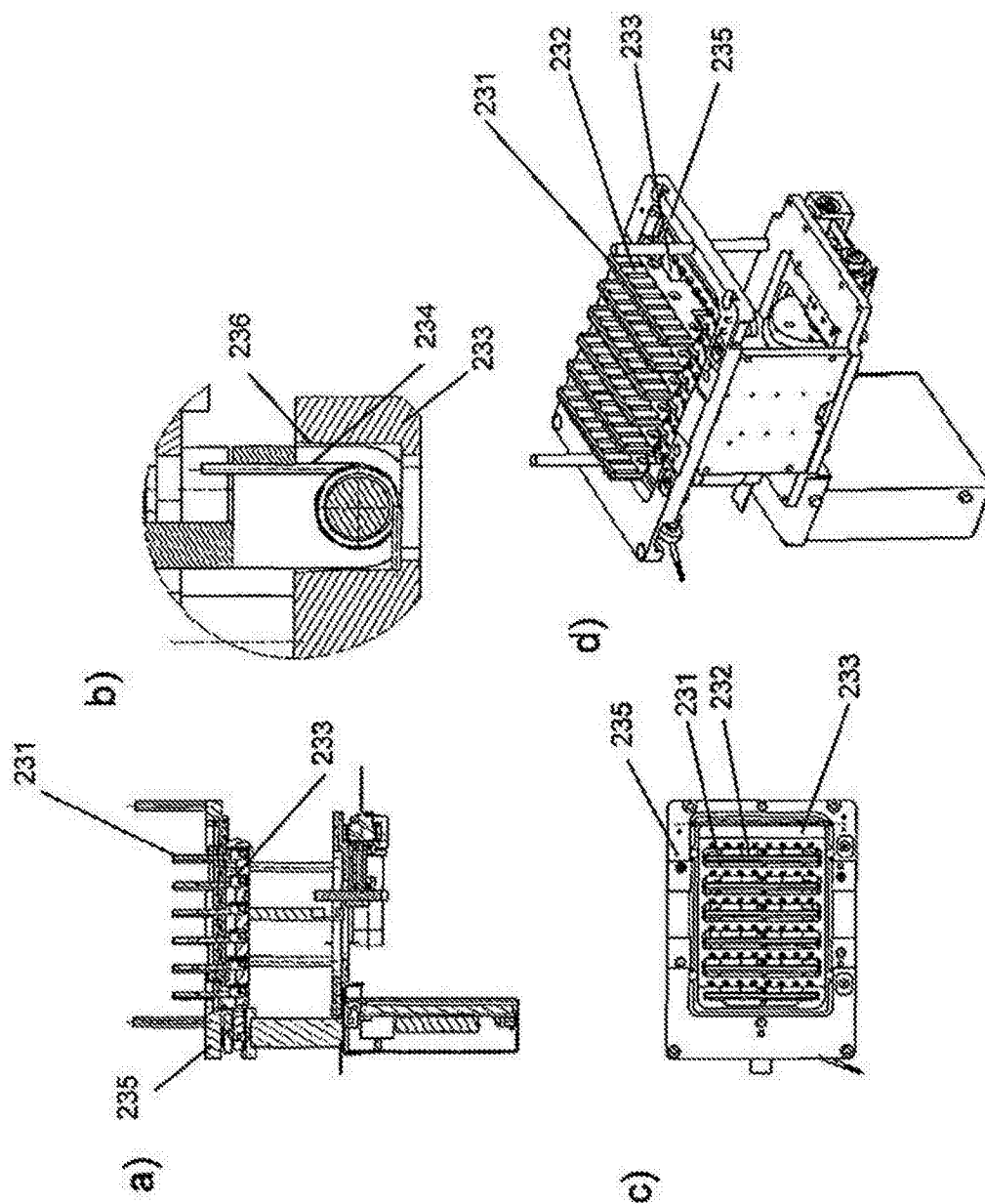


图9

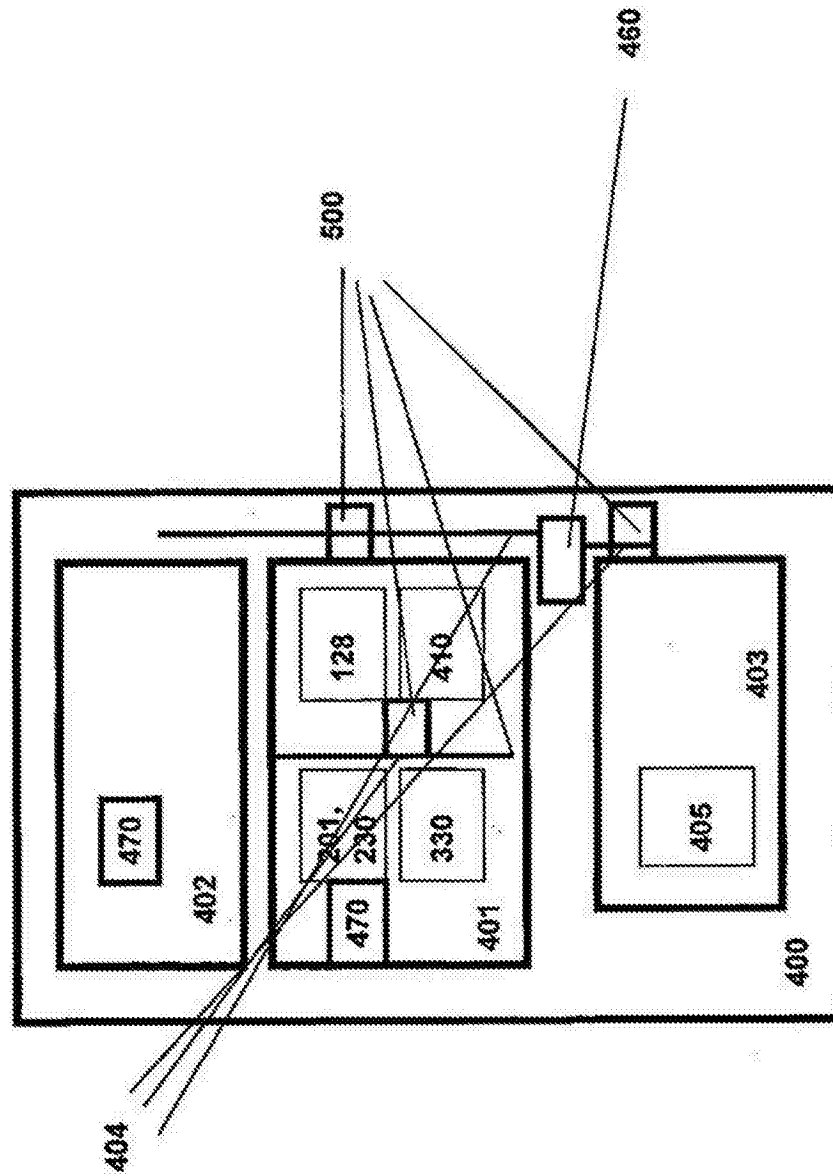


图11

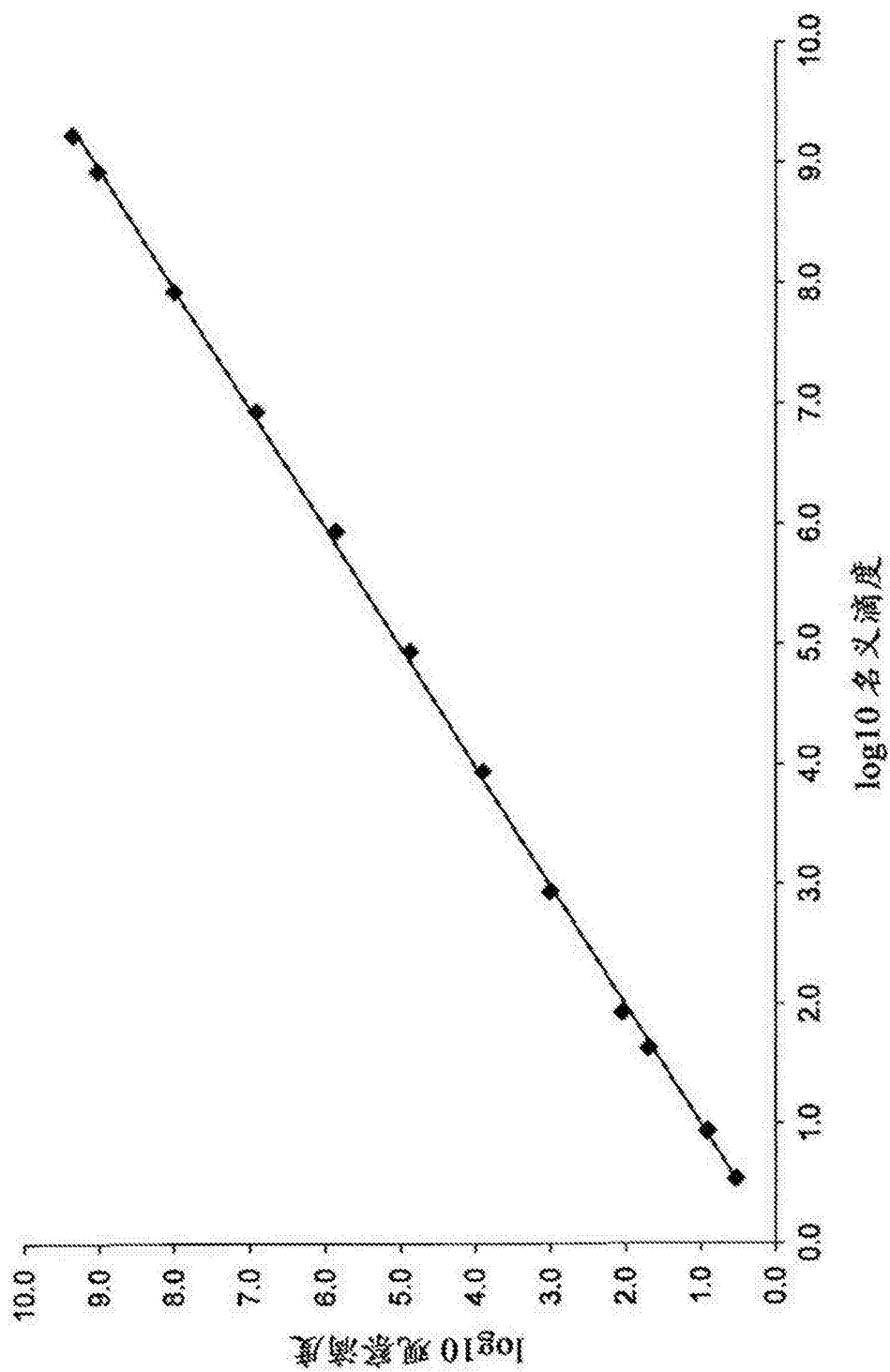


图13

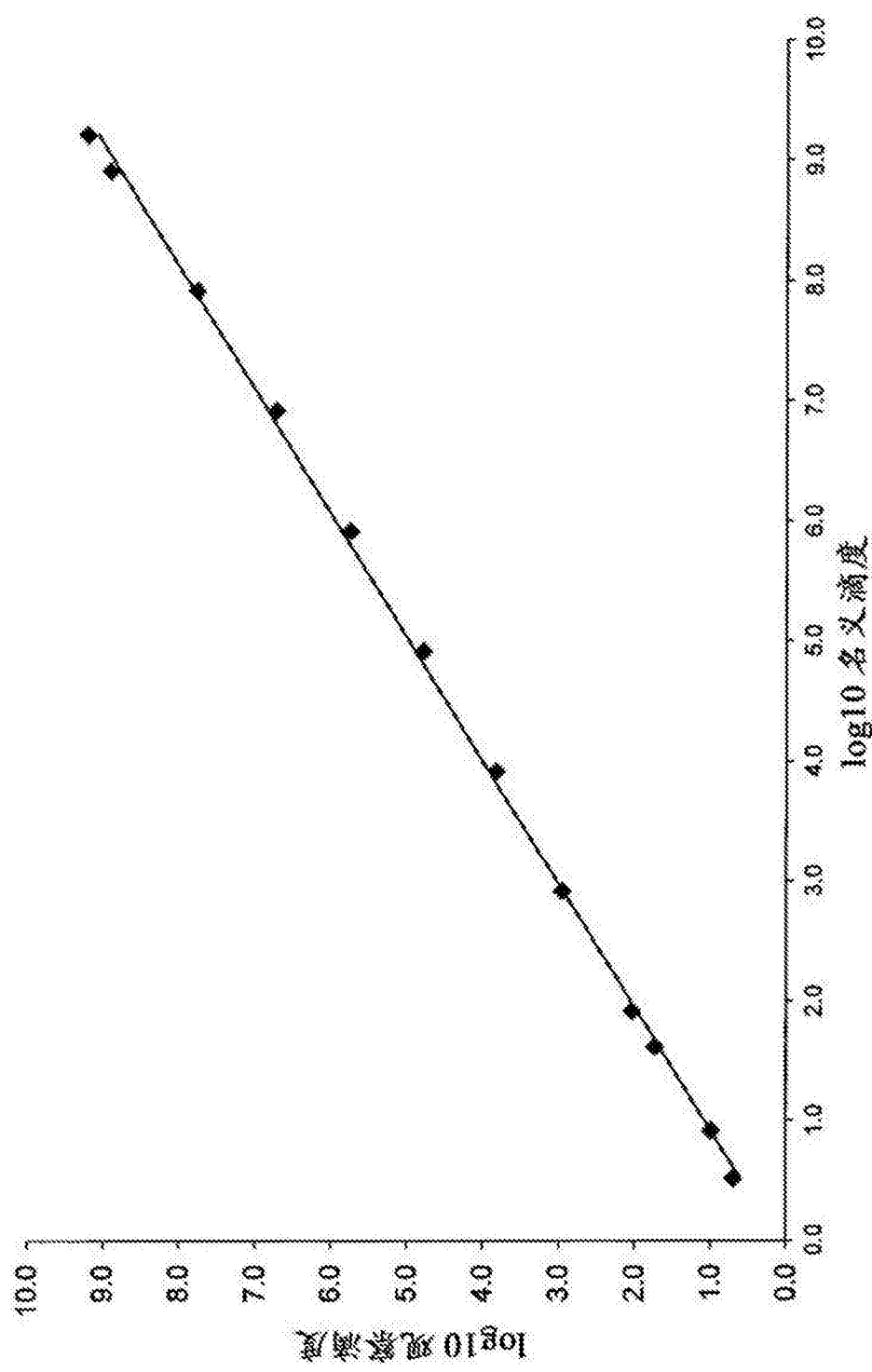


图14

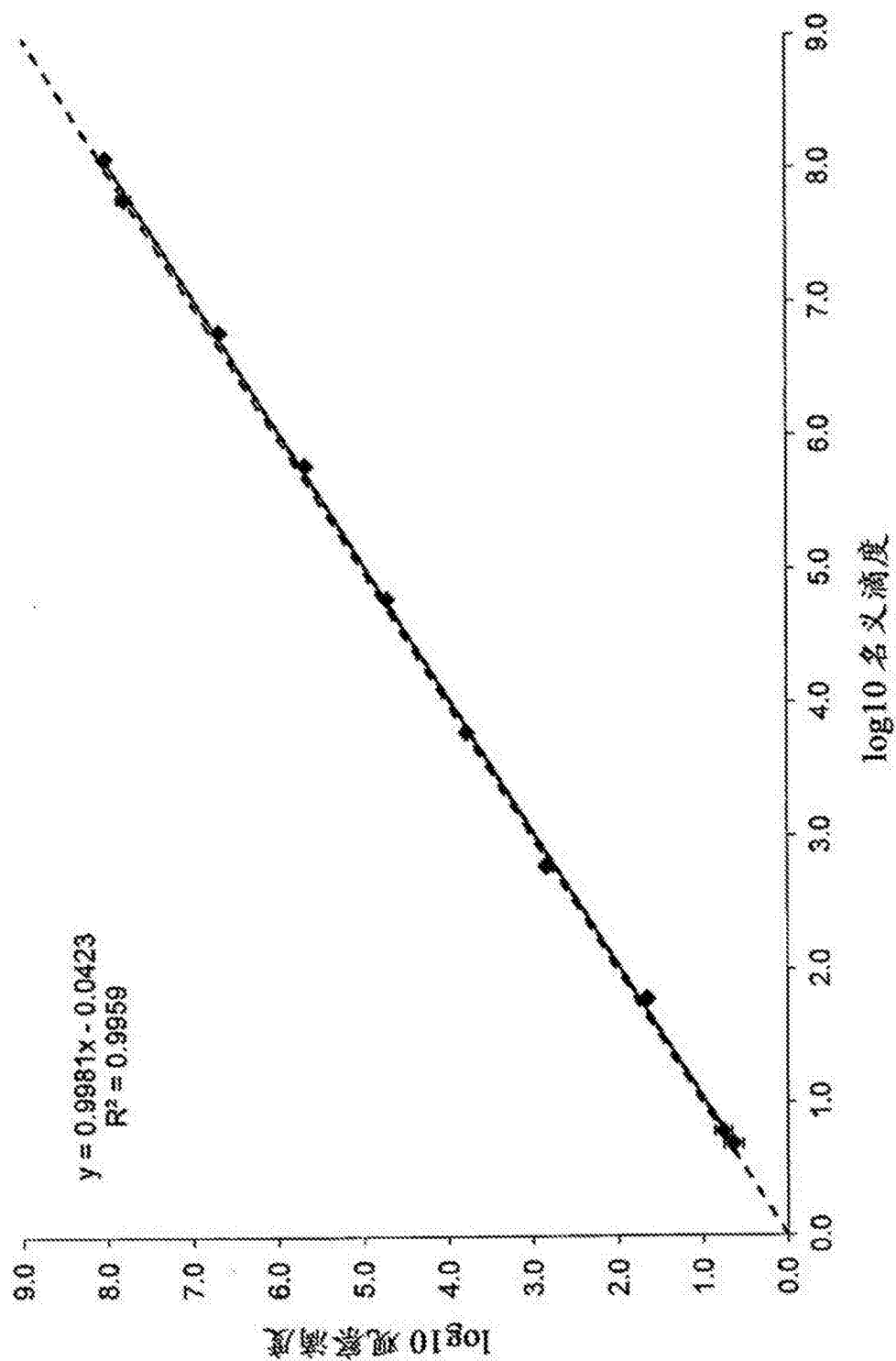


图15

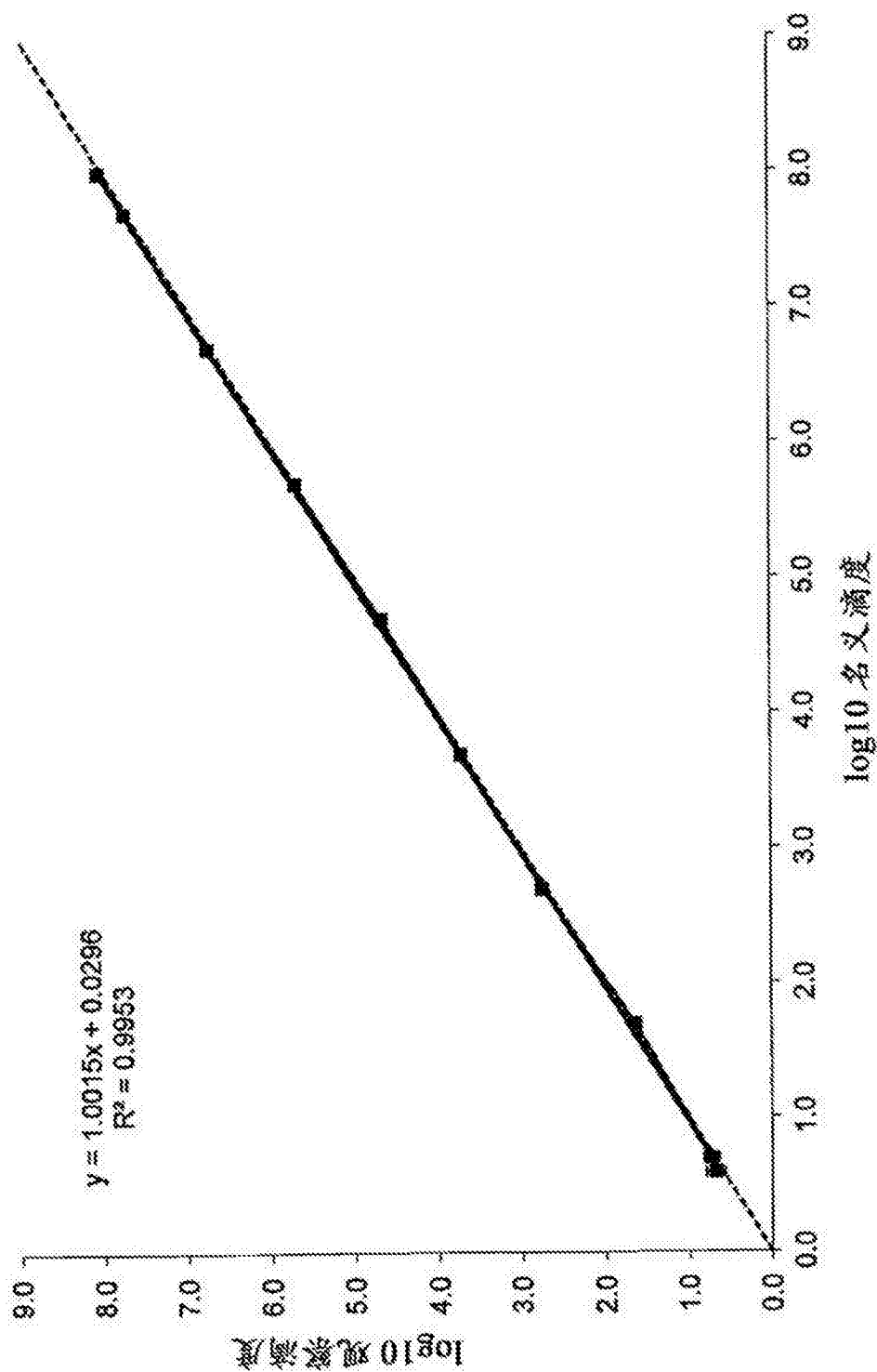


图16

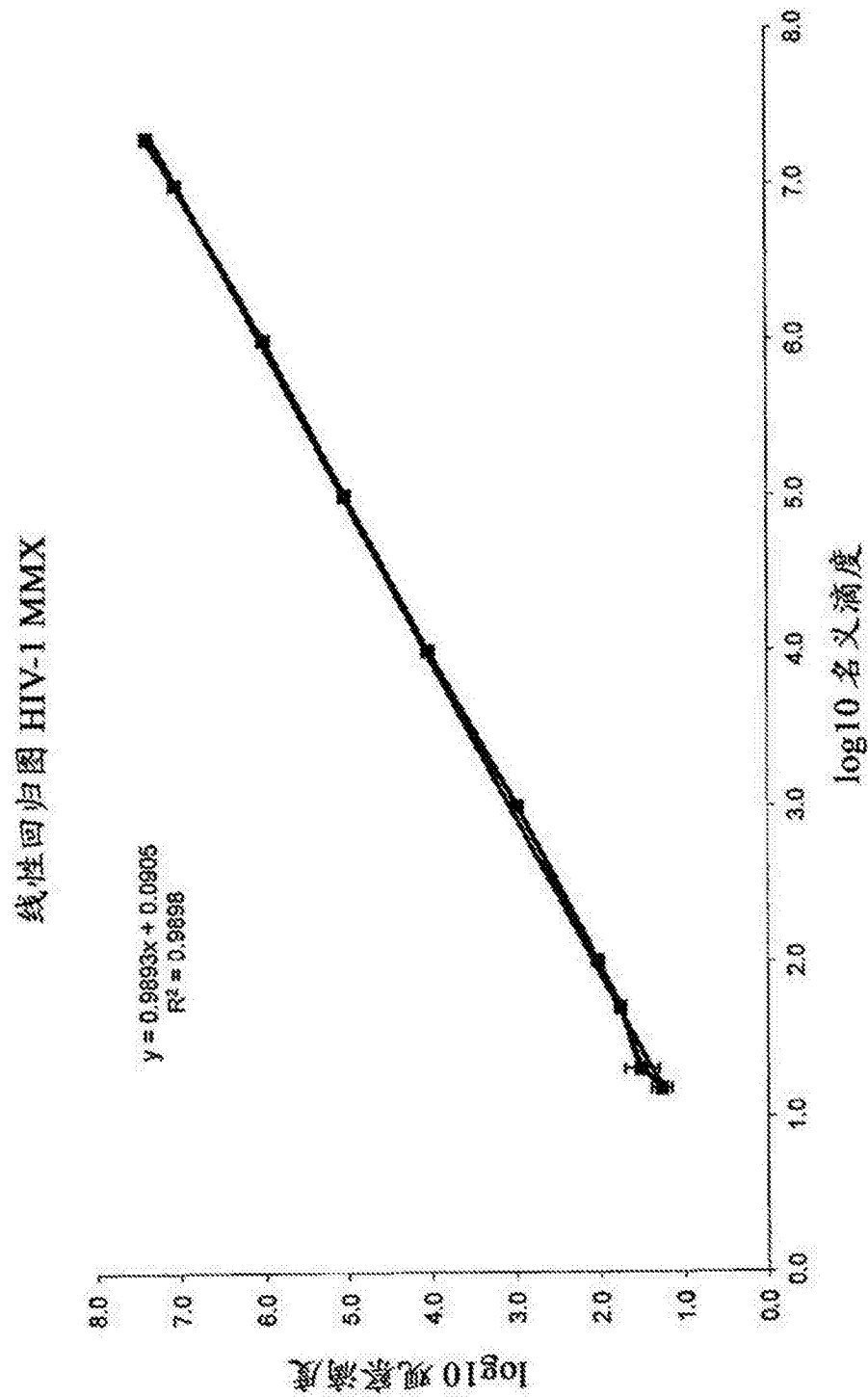


图17