



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103069007 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 24

(21) 申请号 201180039653. 5

C12Q 1/70 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 07. 27

(30) 优先权数据

10175527. 0 2010. 09. 07 EP

61/368, 983 2010. 07. 29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 02. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2011/062955 2011. 07. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02012/013731 EN 2012. 02. 02

(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 D. 西兹曼 R. 巴比尔 F. 伯格曼

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 张红春

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书19页 附图4页

(54) 发明名称

微生物核酸的定性和定量检测

(57) 摘要

本发明涉及使用至少第一对照核酸、或不同浓度的第一和第二对照核酸来定性和定量检测微生物核酸的新的方法和用途。该方法基于核酸的扩增,优选地,聚合酶链式反应。进一步提供了包含用于实施所述方法和用途的组分的试剂盒。

1. 一种用于同时检测及量化生物学样品中的微生物核酸的方法,所述方法包括:

a) 分离并纯化所述微生物核酸,

b) 提供反应混合物,其包含至少第一对照核酸、与所述微生物核酸的独特序列部分以及与所述对照核酸的独特序列部分特异性杂交的一种或多种引物对、和与每一种由所述一种或多种引物对扩增的序列特异性杂交的探针,其中所述微生物核酸和所述对照核酸与不同探针杂交,

c) 向所述反应混合物添加所述生物学样品,

d) 实施一个或多个循环步骤,其中循环步骤包括扩增步骤,所述扩增步骤包括若所述微生物核酸存在于所述样品中,则生成一种或多种自所述微生物核酸衍生的扩增产物,并且生成自所述对照核酸衍生的扩增产物,且其中循环步骤包括杂交步骤,所述杂交步骤包括使由所述引物对扩增的序列与所述探针杂交,其中所述探针用供体荧光模块和相应的接受荧光模块标记,且每种探针携带不同荧光染料,

e) 检测及测量由所述扩增产物生成并且与所述对照核酸和所述微生物核酸的浓度成比例的荧光信号,其中所述对照核酸的扩增产物的存在即使在缺乏所述微生物核酸的扩增产物的情况中指示所述反应混合物中发生扩增。

2. 权利要求 1 的方法,其中依照不同标准来分析所述第一对照核酸以充当定量标准核酸或定性内部对照核酸。

3. 一种用于同时检测及量化生物学样品中的微生物核酸的方法,所述方法包括:

a) 分离并纯化所述微生物核酸,

b) 提供反应混合物,其包含不同浓度的第一和第二对照核酸、与所述微生物核酸的独特序列部分以及与所述对照核酸的独特序列部分特异性杂交的一种或多种引物对、和与每一种由所述一种或多种引物对扩增的序列特异性杂交的探针,其中所述微生物核酸和所述第一对照核酸和所述第二对照核酸与不同探针杂交,

c) 向所述反应混合物添加所述生物学样品,

d) 实施一个或多个循环步骤,其中循环步骤包括扩增步骤,所述扩增步骤包括若所述微生物核酸存在于所述样品中,则生成一种或多种自所述微生物核酸衍生的扩增产物,并且生成自所述第一对照核酸和所述第二对照核酸衍生的扩增产物,且其中循环步骤包括杂交步骤,所述杂交步骤包括使由所述引物对扩增的序列与所述探针杂交,其中所述探针用供体荧光模块和相应的接受荧光模块标记,且每种探针携带不同荧光染料,

e) 检测及测量由所述第一对照核酸和所述微生物核酸的扩增产物生成并与其浓度成比例的荧光信号,和 / 或同时检测由所述第二对照核酸的所述扩增产物生成的荧光信号,其中所述第二对照核酸的扩增产物的存在即使在缺乏所述微生物核酸的扩增产物的情况中指示所述反应混合物中发生扩增。

4. 权利要求 3 的方法,其中所述第一对照核酸是定量标准核酸,而所述第二对照核酸是定性内部对照核酸。

5. 前述权利要求中任一项的方法,进一步包括

在步骤 e) 中通过比较由所述微生物核酸和所述第一对照核酸生成的信号来测定所述生物学样品中所述微生物核酸的数量。

6. 前述权利要求中任一项的方法,其中扩增采用具有 5' 至 3' 外切核酸酶活性的酶聚

合酶。

7. 权利要求 3 的方法,其中所述第一对照核酸以所述微生物核酸的检测限的 20-5000 倍的浓度存在,且其中所述第二对照核酸以所述微生物核酸的检测限的 1-25 倍的浓度存在。

8. 权利要求 3 的方法,其中在一种对照试剂内提供所述第一和所述第二对照核酸。

9. 不同浓度的第一和第二对照核酸用于通过实时 PCR 来同时检测及量化微生物核酸的用途。

10. 权利要求 9 的用途,其中所述第一和第二对照核酸通过相同引物对或不同引物对来扩增,但是与不同探针杂交。

11. 一种用于通过实时 PCR 来同时检测及量化生物学样品中的微生物核酸的试剂盒,所述试剂盒包含不同浓度的第一和第二对照核酸、与所述微生物核酸的独特序列部分以及与所述第一和第二对照核酸的独特序列部分特异性杂交的一种或多种引物对、和与每一种由所述一种或多种引物对扩增的序列特异性杂交的探针,其中在一种对照试剂内提供所述第一和第二对照核酸。

12. 一种用于依照权利要求 1 至 8 中任一项的方法同时检测及量化生物学样品中的微生物核酸的试剂盒,所述试剂盒包含不同浓度的第一和第二对照核酸、与所述微生物核酸的独特序列部分以及与所述第一和第二对照核酸的独特序列部分特异性杂交的一种或多种引物对、和与每一种由所述一种或多种引物对扩增的序列特异性杂交的探针。

13. 权利要求 11 或 12 中任一项的试剂盒,其中所述第一和第二对照核酸通过相同引物对来扩增,但是与不同探针杂交。

14. 一种用于通过实时 PCR 来同时检测及量化生物学样品中的微生物核酸的分析系统,所述系统包含

- 包含裂解缓冲液和容器的样品制备模块,用于分离和纯化所述微生物核酸,
- 包含反应接受器的扩增和检测模块,其中实施依照权利要求 1 至 8 中任一项的方法,
- 依照权利要求 11 至 13 中任一项的试剂盒。

15. 权利要求 14 的分析系统,其另外包含转移模块,用于将所述生物学样品从所述样品制备模块转移到所述反应接受器。

微生物核酸的定性和定量检测

发明领域

[0001] 本发明涉及使用至少第一对照核酸,或不同浓度的第一和第二对照核酸来定性和定量检测微生物核酸的新的方法和用途。该方法基于核酸的扩增,优选地,聚合酶链式反应。进一步提供了包含用于实施所述方法和用途的组分的试剂盒。

[0002] 发明背景

[0003] 在分子诊断学领域中,使用核酸扩增反应对微生物核酸进行检测和量化发挥重要的作用。针对丙肝病毒 (HCV)、人免疫缺陷病毒 (HIV)、和 / 或乙肝病毒 (HBV) 的存在的献血常规筛选是核酸扩增和检测反应大规模应用的一个例子。后者包含多种不同技术,最常使用的技术是由 Kary Mullis 在 1984 年引入的聚合酶链式反应 (PCR)。基于 PCR 的分析的自动化系统经常利用 PCR 过程期间对产物扩增的实时检测。这类方法的关键是使用携带报告基团或标记物的经修饰的寡核苷酸。

[0004] 生物学样品中微生物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,用于检测微生物感染的测定法的一项重要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:至少在就微生物核酸而言阴性结果的情况中,定性内部对照反应在给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不起作用的。然而,在定性设置中,在阳性结果的情况中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,保证反应的灵敏度,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中,没有检测出定性内部对照,并且因此该测试是无效的。

[0005] 在另一方面并且在仅检测样品中微生物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。对于定量测定法,必需引入定量标准核酸,其充当用于测定微生物核酸的绝对量的参照物。可以通过参照外部校准物或通过执行内部定量标准品来实行定量。

[0006] 在外部校准物的情况中,使用已知量的相同或相当的核酸在分开的反应中创建标准曲线。然后,通过比较用分析样品获得的结果与所述标准函数来确定微生物核酸的绝对量。然而,外部校准具有的缺点在于,可能的提取规程、其变化的效力、和抑制扩增和 / 或检测反应的媒介物的可能的且经常不可预测的存在在对照中没有得到反映。

[0007] 此情况适用于任何样品相关效应。因此,可能的情况是,样品由于不成功的提取规程或其它基于样品的因素而判断为呈阴性,而要检测并量化的微生物核酸实际上存在于该样品中。

[0008] 出于这些和其它原因,向测试反应自身添加的内部定量标准品具有优点。内部定量标准品在定量测试中至少具有下列两项功能:

[0009] i) 其监测反应的有效性。

[0010] ii) 其在滴度计算中充当参照物,如此补偿抑制效应,并且控制制备和扩增过程以容许更准确的定量。因此,与定性测试中仅必须在靶物阴性反应中呈阳性的定性内部对照核酸形成对比,定量测试中的定量标准核酸具有两项功能:反应控制和反应校准。因此,它在靶物阴性和靶物阳性反应中都必须呈阳性且是有效的。

[0011] 此外,它必须适合于为高核酸浓度的计算提供可靠的参照值。因此,内部定量标准核酸的浓度需要是相对较高的。

[0012] 定性内部对照核酸和/或内部定量标准核酸可以是竞争性、非竞争性或部分竞争性的。竞争性定性内部对照核酸和/或内部定量标准核酸携带与靶物基本上相同的引物结合位点,并且如此与靶物竞争相同引物。竞争性设置的优点之一是例如必须在测定法中引入的不同引物组较少,如此降低其成本和总体复杂性。此外,监测引物的功能性,亦监测靶物引物特异性的抑制效应。非竞争性定性内部对照核酸和/或内部定量标准核酸与靶物具有不同引物结合位点,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。在使用部分竞争性内部定量标准核酸的 PCR 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。

[0013] 由于如上文所描述的定量和定性测定法的原理在彼此比较时展示不同的要求,又考虑到各个国家的规章要求,在本领域中使用的常见办法是对同一靶核酸开发不同定量和定性测定法,参见例如 Yang 等, J Agr Food Chem 2005, 53, 6222-6229。

[0014] 本发明提供了一种展示数种优点的备选解决办法。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明涉及用于同时定性和定量检测微生物核酸的新的方法和用途。该方法基于核酸的扩增,优选地,聚合酶链式反应。简言之,使用一种或多种特异性引物对来扩增并检测微生物核酸和至少第一对照核酸的特定序列部分。因此,本发明的一个主题是:

[0017] 用于同时检测并量化生物学样品中的微生物核酸的方法,所述方法包括:

[0018] a) 分离并纯化所述微生物核酸,

[0019] b) 提供反应混合物,其包含至少第一对照核酸、与所述微生物核酸的独特序列部分以及所述对照核酸的独特序列部分特异性杂交的一种或多种引物对、和与由所述一种或多种引物对扩增的每种序列特异性杂交的探针,其中所述微生物核酸和所述对照核酸与不同探针杂交,

[0020] c) 向所述反应混合物添加所述生物学样品,

[0021] d) 实施一个或多个循环步骤,其中循环步骤包括扩增步骤,所述扩增步骤包括若所述微生物核酸存在于所述样品中,则生成一种或多种自所述微生物核酸衍生的扩增产物,并且生成自所述对照核酸衍生的扩增产物,且其中循环步骤包括杂交步骤,所述杂交步骤包括使由所述引物对扩增的序列与所述探针杂交,其中所述探针用供体荧光模块和相应的接受荧光模块标记,且每种探针携带不同的荧光染料,

[0022] e) 检测并测量由所述扩增产物生成并与所述对照核酸和所述微生物核酸的浓度成比例的荧光信号,其中所述对照核酸的扩增产物的存在即使在缺乏所述微生物核酸的扩增产物的情况中也指示所述反应混合物中发生扩增。

[0023] 本发明展示了与现有技术相比的许多优点。特别地,如此,本发明容许使用相同试

剂进行的针对任何给定微生物核酸的定性和定量测定法的常见设计。

[0024] 在一些实施方案中,上文所描述的第一对照核酸可以充当内部定量标准核酸和定性内部对照核酸两者。因此,它分别消除了对两次分开的测试或测试试剂盒的需要。实施两次分开的测试由于额外的抽血而给患者带来负担,并且在定量和定性测试都报销的情况下,潜在地给健康护理系统强加额外的成本。此外,在与连续的定性和定量实验相比时,既定性和定量的测试的获得结果时间缩短。

[0025] 优选地,依照不同标准评估所述第一对照核酸以获得定性和定量结果。在一个优选的实施方案中,针对两种不同测试参数设置分析实时 PCR 期间获得的一组相同的原始数据。与应用于定量结果输出所需要的内部定量标准品的参数设置相比,应用于有效定性对照核酸的定性测试参数设置是更严格的。在定量反应中用于内部定量标准核酸的设置不能如此严格,因为靶物的存在可能影响内部定量标准核酸的相应增长曲线(参见图 1a)。

[0026] 因此,本发明的一个优选的实施方案是上文所描述的方法,其中依照不同标准分析第一对照核酸以充当定量标准核酸或充当定性内部对照核酸。

[0027] 在其它实施方案中,由于以下原因以不同浓度采用第一和第二对照核酸可以是有利的:通常,定量测试中的一种或多种内部定量标准核酸具有相当高的浓度,从而使得它们在具有高浓度靶核酸的样品中仍然得到扩增并检出。因此,有时没有给予其作为对照用于检测接近检测限(LOD)的低阳性样品的可用性,特别是若扩增反应受到部分抑制的话。在该情况中,高度浓缩的对照核酸的检出不能充当相应测定法的足够灵敏性的度量。

[0028] 因此,本发明的一个优选方面如下:

[0029] 用于同时检测并量化生物学样品中的微生物核酸的方法,所述方法包括:

[0030] a) 分离并纯化所述微生物核酸,

[0031] b) 提供反应混合物,其包含不同浓度的第一和第二对照核酸、与所述微生物核酸的独特序列部分以及所述对照核酸的独特序列部分特异性杂交的一种或多种引物对、和与由所述一种或多种引物对扩增的每种序列特异性杂交的探针,其中所述微生物核酸和所述第一对照核酸以及所述第二对照核酸与不同探针杂交,

[0032] c) 向所述反应混合物添加所述生物学样品

[0033] d) 实施一个或多个循环步骤,其中循环步骤包括扩增步骤,所述扩增步骤包括若所述微生物核酸存在于所述样品中,则生成一种或多种自所述微生物核酸衍生的扩增产物,并且生成自所述第一对照核酸和所述第二对照核酸衍生的扩增产物,且其中循环步骤包括杂交步骤,所述杂交步骤包括使由所述引物对扩增的序列与所述探针杂交,其中所述探针用供体荧光模块和相应的接受荧光模块标记,且每种探针携带不同荧光染料,

[0034] e) 检测并测量由所述第一对照核酸和所述微生物核酸的扩增产物生成并与其浓度成比例的荧光信号,和/或同时检测由所述第二对照核酸的所述扩增产物生成的荧光信号,其中所述第二对照核酸的扩增产物的存在即使在缺乏所述微生物核酸的扩增产物的情况中也指示反应混合物中发生扩增。

[0035] 依照本发明在同一对照试剂内采用不同浓度的第一和第二对照核酸克服了上文所述的问题。具有较低或最低浓度的核酸对应于用于定性测定法的定性内部对照核酸,并且确保判断阴性结果有效与否的能力,即在未检测到内部对照核酸的情况中,阴性结果不是有效的。

[0036] 依照本发明,技术人员可以如下利用开发定量和定性设置之间的协同,即在单个测定法中实施这两者,如此降低开发成本、需要较少的材料和劳动力、降低制造成本,而且还缩短建立测定法需要的时间。此外,避免由于额外的抽血给患者带来负担的患者双重测试,以及降低健康护理系统的成本(在定量和定性测试都报销的情况下)。

[0037] 定性内部对照核酸和/或内部定量标准核酸可以是竞争性、非竞争性或部分竞争性的。

[0038] “竞争性”意味着,在包含引物的扩增反应中,相应的对照核酸和一种或多种靶核酸至少具有基本上相同的引物结合位点,并且如此竞争相同引物。竞争性设置的优点之一是,例如必须在测定法中引入的不同引物组较少,如此降低其成本和总体复杂性。此外,监测引物的功能性,亦监测靶物引物特异性的抑制效应。

[0039] “非竞争性”意味着相应的对照核酸和一种或多种靶核酸具有不同引物结合位点,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。

[0040] “部分竞争性”意味着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。

[0041] 依照本发明的一种或多种方法通过使用内部定量标准核酸作为第一对照核酸,使可能同时干扰定量标准核酸和微生物核酸的扩增和检测反应的样品特异性,而且还有样品非特异性抑制效应(不依赖于靶区的抑制)相等,从而得到更准确的滴度。“内部”意味着与微生物核酸在同一反应混合物内,而不是在分开的实验中扩增、检测并量化第一对照核酸。

[0042] 本发明的另一个优选的方面是上文所描述的方法,其中所述第一对照核酸是定量标准核酸,而所述第二对照核酸是定性内部对照核酸。

[0043] 本领域技术人员可以从同一个实验中提取可靠的定性,而且任选地还有同样可靠的定量信息。因此,在另一个方面,本发明涉及以下内容:

[0044] 上文描述的方法,进一步包括

[0045] 在步骤 e) 中通过比较由所述微生物核酸和所述第一对照核酸生成的信号来测定所述生物学样品中所述微生物核酸的量。

[0046] 在一个优选的实施方案中,所述第一对照核酸和第二对照核酸具有基本上相同的序列。优选地,它们具有相同的引物结合位点,但不同的探针结合位点。

[0047] 这具有的优点在于,用于定性和定量测量的对照核酸可以基于相同的选定结合序列,并且就测定法性能而言并考虑一种或多种分析物序列共享相同的有利特性。

[0048] 在文献中解释了本领域技术内的分子生物学和核酸化学的常规技术。参见,例如 Sambrook J 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, Gait, M. J. 编, 1984; *Nucleic Acid Hybridization*, Hames, B. D. 和 Higgins, S. J. 编, 1984; 以及丛书, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc.

[0049] “同时”在本发明的意义中意味着在同一反应或反应混合物内实施两种行为,诸如例如检测并量化核酸。

[0050] 如本发明中使用的,“反应混合物”至少包含促进生物学或化学反应的所有组分。它是没有任何分开区室的单一体积,即存在于所述“反应混合物”中的所有组分彼此直接接

触。

[0051] “生物学样品”可以是天然起源的任何样品。优选地，“生物学样品”自人衍生，并且是体液。在本发明的一个优选的实施方案中，“生物学样品”是血液。

[0052] 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。

[0053] “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”（本文中更一般称为“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）。

[0054] 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。“寡核苷酸”和“经修饰的寡核苷酸”（或“寡核苷酸类似物”）在本发明的背景中是“寡聚化合物”的亚组。

[0055] 在本发明的背景中，术语“寡核苷酸”指自多个作为“单体单元”的“核苷酸”形成的“多核苷酸”，即“寡核苷酸”属于具有“单体单元”的核糖核酸（RNA）或脱氧核糖核酸（DNA）的“寡聚化合物”或“多聚化合物”的特定亚组。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。

[0056] 可以合成依照本发明的“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 US4, 458, 066 中披露的固体支持物方法。

[0057] 对于上文描述的方法，核酸可以以双链或者单链形式存在，其中在实施该方法前通过加热（即热变性）使双链核酸变性，即变成单链。

[0058] 在另一个实施方案中，引物/探针可以是经化学修饰的，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。

[0059] “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”。术语“经修饰的核苷酸”或“核苷酸类似物”在本申请中可以互换使用。“经修饰的核苷”（或“核苷类似物”）以如上文对“经修饰的核苷酸”（或“核苷酸类似物”）所概述的方式与天然核苷相差一些修饰。

[0060] “非核苷酸化合物”不同于天然“核苷酸”，但是在本发明的意义中仍然能够（类似于“核苷酸”）是“寡聚化合物”的“单体单元”。因此，“非核苷酸化合物”必须能够与“核苷

酸”形成“寡聚化合物”。然而,即使“非核苷酸化合物”可以含有碱基样、呋喃戊糖基糖样或磷酸根样部分,它们并不都同时存在于“非核苷酸化合物”中。

[0061] “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”、一种或多种“非核苷酸化合物”或“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,并且贯穿本申请可以互换使用。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、膦酸甲酯、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/烷基(alkyl)、烯基、炔基或芳基模块,例如低级烷基/烷基(alkyl)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”(或沿天然路线的合成“寡核苷酸”)在功能上可互换,但在结构上不同。更为详细地,例示性修饰披露于 Verma S. 和 Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67(1998)99-134 或 W002/12263 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,这类结构也已经描述为“寡核苷”。

[0062] “核酸”以及“靶核酸”或“微生物核酸”是“核苷酸”的多聚化合物,如本领域熟练技术人员已知的。“靶核酸”或“微生物核酸”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”。因此,在此情况中,核酸是靶物,并且因此也可以称为“靶核酸”。依照本发明,因为靶核酸是微生物起源的,所以靶核酸也称为“微生物核酸”。例如,如果必须测定血液是否含有 HCV,那么“靶核酸”或“微生物核酸”是 HCV 的核酸。

[0063] “微生物”意指任何病毒、细菌、古细菌、真菌或任何单细胞真核生物体。

[0064] “微生物的”意味着自“微生物”衍生或属于“微生物”。

[0065] “检测”意味着测定特定对象诸如靶物或信号的存在或缺乏。

[0066] “量化”意味着测定特定对象诸如靶物或信号的量。

[0067] “测量”意味着至少测定特定对象诸如靶物或信号的相对值。

[0068] 在使用第一和第二对照核酸的本发明的某些实施方案的意义中,所述第一对照核酸充当“内部定量标准核酸”。“内部定量标准核酸”是“核酸”,并且如此是“核苷酸”的多聚化合物,如本领域熟练技术人员已知的。在“内部定量标准核酸”的情况中,核酸往往是并且同时用作反应有效性的对照及参照以“量化”靶核酸,即测定“靶核酸”或“微生物核酸”的量。出于此目的,“内部定量标准核酸”与“靶核酸”或“微生物核酸”一起经历所有可能的样品制备步骤。此外,它贯穿整个方法在同一反应混合物内加工。“内部定量标准核酸”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信号。出于此目的,在每项测试中必须仔细优化“内部定量标准核酸”的浓度,以不干扰灵敏度,而且以例如在非常高的靶物浓度也生成可检测信号。优选地,“内部定量标准核酸”,即第一对照核酸的浓度范围会包含每个反应 100 个拷贝至每个反应 100000 个拷贝的范围。“内部定量标准核酸”的可能浓度可以是例如对于 HIV:1000 个拷贝/反应,对于 HCV:7500 个拷贝/反应,但是可以对特定测定法改变这些浓度,如本领域技术人员已知的。就相应测定法的检测限 (LOD) 而言,优选地,“内部定量标准核酸”的浓度范围是 20-5000 倍 LOD,更优选地,20-1000 倍 LOD,最优选地,20-500 倍 LOD。反应混合物中“内部定量标准核酸”的终浓度取决于实现的定量测量范围。“内部定量标准核酸”可以是例如 DNA、RNA 或 PNA、装甲的 (armored) DNA 或装甲的 RNA 及其经修饰形式。

[0069] 此外,在本发明的意义中,所述第二对照核酸充当“定性内部对照核酸”。“定性内部对照核酸”对于确定定性检测测定法的测试结果的有效性是特别重要的:至少在阴性结果的情况中,必须检测出定性内部对照核酸,否则认为该测试自身是不起作用的。然而,在定性设置中,在阳性结果的情况中没有必要必须检出定性内部对照核酸。对于定性测试,重要的是反应的灵敏度得到保证,并且如此受到严格控制。因此,定性内部对照核酸的浓度必须相对较低,从而即使在略微抑制的情况中,认为测试是无效的。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 倍数值之间。更优选地,其在 2 倍和 20 倍 LOD 之间、或在 2 倍和 15 倍 LOD 之间、或在 2 倍和 10 倍 LOD 之间。甚至更优选地,其在 3 倍和 7 倍 LOD 之间。

[0070] “检测限”或“LOD”意指在预先规定的命中率的情况中样品中可检出的最低的核酸量或浓度。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。根据靶物,临床分子诊断测定法中的 LOD 值通常低于 1000cp/ml。优选地,在本发明背景中实施的测定法中的 LOD 在 1 和 500cp/ml 之间。

[0071] 一种广泛用于计算 LOD 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。

[0072] “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。

[0073] 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”,即例如寡核苷酸的 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。

[0074] 术语“探针”在本发明上下文中也是寡核苷酸，但是具有特定功能：其与反应混合物中的其它核酸杂交，优选地，以实现其检出。因此，优选地，探针特异性结合某些核酸。优选地，探针携带至少一种标记物。例如，可以用不同染料标记探针，从而可以彼此独立地检测并测量相应的探针。

[0075] “标记物”，经常称为“报告基团”，一般是使核酸，特别是“寡聚化合物”或“经修饰的寡核苷酸”，以及任何与其结合的核酸与样品的剩余部分可区别的基团（已经附着“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”，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、CY5、JA270、Cyan、CY5.5、LC- 红 640、LC- 红 705。

[0076] 对于上文描述的方法，核酸可以以双链或者单链形式存在，其中在实施该方法前通过加热（即热变性）使双链核酸变性，即变成单链。

[0077] 在另一个优选的实施方案中，引物和 / 或探针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。

[0078] “可检测信号”是由化合物诸如“微生物核酸”、“内部对照核酸”或“定量标准核酸”“生成”的信号，其使所述化合物与样品的剩余部分可区别。依照本发明，可以以定性方式量化或分析所述“可检测信号”。“可检测信号”可以是例如放射性或光学诸如发光信号。依照本发明的优选的“可检测信号”是由“荧光染料”发射的荧光信号。

[0079] PCR 反应的“抑制”或“阻抑”指与大多数样品中观察到的标准反应相比不太有效的 PCR 反应。可以在对照和 / 或靶物增长曲线的荧光水平降低中、在延迟的 CT 值中、在增长曲线的斜率变化中、在转折点或反应特征的其它特征的变化中看到“抑制”或“阻抑”效应。“抑制”或“阻抑”效应可以源自变化的样品制备效力、样品相关效应、抑制扩增和 / 或检测反应的媒介物的可能的且经常不可预测的存在、和其它原因。因此，可能的情况是，样品由于不成功的提取规程或其它基于样品的因素而判断为呈阴性，而要检测并量化的微生物核酸实际上存在于该样品中。

[0080] “生成”意味着直接或间接地产生。因此，在“可检测信号”的上下文中，“生成”可以意指“直接产生”（例如在发射荧光信号的荧光染料的情况中），或者“间接产生”（在“引发”或“诱导”的意义中），诸如“微生物核酸”经由“标记物”（诸如“荧光染料”），或者经由携带“标记物”（诸如“荧光染料”）的核酸探针“生成”“可检测信号”。

[0081] 如本领域技术人员已知的，术语“特异性”或“特异性杂交”在引物和探针的上下文中暗指对独特的核酸“特异性”的引物或探针在严格条件下结合所述核酸。优选地，依照本发明的方法中使用的引物和探针与微生物核酸和 / 或第一和第二对照核酸的序列部分至少 80% 相同。

[0082] “聚合酶链式反应” (PCR) 披露于美国专利 No. 4, 683, 202、4, 683, 195、4, 800, 159 和 4, 965, 188 等等，并且是用于本发明方法的最优选的核酸扩增技术。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。在本发明中有用的引物包括能够在微生物核酸或定量标准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,但是引物也可以是双链。首先,将双链引物变性,即处理以将链分开。使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 (*Methanothermus 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。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° C 至约 105° C 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 3 秒至 4 分钟(例如 5 秒至 2 分 30 秒,或 10 秒至 1.5 分钟)。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的温度,该温度促进每条引物在微生物核酸和 / 或内部标准核酸上与其靶序列退火。用于退火的温度通常是从约 35° C 至约 75° C(例如约 40° C 至约 70° C、约 45° C 至约 66° C)。退火时间可以从约 5 秒至约 1 分钟(例如约 10 秒至约 50 秒;约 15 秒至约 40 秒)。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微生物核酸和 / 或内部标准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 35° C 至约 80° C(例如约 40° C 至约 75° C;约 45° C 至约 72° C)。延伸时间可以是约 5 秒至约 5 分钟(例如约 10 秒至 3 分钟;约 15 秒至约 2 分钟;约 20 秒至约 1 分钟)。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微生物核酸和 / 或定量标准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。

[0083] 除 PCR 以外的核酸扩增反应包含连接酶链式反应(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(W090/01069); 修复链式反应(Repair Chain Reaction)(EP0439182A2)、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;W092/08808)、以及 NASBA(US5,130,238)。此外,有链置换扩增(SDA)、转录

介导的扩增 (TMA) 和 Q-beta- 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)。

[0084] 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及随后对杂合物的检测。也有可能在本领域技术人员已知的其它步骤后对核酸测序。优选的模板依赖性核酸聚合酶是 Z05DNA 聚合酶及其突变。在本发明中有用的其它模板依赖性核酸聚合酶是 Taq 聚合酶和 Tth 聚合酶。可用于依照本发明方法的其它核酸聚合酶是熟练技术人员已知的。

[0085] 在本发明的上下文中, 微生物核酸和每种对照核酸结合携带不同标记物的不同探针, 从而使其在检测期间彼此可区别。因此, 优选地, 所述不同探针携带不同荧光染料, 其发射不同波长的荧光。可以在荧光检测器的不同通道中彼此独立地有利地检测这些不同的荧光信号, 如用于实施实时 PCR 的大多数装置中使用的。

[0086] 还优选地, 在一个显示器上在不同蔽片 (mask) 中, 或在不同显示器中显现微生物核酸、第一对照核酸和第二对照核酸的结果。

[0087] 在本发明的意义中, 核酸的“纯化”、“分离”或“提取”指如下的情况: 在可以在上文提及的测定法之一中分析核酸前, 必须从含有不同组分的复杂混合物的生物学样品纯化、分离或提取它们。经常, 对于第一步, 使用允许核酸富集的方法。为了释放细胞或病毒颗粒的内容物, 可以用酶或化学品处理它们以溶解、降解或变性细胞壁或病毒颗粒。此过程通常称为裂解。所得的含有这类裂解材料的溶液称为溶胞物。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在裂解规程的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者可以在裂解前已经在不同细胞区室中空间分开。当发生裂解时, 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脂多糖类家族的内毒素, 其对细胞有毒性, 并且可以对意图用于人或动物疗法的产品引起问题。

[0088] 有多种手段来处理上文提及的问题。当意图释放核酸时, 常见的是使用离液剂诸如硫氰酸胍或阴离子、阳离子、两性离子或非离子型去污剂。使用快速降解先前描述的酶或不想要的蛋白质的蛋白酶也是一项优点。然而, 这可能产生另一个问题, 因为所述物质或酶在随后的步骤中可以干扰试剂或组分。

[0089] 可以在上文提及的这类裂解或样品制备过程中有利地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 (W098/04730) 或酸性蛋白酶 (US5, 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。对上文提及的裂解或样品制备方法中的使用特别有利的是酶 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 (EP1201753)。

[0090] 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。

[0091] 有数种用于核酸纯化的方法:

[0092] - 序列依赖性的或生物特异性的方法如例如:

[0093] • 亲和层析

[0094] • 与固定化的捕捉寡核苷酸杂交

[0095] - 不依赖于序列的或物理化学的方法如例如:

[0096] • 用例如酚-氯仿进行的液体-液体萃取

[0097] • 用例如纯乙醇进行的沉淀

[0098] • 用滤纸进行的提取

[0099] • 用微团形成剂如鲸蜡基三甲基溴化铵进行的提取

[0100] • 结合固定化的嵌合染料, 例如吡啶衍生物

[0101] • 吸附至硅胶或硅藻土 (diatomic earth)

[0102] • 在离液序列高的 (chaotropic) 条件下吸附至磁性玻璃颗粒 (MGP) 或有机硅烷颗粒。

[0103] 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用于将核酸自其天然环境分离的规程, 这通过使用其对玻璃表面的结合行为来进行。如果未修饰的核酸是靶物, 那么优选将核酸直接结合至具有硅土表面的材料, 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-A3734442 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, 并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 GB91/00212 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。磁性多孔玻璃也是市场上可购得的,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 MGP 和使用磁性玻璃颗粒的方法是那些记载于 W001/37291 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。

[0104] 在将包含靶核酸的核酸自其天然环境纯化或分离后,可以检测靶核酸。

[0105] 在一个实施方案中,本发明的方法包括避免污染的步骤。例如,一种利用尿嘧啶-DNA 糖基化酶的酶促方法记载于美国专利 No. 5, 035, 996、5, 683, 896 和 5, 945, 313 以降低或消除一次热循环仪运行和下一次之间的污染。另外,标准的实验室防护实践和规程在实施本发明的方法时是期望的。防护实践和规程包括但不限于为方法的不同步骤分开工作区、防护罩、屏障滤器移液管尖端和专用排气式移液管。全体人员的一致防护实践和规程对于诊断实验室操作临床样品中的准确度是必需的。

[0106] 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,检测步骤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。依照本发明,检测继之以定量 FRET。优选地,在每个循环步骤后实施检测步骤。最优选地,实时实施检测步骤。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反应区室,诸如例如小杯中组合。由于检测与扩增同时发生,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。

[0107] 下列专利申请描述了如在 LightCycler™ 技术中使用的实时 PCR: W097/46707、W097/46714 和 W097/46712。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。

[0108] 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,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 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。

[0109] 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。

[0110] 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 SYBRGREEN I®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。

[0111] 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。分子信标技术使用第一荧光模块和第二荧光模块标记的杂交探针。第二荧光模块一般是猝灭剂,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。

[0112] 因此,使用 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所述第一和第二荧光模块之间的空间接近的核酸序列。

[0113] 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。

[0114] 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。

[0115] 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。

[0116] 如上文描述的,在 TaqMan 形式中,在 PCR 反应的退火步骤期间,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 Z05 聚合酶的 5' 至 3' 外切核酸酶活性降解。

[0117] 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。

[0118] 依照本发明的方法可以有利地应用于病毒核酸。因此,在本发明的一个优选的实施方案中,所述微生物核酸是病毒核酸。

[0119] 在病毒核酸中,有利地,可以对 HCV 应用依照本发明的方法。因此,在本发明的一个优选的实施方案中,所述微生物核酸是 HCV 的核酸。然而,必须理解的是也可以对任何其它微生物核酸应用本发明。

[0120] 在下文中描述了如何基于内部标准品在 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。含有靶核酸诸如微生物核酸和充当内部定量标准核酸的第一对照核酸的一组样品在使用如规定的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内部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内部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内部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,即靶核酸和内部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的扩增子拷贝。因此,(CT_{QS} - CT_{靶物})与对数(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:

$$[0121] \quad T' = 10(a(CT_{QS} - CT_{\text{靶物}})^2 + b(CT_{QS} - CT_{\text{靶物}}) + c)$$

[0122] 已知多项式常数和内部定量标准核酸的浓度,因此该等式中唯一的变量是差($CT_{QS} - CT_{\text{靶物}}$)。

[0123] 在下文中描述了如何在 TaqMan 中实施定性结果计算的例子:对来自整个 PCR 运行的、经仪器校正的荧光值的输入数据进行分析。可能含有靶核酸诸如微生物核酸和充当定性内部对照核酸的对照核酸的一组样品在使用如规定的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性内部对照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性内部对照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。对定性内部对照核酸和靶核酸(若存在的话)计算肘值(CT)。肘值定义为靶核酸或内部定量标准核酸的荧光与预定阈值(荧光浓度)相交的点。如果获得在规定范围内的 CT 并且如果荧光超过预定的最小荧光强度,那么定性内部对照是有效的。如果未获得靶物 CT,那么定性内部对照就必须是有效的。如果获得指示样品中靶核酸存在的靶物 CT,那么定性内部对照可以是有效或无效的。

[0124] 在本发明的意义中优选的是上文描述的方法之任一,其中在一种对照试剂内提供所述第一和所述第二对照核酸。

[0125] 有利地,可以对靶向微生物核酸的任何相应测定法使用如下的概念,即具有不同浓度的第一和第二对照核酸的对照试剂用于可靠的定性检测并且同时用于可靠的量化。

[0126] 因此,本发明的另一个方面是不同浓度的第一和第二对照核酸用于通过实时 PCR 来同时检测并量化微生物核酸的用途。进一步优选的是上文描述的用途,其中通过相同引物对或不同引物对扩增所述第一和第二对照核酸,但是它们与不同探针杂交。

[0127] 特别有利的是此概念在依照本发明的方法中的用途。因此,在另一个方面,本发明关注不同浓度的第一和第二对照核酸依照上文描述的一种或多种方法用于同时检测并量化微生物核酸的用途。

[0128] 本发明还提供了用于通过实时 PCR 来同时检测并量化生物学样品中的微生物核酸的试剂盒,所述试剂盒包含不同浓度的第一和第二对照核酸、与所述微生物核酸的独特序列部分以及所述第一和第二对照核酸的独特序列部分特异性杂交的一种或多种引物对、和与由所述一种或多种引物对扩增的每种序列特异性杂交的探针,其中在一种对照试剂内提供所述第一和第二对照核酸。

[0129] 在一个优选的实施方案中,本发明提供了用于依照上文描述的任何方法同时检测并量化生物学样品中的微生物核酸的试剂盒,所述试剂盒包含不同浓度的第一和第二对照核酸、与所述微生物核酸的独特序列部分以及所述第一和第二对照核酸的独特序列部分特异性杂交的一种或多种引物对、和与由所述一种或多种引物对扩增的每种序列特异性杂交的探针。

[0130] 本发明的一个进一步的优选方面是如上文所描述的试剂盒,其中通过相同引物对扩增所述第一和第二对照核酸,但是它们与不同探针杂交,如此提供竞争性设置。然而,必须理解的是本发明也包括非竞争性或部分竞争性测定法和用于实施相应方法的试剂盒。

[0131] 如本领域中已知的,这类试剂盒可以进一步包含可以在样品制备规程

期间使用的塑料器皿（如例如 96 孔或 384 孔形式的微量滴定板或者由例如 Eppendorf, Hamburg, Germany 制造的普通反应管）和用于实施依照本发明方法的任何其它试剂。因此，所述试剂盒可以另外含有对核酸具有亲和力的材料，优选地，对核酸具有亲和力的材料包含具有硅土表面的材料。优选地，具有硅土表面的材料是玻璃。最优选地，对核酸具有亲和力的材料是包含磁性玻璃颗粒的组合物。试剂盒可以进一步或另外包含蛋白酶试剂和含有例如离液剂、去污剂或醇或其混合物的裂解缓冲液，从而允许裂解细胞。可以在管或贮存容器中分开地提供依照本发明的试剂盒的这些组分。根据组分的性质，这些甚至可以在单个管或贮存容器中提供。试剂盒可以进一步或另外包含适合于在核酸与磁性玻璃颗粒结合时对其进行清洗步骤的清洗溶液。此清洗溶液可以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。所述试剂盒可以进一步或另外包含洗脱液或洗脱缓冲液，即用于洗脱与磁性玻璃颗粒结合的核酸的溶液或缓冲液（例如 10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0）或纯水。此外，可以存在别的试剂或缓冲溶液，其可以用于核酸的纯化过程。

[0132] 优选地，所述试剂盒含有具有 5' 至 3' 外切核酸酶活性的酶聚合酶。还优选的是，所述试剂盒含有具有逆转录酶活性的酶。

[0133] 在另一个优选的实施方案中，所述试剂盒含有具有 5' 至 3' 外切核酸酶活性和逆转录酶活性的酶聚合酶。

[0134] 在本发明的一个优选的实施方案中，将依照本发明的方法插入分析系统内实施的方法的顺序中，由此优选地，形成可自动化的过程。

[0135] 因此，本发明的一个优选方面是以下内容：

[0136] 用于通过实时 PCR 来同时检测并量化生物学样品中的微生物核酸的分析系统，所述系统包含

[0137] - 包含裂解缓冲液和容器的样品制备模块，用于分离和纯化所述微生物核酸

[0138] - 包含反应接受器的扩增和检测模块，其中实施上文描述的方法

[0139] - 如上文描述的试剂盒。

[0140] 有利地，样品制备模块可以包含用于上文描述的样品制备规程的组分，即例如磁性玻璃颗粒和用于将它们与溶液分开的磁体、蛋白酶试剂、离液盐溶液和一个或多个含有粗制样品和样品制备需要的试剂的容器。

[0141] 扩增和检测模块中的反应接受器可以例如是微量滴定板、离心瓶、裂解管、或适合于含有依照本发明的反应混合物的任何其它类型的容器。

[0142] 在本发明的一个优选的实施方案中，所述分析系统含有贮存模块，其含有用于实施本发明方法的试剂。

[0143] 所述贮存模块可以进一步含有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甚至要在扩增和检测模块内用作反应接受器的容器。

[0144] 在本发明的一个优选的实施方案中，所述分析系统包含预分析系统模块，用于将生物学样品从初级管转移到分析系统上可用的容器。

[0145] 在本发明的又一个优选的实施方案中，所述分析系统含有转移模块，用于将生物学样品从样品制备模块转移到扩增和检测模块。

[0146] 尽管手动实施所述转移是有可能的,但是优选的是使用自动化系统,其中例如通过机器人装置诸如例如电动机驱动的移动架或机器人摆动臂实施转移。

[0147] 可自动化方法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。自动化方法意味着用仪器或机器实施可自动化方法的步骤,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,必须人为实施样品的选择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。

[0148] 因此,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。

[0149] 这类控制单元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(例如以协调方式将组件诸如样品移动到反应模块)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响应。

[0150] 依照本发明的用途、试剂盒和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。

[0151] 附图描述

[0152] 图 1a :

[0153] 在图中显示了商业 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 测试的定量实时 PCR 反应的内部对照增长曲线。PCR 反应含有跨越 5 个 $\log_{10}$ 范围的 HIV-1 靶物浓度和靶物阴性样品。如果反应中存在较高的靶物浓度(参见“靶物高度阳性”),那么内部定量标准核酸(QS)达到的荧光水平显著低于在不存在 HIV-1 靶物的 PCR 反应(参见“靶物阴性”)的情况中的。因为 QS 在所有靶物浓度都必须是有有效的,从而能够计算定量结果输出的滴度,所以 QS 的最小荧光强度水平设置(“RFImin”)较低。表 1 中给出了三种商业测试 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV、HCV 和 HIV-1 中定量结果输出的 RFImin 设置。

[0154] 图 1b :

[0155] 在图中显示了商业 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 测试的实时 PCR 反应的内部对照增长曲线。所有 PCR 反应都含有 HIV-1 靶物阴性样品。内部对照增长曲线的荧光水平约束在较窄的范围内,并且定性内部对照核酸(IC)的最小荧光强度水平设置(“RFImin”)较高。在靶物阳性反应中,IC 可以落到 RFImin 之下,并且可以变为无效;在靶物存在的情况下,PCR 反应的结果仍然有效。表 1 中给出了如对测试 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV、HCV 和 HIV-1 的定性结果输出优化的 RFImin 设置。

[0156] 图 2 :

[0157] 装甲的 RNA 颗粒的生成:用于生成装甲的 RNA 颗粒的表达载体和装甲的 RNA 颗粒的电子显微术。在大肠杆菌(E. coli)中构成装甲的 RNA 颗粒。诱导 lac 操纵子后,mRNA 受到转录,其包含 MS-2 外壳蛋白的 MS-2 噬菌体基因、控制序列、包装信号和在 TrnB 终止子上游的质粒序列。在外壳蛋白翻译后,自发发生颗粒组成,其包装一个拷贝的 mRNA。

[0158] 图 3 :

[0159] 对含有 HCV 靶物、第一对照核酸和第二对照核酸的实时 PCR 反应获得的标准化增长曲线。

[0160] 图 4a:

[0161] HCV-RNA 和 QS 的同时扩增。QS 和 HCV-RNA 两者的信号强度都低于在产生标准信号的反应中的 (参见图 4b)。

[0162] 图 4b:

[0163] HCV-RNA 和 QS 的同时扩增。这两种反应都产生标准荧光强度。为了与受抑制的荧光曲线比较 (参见图 4a), 还要注意两幅图中的不同幅度。

实施例

[0164] 实施例 1: 依照用于获得定性和定量结果输出的不同标准来评估第一对照核酸。

[0165] COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV、HCV 和 HIV-1 测试是商品化的实时 PCR 测试, 其已经经过优化以准确量化病毒靶物 HBV、HCV 和 HIV-1。在全自动化 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 系统 (其包含用于将 PCR 反应混合物从样品制备单元自动化转移到扩增/检测单元的对接 (docking) 站) 上或者在手动转移的 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 系统上或者在 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan48 系统上使用该测定法。

[0166] 使用 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV 测试作为一个例子来调查用一组相同试剂提供同时的定量和定性测试结果的办法。该测试具有 15IU/mL 的检测限, 并且显示现有技术的灵敏度, 与市场上的定量而且也是定性的 HCV 测试相当或比它们好。由于此较高的灵敏度, 已经有也使用该测试作为定性 HCV 测试的尝试。定量测试的主要焦点是提供准确的 HCV 滴度, 而定性测试的主要焦点是确保测定法的高灵敏度。由于最初开发 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV 测试用于定量监测治疗成功与否, 对该测定法是否也可以在没有任何变化的情况中使用以提供可靠的定性结果进行分析。对数据的审查揭示, 在不太有效的 PCR 的罕见事件中, 具有其目前数据分析设置的定量测试没有保证 15IU/mL 的灵敏度。在下文给出了受到抑制, 但是显示有效的 QS 结果且不能检出靶物 (2183IU/mL) 的 PCR 反应的一个例子:

[0167] 在图 4a 中显示了受抑制的 PCR 反应, 其产生由于有效的 QS 所致的有效结果和“未检出靶物”的结果。QS 是有效的, 因为其超过对应于 0.8 个相对荧光单位的荧光阈值设置。

[0168] 相同样品的重复测试显示了标准的 PCR 反应和 2183IU/mL 的 HCV 滴度结果 (图 4b)。

[0169] 因此, 没有任何变化的定量 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV 测试不能用作定性测试。

[0170] 使用上文提及的测试, 优化 IC/QS 对照核酸的数据分析参数设置从而实现可靠的定性结果输出。为了证明普遍适用性, 另外, 在 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 系统上对所有三种商业 HBV、HCV 和 HIV-1 测定法采取优化。通过显著提高参数设置中的最小相对荧光强度 (RFI_{min}) 阈值, 确保所有三种定量测试的灵敏度, 从而可以使用它们来提供可靠的定性结果输出。在下文表 1 中显示了相关参数设置:

[0171] 表 1: 商品化定量应用和定性应用中三种 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 测试的内部对照的 RFI_{min} 设置。

[0172]

	定量RFI _{min} IQS	定性RFI _{min} IQS
COBAS AmpliPrep / COBAS TaqMan上	1.5	10.4
的HBV测试		
COBAS AmpliPrep / COBAS TaqMan上	1.8	9.0
的HCV测试		
COBAS AmpliPrep / COBAS TaqMan上	1.2	20.4
的HIV-1测试		

[0173]

[0174] 定性 RFI_{min} 设置 9.0 会使上文对 HCV 给出的例子中的受抑制的 PCR 反应无效。

[0175] 定性结果输出的上述 RFI_{min} 设置不能同时用于定量结果输出, 因为靶物的存在可以影响 IC/QS 增长曲线的荧光强度, 如图 1a 中显示的。结果, 在存在高靶物浓度的情况下, 定性 RFI_{min} 设置导致较高百分比的 IC/QS 无效反应。相比之下, 这并不影响定性结果输出的有效性, 因为 IC 在存在靶物的情况中不得 (must not) 是有效的。尽管定量反应的有效性受到显著影响。

[0176] 因此, 如果要使用具有一种 IC/QS 的相同测试试剂来提供可靠的定性结果输出 (具有保证的测试灵敏度) 和可靠的定量测试结果 (具有可接受的低水平的 QS 无效结果) 两者, 这仅可以通过用如这里提出的两组不同参数设置分析原始数据来实现。

[0177] 实施例 2: 使用不同浓度的第一和第二对照核酸用相同测试试剂获得定量和定性结果输出。

[0178] 目的是用同一组测试试剂提供可靠的定性结果输出和可靠的定量测试结果两者。在解决此目的的此办法中, 含有内部对照核酸的试剂包含具有两种不同装甲的 RNA 颗粒的配制剂。可以使用下列试剂进行此实验:

[0179] a) COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV 测试的样品制备试剂 (磁性颗粒悬浮液; 蛋白酶溶液, 裂解缓冲液, 洗脱缓冲液)

[0180] b) 浓度水平为约 1000 个拷贝 / 反应的 QS 装甲颗粒和浓度水平为约 100 个拷贝 / 反应的 IC 装甲颗粒。在下文图 2 中显示了装甲 RNA 颗粒的生成。由装甲颗粒封入的转录物具有不同引物结合位点和不同探针结合位点。与黑洞 (black hole) 猝灭剂 BHQ 一起用荧光标记物 HEX 和 CY5 标记探针。

[0181] c) 镁试剂

[0182] d) 主混合物 (mastermix) 试剂, 其包含:

[0183] - Z05DNA 聚合酶和 UNG

[0184] - 针对靶 HCV、针对第一和针对第二对照核酸的三种不同引物对

[0185] - 用 FAM 和 BHQ 标记的针对靶物、用 HEX 和 BHQ 标记的针对第一对照核酸和用 CY5 和 BHQ 标记的针对第二对照核酸的三种不同探针

[0186] - 适体

[0187] -dNTP (dUTP、dATP、dCTP、dGTP、dTTP)

[0188] - 主混合物缓冲液成分 (醋酸钾、甘油、Tricine、DMSO、甜菜碱、IGEPAL、水)

[0189] 使用对 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV 测试建立的标本提取参数和 PCR 文件来实施样品制备和扩增 / 检测步骤。获得三种不同荧光染料的增长曲线, 并且在图 3 中呈现。

[0190] 对于 HCV 样品, 如下测定滴度以获得定量结果输出: 在完成 PCR 运行后, 处理荧光读数以产生 QS 核酸 (HEX 荧光标记物) 的一组染料浓度数据、定性标准核酸 (CY5 荧光标记物) 的一组染料浓度数据、和靶核酸 (FAM 荧光标记物) 的一组染料浓度数据。以相同方式处理所有三组染料浓度数据。对定量和定性标准核酸以及靶核酸计算肘值 (CT)。肘值定义为靶核酸或两种内部对照核酸的荧光与预定阈值 (荧光浓度) 相交的点。

[0191] 对于定量结果输出, 通过仅分析 HEX 和 FAM 的染料浓度数据来完成滴度测定。滴度测定基于如下的假定, 即靶核酸和 QS 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 QS 核酸的扩增子拷贝。因此, (CTQS - CT 靶物) 与对数 (靶物浓度 / QS 浓度) 呈线性。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, 其中该等式中唯一的变量是差 (CTQS - CT 靶物):

[0192] $T' = 10(a(CTQS - CT \text{ 靶物})^2 + b(CTQS - CT \text{ 靶物}) + c)$

[0193] 对于定性结果输出, 仅分析 CY5 和 FAM 的染料浓度数据。通过比较 CY5 和 FAM 的染料浓度数据, 软件确定 PCR 反应呈靶物阴性还是阳性。如果 PCR 反应呈靶物阳性, 那么忽略 IC 结果, 并且因此其可以是有效或无效的。如果 PCR 反应呈靶物阴性, 那么结果仅在 IC 显示有效结果时才是有效的。在上文显示的实施例, 所有反应都含有较低水平的 HCV 靶物, 并且尽管对于相应测试结果的有效性而言无关, 所有反应都显示有效的 IC。

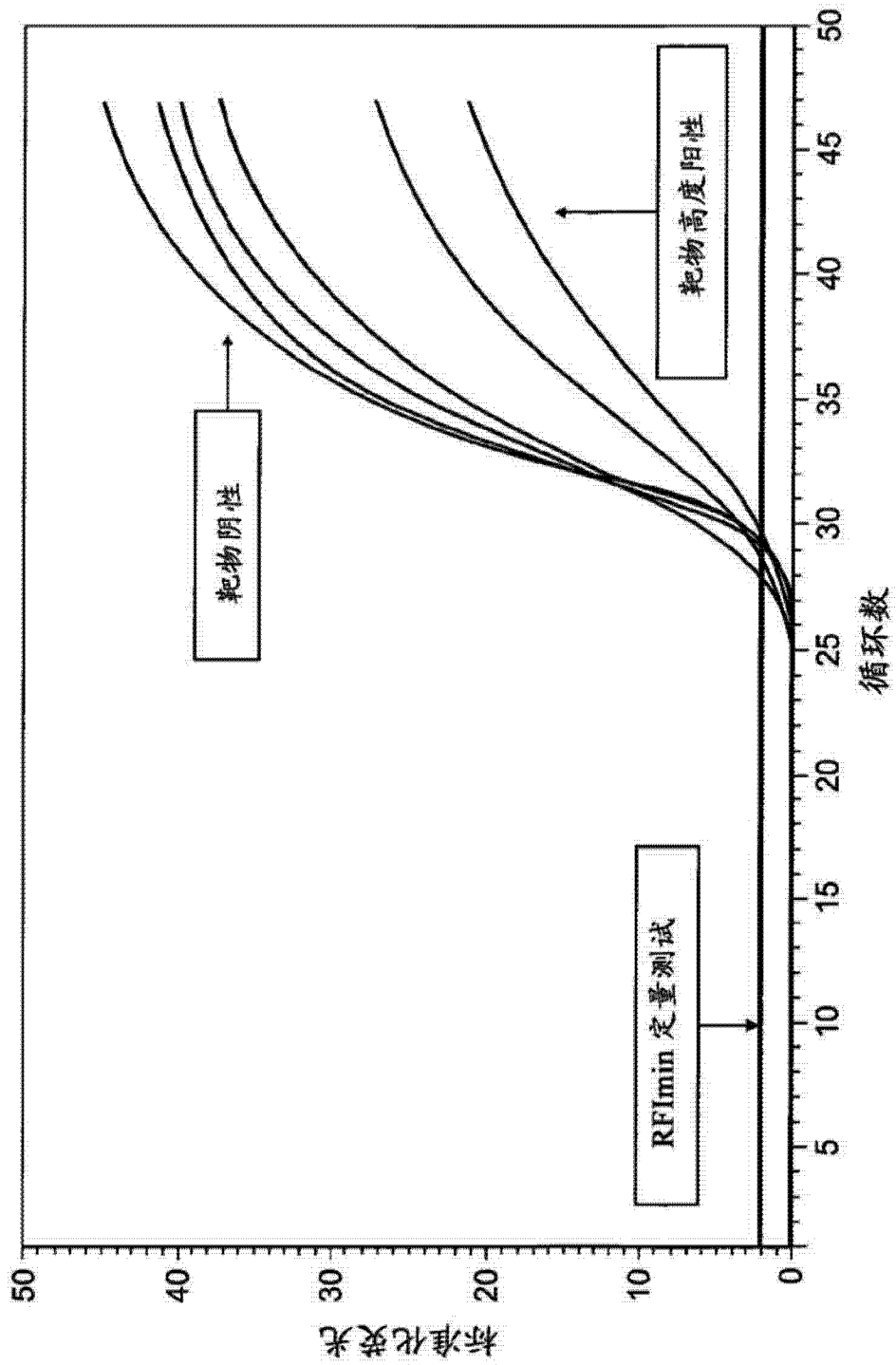


图 1a

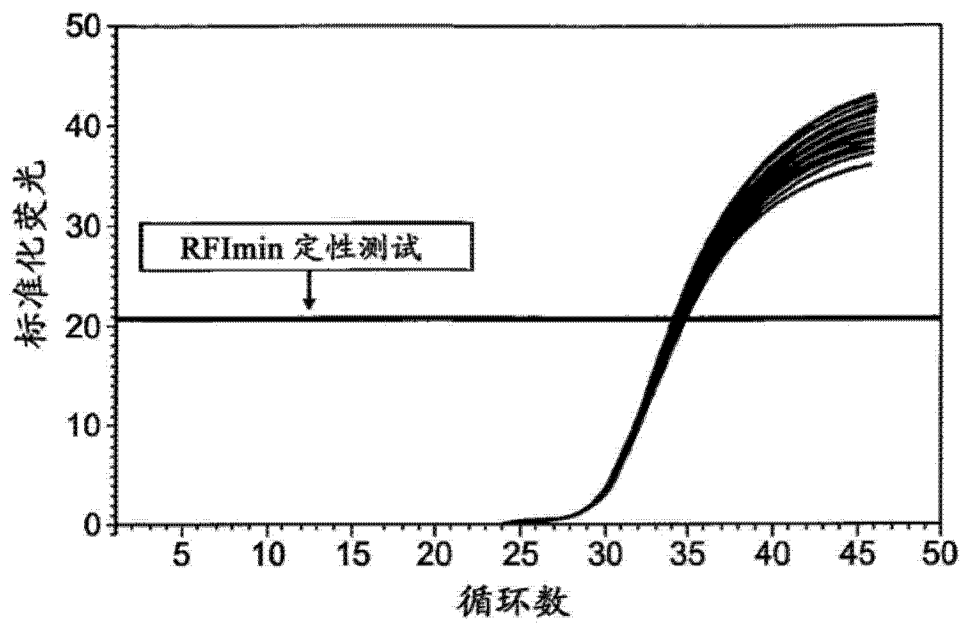
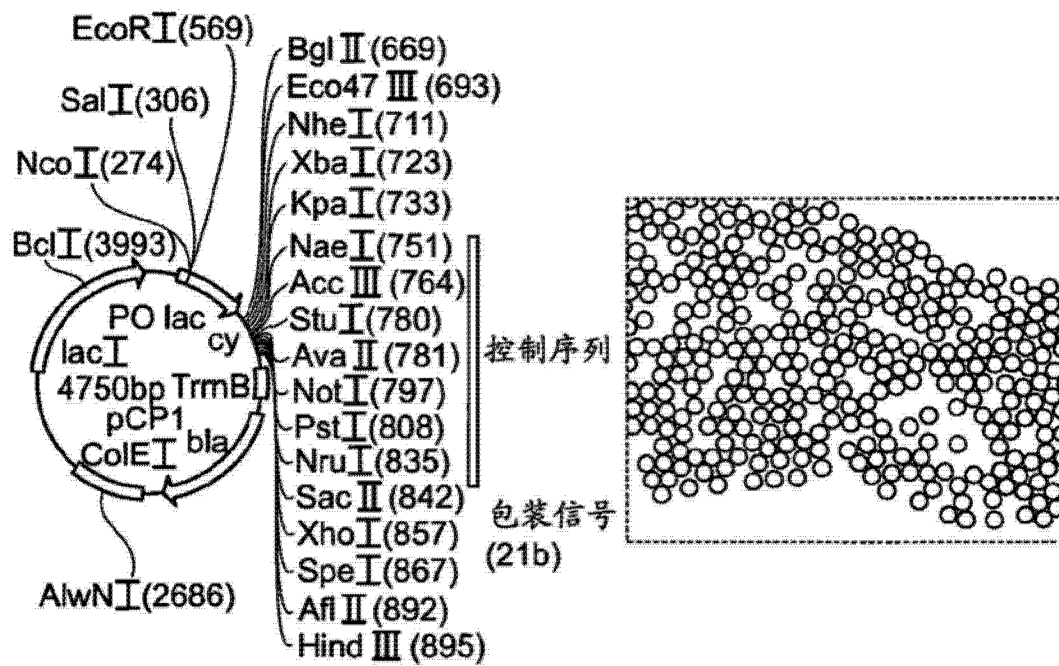


图 1b



aRNA 颗粒的表达载体和 aRNA 颗粒

图 2

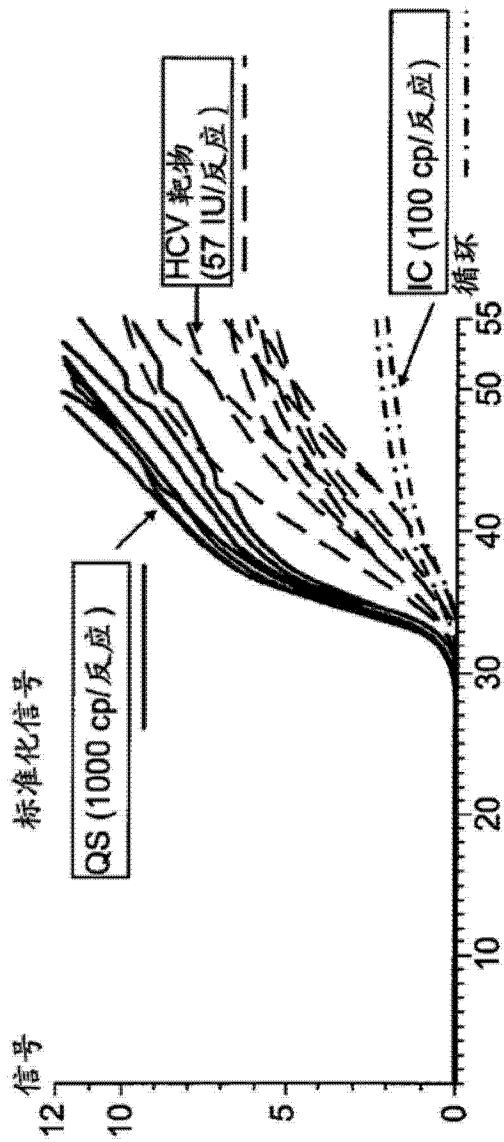


图 3

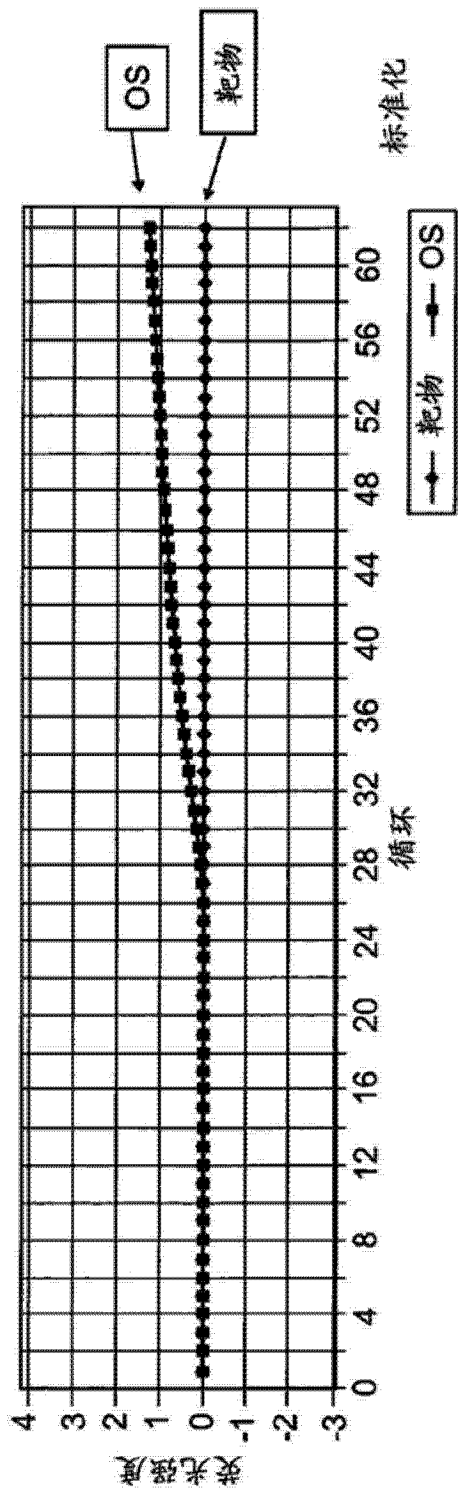


图 4a

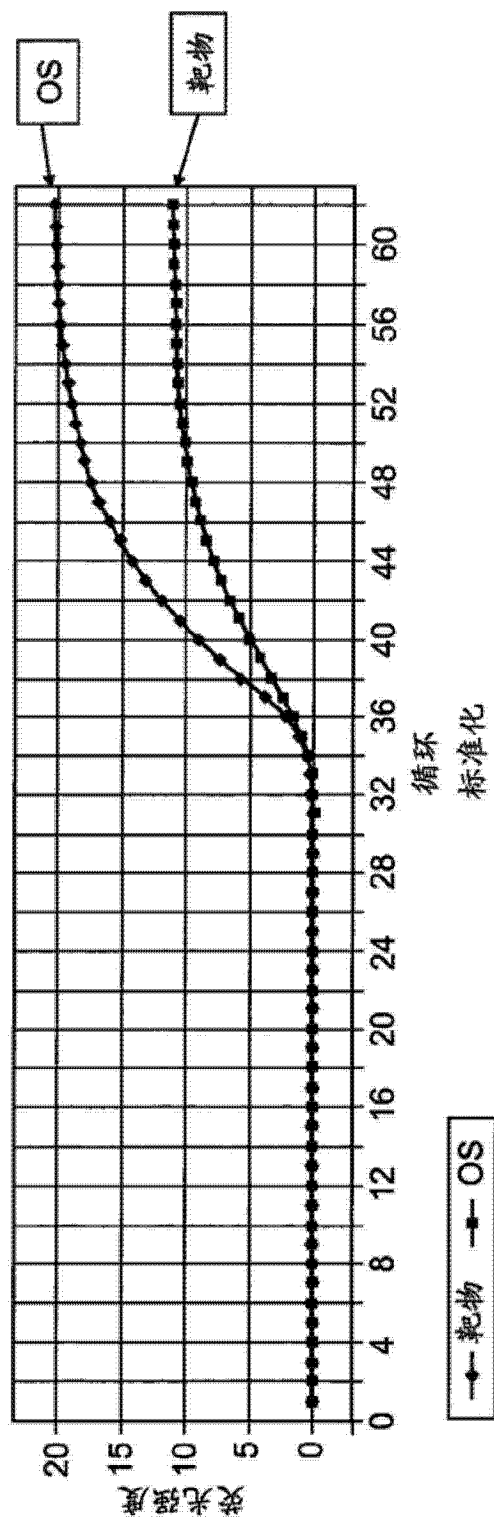


图 4b