



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

(45) 공고일자

2006년12월01일

(11) 등록번호

10-0653156

(24) 등록일자

2006년11월27일

(21) 출원번호	10-2004-7002899	(65) 공개번호	10-2004-0029076
(22) 출원일자	2004년02월27일	(43) 공개일자	2004년04월03일
심사청구일자	2004년02월27일		
번역문 제출일자	2004년02월27일		
(86) 국제출원번호	PCT/EP2002/009496	(87) 국제공개번호	WO 2003/020967
국제출원일자	2002년08월24일	국제공개일자	2003년03월13일

(30) 우선권주장 01120466.6 2001년08월28일 유럽특허청(EPO)(EP)

(73) 특허권자  
에프. 호프만-라 로슈 아게  
스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124(72) 발명자  
바인델쿠르트  
독일82407빌렌바흐-하르트피취텐슈트라쎄3비  
크라이스슈테판  
미국94566캘리포니아주플래전턴루세로코드4283  
베르크만프랑크  
독일82393이펠도르프팔터가터5  
요젤한스-페터  
독일82362바일하임울멘슈트라쎄28  
하인들디이터  
독일82327톳찡발트슈미트슈트라쎄1(74) 대리인  
특허법인코리아나

심사관 : 이형곤

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 복수 분석물의 결정 방법

(57) 요약

본 발명은 특이적 결합 파트너를 사용하여 3 가지 이상의 분석물을 결정 방법에 관한 것이다. 검출가능한 표지의 조합은, 각각의 결합 파트너 분자가 단지 하나의 검출가능한 표지에 커플링되는 것을 보장하는 결합 파트너에 결합된다. 이는, 사용가능한 표지의 범위를 한정하지 않으면서, 사용된 상이한 표지 보다 더욱 상이한 분석물의 결정을 가능하게 한다. 본 발명은 또한 키트, 물질의 조성물, 및 이의 용도에 관한 것이다.

## 대표도

도 1

### 특허청구의 범위

#### 청구항 1.

3 가지 이상의 핵산 분석물의 결정 방법에 있어서, 하기 단계를 포함하는 방법:

a) 상기 3 가지 이상의 핵산 분석물을 증폭시킨 후, 3 가지 이상의 핵산 분석물을 함유하거나 상기 핵산 분석물 중 하나 이상을 함유할 것으로 의심되는 샘플과, 3 가지 이상의 상이한 핵산 서열 특이적 프로브의 혼합물을, 상기 증폭된 핵산 분석물에 대한 상기 핵산 서열 특이적 프로브의 특이적 결합이 가능한 조건하에 제공하는 단계에 있어서 하기를 특징으로 하는 단계:

- 상기 3 가지 이상의 핵산 서열 특이적 프로브 중 제 1 의 핵산 서열 특이적 프로브는 상기 3 가지 이상의 핵산 분석물 중 제 1 의 핵산 분석물에 특이적이고, 제 1 의 표지에 커플링되며,
- 상기 3 가지 이상의 핵산 서열 특이적 프로브 중 제 2 의 핵산 서열 특이적 프로브는 상기 3 가지 이상의 핵산 분석물 중 제 2 의 핵산 분석물에 특이적이며, 제 2 의 표지에 커플링되고, 상기 표지는 상기 제 1 의 핵산 서열 특이적 프로브에 커플링된 표지로부터 개별적으로 검출가능하며,
- 상기 3 가지 이상의 핵산 서열 특이적 프로브 중 제 3 의 핵산 서열 특이적 프로브는 상기 3 가지 이상의 핵산 분석물 중 제 3 의 핵산 분석물에 특이적이며, 상기 제 3 의 핵산 서열 특이적 프로브의 제 1 의 양은 상기 제 1 의 핵산 서열 특이적 프로브에 커플링되는 것과 동일한 표지에 커플링되고, 상기 제 3 의 핵산 서열 특이적 프로브의 제 2 의 양은 제 2 의 핵산 서열 특이적 프로브의 것과 동일한 표지에 커플링되며,

상기 제 3 의 핵산 서열 특이적 프로브의 상기 제 1 의 양은 제 2 의 핵산 서열 특이적 프로브에 커플링되는 것과 동일한 표지에 커플링되지 않고, 상기 제 3 의 핵산 서열 특이적 프로브의 상기 제 2 의 양은 제 1 의 핵산 서열 특이적 프로브에 커플링되는 것과 동일한 표지에 커플링되지 않음;

b) 상기 제 1 및 제 2 의 표지에 대해 나타난 시그널 강도를 검출하는 단계; 및

c) 상기 단계 b)에서 검출되는 상기 시그널 강도 및 상기 시그널 강도의 비율을 사용하여 상기 샘플 중에 존재하는 핵산 분석물을 결정하는 단계.

#### 청구항 2.

삭제

#### 청구항 3.

제 1 항에 있어서, 상기 핵산이 PCR 을 사용하여 증폭되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 4.

제 1 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 의 표지에 대해 나타난 시그널 강도가 균질하게 검출되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5.

제 4 항에 있어서, 상기 표지가 형광 에너지 전송을 사용하여 검출되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6.

제 1 항에 있어서, 상기 제 1, 제 2 및 제 3 의 핵산 서열 특이적 프로브 중 제 1 의 핵산 서열 특이적 프로브는 HIV 에 특이적이고, 제 2 의 핵산 서열 특이적 프로브는 HCV 에 특이적이며, 제 3 의 핵산 서열 특이적 프로브는 HBV 에 특이적인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7.

제 1 항에 있어서, 제 1 의 핵산 서열 특이적 프로브는 HIV-1-M 에 특이적이고, 제 2 의 핵산 서열 특이적 프로브는 HIV-1-O 에 특이적이며, 제 3 의 핵산 서열 특이적 프로브는 HIV-2 에 특이적이고, 제 4 의 핵산 서열 특이적 프로브는 HCV 에 특이적이다, 제 5 의 핵산 서열 특이적 프로브는 HBV 에 특이적이며, 제 6 의 핵산 서열 특이적 프로브는 HAV 에 특이적인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 8.

삭제

### 청구항 9.

하나 이상의 용기 중에 하기를 함유하는, 3 가지 이상의 핵산 분석물의 결정용 키트:

- a) 제 1 의 표지에 커플링된, 제 1 의 핵산 분석물에 특이적인 제 1 의 핵산 서열 특이적 프로브,
- b) 제 2 의 표지에 커플링된, 제 2 의 핵산 분석물에 특이적인 제 2 의 핵산 서열 특이적 프로브로서, 상기 표지가 상기 제 1 의 핵산 서열 특이적 프로브에 커플링되는 표지로부터 개별적으로 검출가능한 제 2 의 핵산 서열 특이적 프로브,
- c) 제 3 의 핵산 분석물에 특이적인 제 3 의 핵산 서열 특이적 프로브로서, 상기 제 3 의 핵산 서열 특이적 프로브의 제 1 의 양은 제 1 의 핵산 서열 특이적 프로브에 커플링되는 것과 동일한 표지에 커플링되며, 상기 제 3 의 핵산 서열 특이적 프로브의 제 2 의 양은 상기 제 2 의 핵산 서열 특이적 프로브의 것과 동일한 표지에 커플링되고, 상기 제 3 의 핵산 서열 특이적 프로브의 상기 제 1 의 양은 상기 제 2 의 핵산 서열 특이적 프로브에 커플링되는 것과 동일한 표지에 커플링되지 않으며, 상기 제 3 의 핵산 서열 특이적 프로브의 상기 제 2 의 양은 상기 제 1 의 핵산 서열 특이적 프로브의 것과 동일한 표지에 커플링되지 않는 제 3 의 핵산 서열 특이적 프로브.
- d) 핵산 증폭용 시약.

### 청구항 10.

삭제

### 청구항 11.

삭제

## 청구항 12.

삭제

명세서

### 기술분야

본 발명은, 분석물 특이적 결합 파트너를 이용하는 복수 분석물의 결정 방법에 관한 것으로, 상기 결합 파트너는 사용된 상이한 결합 파트너 보다 덜 상이한 표지로 표지화된다. 추가로, 본 발명은 이러한 상이하게 표지된 결합 파트너를 함유하는 물질의 조성물, 및 복수 분석물의 결정을 위한 상기 조성물의 용도 뿐만 아니라, 적합한 키트에 관한 것이다.

### 배경기술

샘플 중의 분석물의 결정은, 특히 헬쓰케어 분야, 영양학 및 생태학 분야에서 특별한 중요성을 갖는다. 분석물에 따라, 상이한 결정 방법이 사용될 수 있다. 금속 이온, 당 단량체, 아미노산과 같은 소형 분자는 종종 이들의 화학적 특성 또는 물리적 특성에 의해 결정된다. 단백질 및 핵산 중합체와 같은 보다 큰 분자량을 갖는 분석물은 또한 이들에 특이적 친화성을 갖는 결합 파트너를 사용하여 결정될 수 있다. 결합 파트너의 유용한 쌍은 항체-항원, 기질-효소, 핵산-상보 핵산, 당-렉틴이 있다. 항원적 특성을 나타내는 것으로 알려진 특이적 단백질을 결정하고자 의도하는 경우에, 특이적 항체가 상기 결정에 사용될 수 있다. 특이적 핵산 서열의 결정을 위해서, 상보적 서열을 갖는 핵산 프로브가 사용될 수 있다. 상기 결합 검사 및 적당한 프로토콜은 당업계에 자명하게 공지되어 있고, 문헌 [예를 들어, Sambrook 등, 1985, Molecular Cloning – Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames and S.J. Higgin, eds. 1984) 및 Methods in Enzymology 시리즈 (Academic Press, Inc.)]에 충분히 설명되어 있다.

특이적 결합 파트너-분석물 복합체의 검출을 가능하게 하기 위해, 결합 파트너를 표지화하는 것이 매우 통상적이며, 그럼으로써 상기 표지를 상기 표지에 결합하는 부가적인 시약을 사용하여 (예를 들어, 아비딘-서양고추냉이 페옥시다아제 콘쥬게이트 및 검출을 위한 적합한 효소-기질 반응을 사용하여 검출할 수 있는, 표지로서 바이틴을 사용하여) 직접적으로 또는 간접적으로 검출할 수 있다. 적합한 표지가 당업계에 공지되어 있다.

수많은 경우에, 특히 진단 분야에서, 뚜렷한 양상에 대한 완전한 소견을 얻기 위해서는 둘 이상의 분석물을 결정하는 것이 필요하다. 예를 들어, 클라미디아 트라코마티스 (*Chlamydia trachomatis*) 감염을 가질 수 있는 환자에 대해, 일반적으로는 의사는 클라미디아 트라코마티스뿐만 아니라, 네이세리아 고노르호에아에 (*Neisseria gonorrhoeae*) 감염에 대해서도 확인할 것이다. 또한, 환자의 HLA 패턴을 확립하는 경우, 각종 상이한 HLA 좌위(locus)의 대립유전자를 결정하는 것이 필요하다.

복수 분석물의 결합 검사를 수행하는 경우, 사용되는 표지에 주위를 귀울어야만 한다. 제 1의 경우로, 모든 상이한 결합 파트너에 대해 동일한 표지가 사용된다. 이 경우에, 두 가지의 다른 포맷이 구별되어야만 한다. 모든 결합 반응이 하나의 반응으로 함께 수행된다면, 포지티브 결과는 샘플 중에 존재하는 하나 이상의 분석물이 있다는 것만을 보여주지만, 어떤 것이 양성 결과를 나타내는지는 보여주지 못한다. 대안으로서, 순차적인 반응 또는 평행적 반응 포맷을 수행함으로써 각각의 결합 반응을 분리할 수 있다. 적합한 포맷에는, 예를 들어 마이크로타이터플레이트(microtiterplate-assay)-검사 또는 도트-블랏-검사가 있다. 상기 포맷을 사용하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 이러한 포맷은 시간 소비적이며, 수많은 조작 단계를 요구하여, 증가된 비용 및 감염 위험을 초래할 수 있다. 바이오칩을 사용하는 더욱 정교한 방법은 매우 비싸고, 특히 핵산 중폭 분야에서 오염에 관한 취급을 어렵게 한다.

단지 하나의 결합 및/또는 검출 반응 내에서 각종 분석물의 구별된 검출을 가능하게 하기 위해서, 개별적으로 검출될 수 있는 상이한 표지를 사용하여 상이한 특이적 결합 파트너를 표지화될 수 있다. 이러한 표지 및 사용가능한 검출 방법은 당업계에 자명하게 공지되어 있다. 예를 들어, 광학적 방출 스펙트럼에 의해 검출될 수 있는 표지를 사용할 수 있으며, 이때 각각의 표지는 상이한 방출 스펙트럼을 갖는다. 그러나, 고민감도로, 그리고 충분히 안정하게 개별적으로 검출할 수 있는 적합한 표지의 갯수에 제한이 있기 때문에, 상기 검사는 실제로 단지 몇몇 분석물의 결정에만 한정된다는 것이 주지되어야만 한다. 적당한 희토산화물 (rare earth) 표지의 경우에, 값비싸며, 시간-해석적 형광측정용의 매우 정교한 값비싼 검출기가 필요하다. 이러한 제약은 균질한 검출 방법에 관하여 특히 중요하다. 이러한 포맷은 일반적으로, 분석물에 특이적으로 결합하지 않는 결합 파트너를 제거하기 위한 세척 단계가 없으면, 매우 높은 배경 시그널로 고생하며, 이는 적절하게 복수 검출 시그널의 해석을 어렵게 한다.

복수의 광학 채널을 특징으로 하는 검출기와 연결된 복수 표지화는 수많은 조사자들에 의해 사용되어 왔다. 예를 들어, Vet 등 (PNAS 96, 6394–6399 (1999)) 는, 4 가지의 상이한 표적에 상보적인 4 가지의 특이적 프로브(분자 비콘 (Molecular beacons))를 4 가지의 상이한 리포터(reporter) 염료로 각각에 대해 1 개의 염료씩 표지화하는 방법론을 사용한다. 각 염료의 전체적인 형광 스펙트럼은 컴퓨터 중에 저장되고, 복잡한 다양한 결과를 해석하기 위해 사용된다. 이는 스펙트럼 기여 분석을 통해 공감염을 해석할 수 있는 요구를 처리하기 위해서, 매우 정교한 소프트웨어에 대한 필요성을 수반한다. 이는, 최대 게인(gain) 상에서 각각의 특정 염료(광학 채널)에 대한 상이한 염료로부터의 형광 시그널의 개별적인 표준화, 즉 대응하는 플래토(plateau)에 관계하지만, 통상적인 기준 상에서 시그널 분포를 분석할 수 있기 위해서 참조 염료 상에서 상이한 광학 채널을 교차하지 않는, 채널-특이적 성장 곡선의 표준화를 포함한다. 다른 예에는, Josephsson 등 (J. Clin. Microbiol. 37/3, 490–496 (1999); 검사마다 3 가지 이하의 표적에 대한 3 가지 이하의 상이하게 표지된 분자 비콘) 및 Mercier 등 (J. Virol. Methods 77, 1–9 (1999); 검사마다 2 가지의 표적에 대한 2 가지의 상이하게 표지화된 프로브)가 포함된다.

또한, 식별가능한 갯수의 표지로 검출가능한 분석물의 갯수를 증가시키기 위해서, 결합 파트너의 표지화를 위한 표지의 조합이 사용될 수 있다. 또한, 하나의 식별가능한 부착 표지를 갖는 결합 파트너 외에, 단일 표지화된 결합 파트너에 또한 커플링된 동일한 종류의 표지를 사용하여 둘 이상의 표지에 커플링되는 결합 파트너가 사용된다. 예를 들어 3 가지의 상이한 표지를 사용하면, 7 가지의 표지 조합이 가능하며, 따라서 7 가지의 상이한 분석물이 또한 검출될 수 있다. 유사한 원리를 이용하는 *in-situ* 하이브리드형성 방법이, 문헌 [T. Ried 등, Proc. Natl. Acad. Sci USA, Vol. 89, pp. 1388–1392 (1992)]에 기재되어 있다. PCR 을 사용하는, 샘플 중의 7 가지의 상이한 인간 팜필로마(Papilloma) 바이러스 유형의 결정을 위한 유사한 방법, 및 그 후의 프로브 하이브리드형성 검사는 문헌 [Samiotaki 등, Analytical Biochemistry Vol. 253, p.156–161 (1997)]에 기재되어 있다. 이런 목적을 위하여, 올리고뉴클레오타이드는 복수의 키레이트화제 부분구조에 의해, 5'-말단이 변형된다. 이후, 개별적인 키레이트 단위는, 하나 및 동일한 종류의 희토 산화물 이온, 또는 3 가지 이하의 희토 산화물 이온의 정확하게 조정된 혼합물로 충전된다. 따라서, 착화에 의해 고정되는 1 종류 초과의 이온의 경우, 복수 형광 희토 산화물 키레이트 ("염료 혼합물")가 하나 및 동일한 프로브 분자에 커플링된다. 상기 프로브는 합성이 용이하지 않으며, 균질한 증폭/검출 포맷에 (전적으로) 불량하게 적용된다.

조합적 표지화에 대한 수많은 다른 기술적 접근법이 존재한다. 문헌 [Ballard 등 (US 5,759,781), Speicher 등 (Nat. Genetics 12, 368–375 (1996) 및 Ried 등 (PNAS 89, 1388–1392)는, 소정의 프로브의 모든 카페가 1 개 이상의 식별가능한 플루오로포어(fluorophor)를 조합 방식으로 담지하는 경우, 각각의 특이적 프로브가 이의 표지화 표식에 의해 알려지는 검사 포맷을 개발하였다. 표지화는 낙 번역(nick translation)에 의해 수행되고, 이는 프로브 분자마다 혼입된 표지의 갯수의 관점에서, 화학적 올리고뉴클레오타이드 합성 보다 덜 정확하며, 즉 상기 방법은 그자체만으로는 정확하게 구별가능한 분포를 분석하지 못한다. 따라서, 숙련가는 핵산 증폭 방법에서, 특히 균질한 증폭 방법에서 상기한 프로브를 사용하지 않을 것이다.

Tong 등 (Nat. Biotechnology 19, 756–759 (2001))에 의해 기술된 소위 CFET 프로브는 원리적으로 상이한 고안 및 적용 방식을 갖는다. 1 내지 3 가지의 염료는 프로브 분자마다 5'-말단에 커플링되며, 정확하게 조정된 갯수의 간격자(spacer) 단위가 접재된다(interspersed). 올리고뉴클레오타이드 부분구조는 3'-말단에 대한 마지막 염료 또는 간격자 후에 뒤따라진다. 따라서, Ballard 등에서와 같이 상이한 프로브 유형의 혼합물이 존재한다. 간격자는 또한 전기영동 이동성 및 또한 공명 강도에 대한 조율자(tuner)로서 기능한다. 후자는 특정 프로브의 형광 표식에 영향을 미친다. 프로브는 통상적인 파장에서 여기되고(excited), 기록된 시그널은 모세관 전기영동 사진에서의 위치에 의해, 그리고 특정 위치에서 완전한 방출 스펙트럼의 중첩 및 디지털 비율로서 직접적으로 설정된 표지의 성분으로부터 상대적 기여의 계산에 의해 해석된다. 다시, 보정 및 표준화된 시그널 자체의 시그널 분포 분석이 없고, 동적으로 반응 배향에 따르지 않으며, "동일한 서열/상이한 표지"의 올리고뉴클레오타이드가 고안되지 않으며, 프로브 배치 또는 대략적 구성을 변경하는 생화학적 반응의 결과로서 시그널의 생성이 없다.

결합 파트너 분자마다 하나 초과의 표지를 갖는 결합 파트너의 표지화는 일부 단점을 갖는다. 상기 복수 표지화 결합 파트너는 합성에서 거의 (비용적으로) 요구되지 않으며, 부착된 표지의 검출 또는 분석물의 분석을 위한 결합 파트너의 결합 효율성을 감소시킬 수 있는 표지의 입체 방해가 발생할 수 있다. 또한, 결합 파트너에 부착된 표지 사이의 상호작용이 발생하여 잘못된 결과를 초래할 수 있다. 이는 예를 들어 광학 표지를 사용하는 경우에 관련될 수 있다. 예를 들어 TaqMan 검사 (US 5210015, EP 0543942)에 사용된 형광 에너지 전송 표지를 사용하는 균질한 검출 방법의 수행이 특히 중요하다는 것이 확실하다.

따라서, 본 발명의 목적은 공지된 방법의 단점을 모두 또는 부분적으로 피하는 복수 분석물의 결정 방법을 개선하는 것이다.

## 발명의 상세한 설명

### 본 발명의 개요

본 발명의 주요 측면은, 결정되는 분석물 보다 적은 표지를 사용하는 복수 분석물의 결정 방법에 관한 것이다. 이는, 특정한 염료 각각으로 일부 표적에 특이적인 프로브 분자의 전체적 총체를 표지화하면서, 다른 표적에 대해서는 특이적 프로브의 총체 중 일부를 소정의 염료로 표지화하며, 총체 중 또다른 일부를 상이한 염료(혼합물 중의 동일한 서열/상이한 표지의 올리고뉴클레오타이드)로 표지화하는 것에 의해 성취된다. 바람직하게는, 균질한(용액상) 실시간 증폭 검사를(예를 들어, PCR 또는 TMA에 의해) 수행하고, 모든 종류의 관련된 노이즈에 대해 생성된 시그널을 보정하며, 참조 염료 상에서 상이한 표지로부터의 시그널을 표준화함으로써, 표적이 복수-채널 검출기에서 수집된 처리 시그널의 분포로부터 유추될 수 있다. 이런 목적을 위해, 표지의 조합이 사용된다.

예를 들어, 3 가지의 분석물을 결정하는 경우, 단지 2 가지의 상이한 검출가능한 표지만이 필요하다. 제 1 의 표지는 제 1 의 분석물에 특이적인 제 1 의 결합 파트너에 부착된다. 제 2 의 표지는 제 2 의 분석물에 특이적인 제 2 의 결합 파트너에 부착된다. 제 3 의 분석물에 특이적인 제 3 의 결합 파트너의 표지화를 위해, 제 1 의 결합 파트너 및 제 2 의 결합 파트너에 커플링된 것과 동일한 종류의 표지가 사용된다. 제 3 의 결합 파트너의 일부 양은 제 1 의 표지에 커플링된다. 3 가지의 분석물의 경우에, 바람직하게는 제 3 의 결합 파트너의 절반이 상기한 방식으로 표지화된다. 제 3 의 결합 파트너의 또 다른 부분은 제 2 의 표지에 커플링되고, 이는 3 가지의 분석물의 경우에 바람직하게는 제 3 의 결합 파트너의 나머지 절반일 것이다. 따라서, 상기 분석물에 특이적인 각각의 결합 파트너는 제 1 의 표지 또는 제 2 의 표지를 함유한다. 이는, 단지 하나의 표지만으로 각각 표지화된 결합 파트너 분자를 초래하고, 바람직하게는 생화학 반응으로부터 유도된 시그널 생성에 기초한 복합적 결과를 해석하기 위한 복수 색상 분석을 가능하게 하여, 동적 반응 기록을 위한 수단을 제공하면서, 간단한 프로브 고안 및 검출을 위한 당업계 상황의 수단을 유지한다. 이와 반대로, 프로브는 하나의 프로브 분자에 복수 표지가 결합하는 문헌(Samiotaki, M. 등, Analytical Biochemistry 253, 156-161 (1997))에 기재되어 있다. 상기한 프로브는 본 발명에 따른 결합 파트너와 비교하여 합성하기 더욱 어렵다.

제 3 의 결합 파트너에 부착되는 상이한 표지에 대해 발생할 수 있는 상이한 검출 효율성은, 2 가지 방식으로 보상될 수 있다. 제 1 의 표지를 제 2 의 표지와 비교하여 더욱 높은 시그널 출력을 갖는 경우, 제 1 의 표지에 커플링된 제 3 의 결합 파트너를 제 2 의 표지에 커플링된 제 3 의 결합 파트너와 정의된 1:1 이 아닌 비율로 혼합함으로써(화학적 방식), 또는 표준으로써 선택된 소정의 표지에 대한 시그널 출력의 표준화를 통해(수학적 방식), 상기한 차이를 조정할 수 있다. 이러한 차이 검출 효율성은 흡수성 또는 양자(quantum) 생성과 같은 표지의 본질적인 특성에 기인할 수 있고, 또한 상이한 커플링 효율성 또는 용매 효과에 대한 감수성으로부터 초래될 수 있다. 후자의 경우에, 상이한 양의 제 3 의 결합 파트너의 혼합 후, 커플링 반응은 상기한 차이를 적응시키는 양호한 가능성은 제공한다.

또한, 둘 이상의 검출가능한 표지가 하나의 결합 파트너 분자에 부착되는 경우 발생할 수 있는 가능한 방해를 피할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 결합 파트너는, 전통적인 포르스터(Forster) 유형의 표지(Styer 및 Haugland, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 719 (1967))와 같은 플루오로포어 및 플루오로포어의 조합을 포함하는 표지의 폭넓은 스펙트럼에 적절하며, 예를 들어 저농도 핵산 분석물의 결정을 위한 TaqMan-방법과 같은 균질한 검출 검사에 사용될 수 있다.

또한 증가된 갯수의 분석물이 두 가지의 표지에 대해 보여진 바와 동일한 방식으로 조합할 수 있는 세 가지 이상의 표지를 사용하여 결정될 수 있다는 것이 주지되어야만 한다. 세가지 표지를 사용하는 경우, 7 가지 이하의 분석물이 결정될 수 있다. 4 가지의 상이한 표지를 사용하는 경우, 단일, 2중, 3중 및 4중 조합을 적용한다면, 15 가지 이하의 분석물이 검출될 수 있다. 단일 또는 2 중 조합만을 적용한다면(이는 실제적 관점에서 유용할 수 있다), 10 가지 이하의 분석물이 4 가지 표지의 세트를 이용하여 구별화될 수 있다.

따라서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 3 가지 이상의 분석물의 결정 방법에 관한 것이다:

a) 상기 3 가지 이상의 분석물을 함유하거나 상기 분석물 중 하나 이상을 함유할 것으로 의심되는 샘플과, 3 가지 이상의 상이한 결합 파트너의 혼합물을, 상기 분석물에 대한 상기 결합 파트너의 특이적 결합을 가능하게 하는 조건하에 제공하는 단계에 있어서, 하기를 특징으로 하는 단계:

- 상기 3 가지 이상의 결합 파트너 중 제 1 의 결합 파트너는 상기 3 가지 이상의 분석물 중 제 1 의 분석물에 특이적이고, 제 1 의 표지에 커플링되며,

- 상기 3 가지 이상의 결합 파트너 중 제 2 의 결합 파트너는 상기 3 가지 이상의 분석물 중 제 2 의 분석물에 특이적이며, 제 2 의 표지에 커플링되고, 상기 표지는 상기 제 1 의 결합 파트너에 커플링된 표지로부터 개별적으로 검출가능하며,

- 상기 3 가지 이상의 결합 파트너 중 제 3 의 결합 파트너는 상기 3 가지 이상의 분석물 중 제 3 의 분석물에 특이적이며, 상기 제 3 의 결합 파트너의 제 1 의 양은 상기 제 1 의 결합 파트너에 커플링되는 것과 동일한 표지에 커플링되고, 상기 제 3 의 결합 파트너의 제 2 의 양은 제 2 의 결합 파트너의 것과 동일한 표지에 커플링되며,

상기 제 3 의 결합 파트너의 상기 제 1 의 양은 제 2 의 결합 파트너에 커플링되는 것과 동일한 표지에 커플링되지 않고, 상기 제 3 의 결합 파트너의 상기 제 2 의 양은 제 1 의 결합 파트너에 커플링되는 것과 동일한 표지에 커플링되지 않음;

b) 상기 제 1 및 제 2 의 표지에 대해 나타난 시그널 강도를 검출하는 단계; 및

c) 상기 단계 b)에서 검출되는 상기 시그널 강도를 사용하여 상기 샘플 중에 존재하는 분석물을 결정하는 단계.

바람직한 분석물은 서열 특이적 프로브를 사용하여 결정될 수 있는 핵산 분석물이다. 상기 핵산 분석물은 또한 당업계에 공지된 각종 핵산 증폭 방법, 예를 들어 LCR (USP 5,185,243, 5,679,524 및 5,573,907; EP 0 320 308 B1; WO 90/01069; WO 89/12696; 및 WO 89/09835), 사이클링 프로브 기술 (USP 5,011,769, 5,403,711, 5,660,988 및 4,876,187, 및 PCT 출원 공개 WO 95/05480, WO 95/1416 및 WO 95/00667), 침투제 TM 기술 (USP 5,846,717; 5,614,402; 5,719,028; 5,541,311; 및 5,843,669), Q-베타 레플리카아제 기술 (USP 4,786,600), NASBA (USP 5,409,818; EP-0 329 822), TMA (USP 5,399,491, 5,888,779, 5,705,365, 5,710,029), SDA (USP 5,455,166 및 5,130,238) 및 PCR (US-A-4,683,202) 중 하나를 사용하여 (PCR 방법이 가장 바람직하다) 증폭된 핵산일 수 있다.

본 발명은 또한 하기를 포함하는 물질의 조성물, 및 샘플 중 3 가지 이상의 분석물의 결정을 위한 이의 용도에 관한 것이다:

- 제 1 의 표지에 커플링된, 제 1 의 분석물에 특이적인 제 1 의 결합 파트너,

- 제 2 의 표지에 커플링된, 제 2 의 분석물에 특이적인 제 2 의 결합 파트너로서, 상기 표지가 상기 제 1 의 결합 파트너에 커플링되는 표지로부터 개별적으로 검출가능한 제 2 의 결합 파트너,

- 제 3 의 분석물에 특이적인 제 3 의 결합 파트너로서, 상기 제 3 의 결합 파트너의 제 1 의 양은 제 1 의 결합 파트너에 커플링되는 것과 동일한 표지에 커플링되며, 상기 제 3 의 결합 파트너의 제 2 의 양은 상기 제 2 의 결합 파트너의 것과 동일한 표지에 커플링되고, 상기 제 3 의 결합 파트너의 상기 제 1 의 양은 상기 제 2 의 결합 파트너에 커플링되는 것과 동일한 표지에 커플링되지 않으며, 상기 제 3 의 결합 파트너의 상기 제 2 의 양은 상기 제 1 의 결합 파트너의 것과 동일한 표지에 커플링되지 않는 제 3 의 결합 파트너.

또한, 본 발명은 3 가지 이상의 분석물의 결정을 위한 키트에 관한 것이다.

### 도면의 간단한 설명

도 1 은 기술된 결정 방법을 사용하여 자동화 복수 분석물 결정 검사를 위한 가능한 데이터 처리 도식을 나타낸다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명에 따른 분석물은 당업계에 공지된 결합 검사에 의해 결정될 수 있는 분석물이다. 바람직하게는, 이들은 의학적 진단 또는 기타 생물학적 분석용 샘플 성분, 즉 특히 항원, 항체, 세포 또는 핵산과 같은 체내 성분의 함유물이다. 상기 검사는, 예를 들어 박테리아, 예컨대 클라미디아, 네이세리아 및 마이코박테리아와 같은 감염원, 및 HBV, HCV 및 HIV 와 같은 바이러스의 결정을 위해 사용될 수 있다. 검사 목적에 따라, 샘플 중에 존재하는 분석물의 양 뿐만 아니라, 분석물의 배치를 결정할 수 있고, 예를 들어 핵산 분석물은 이의 대립유전자 형태 또는 환자가 돌연변이 형태를 갖고 있는지의 여부에 대해 분석할 수 있다.

본 발명에 따른 샘플은 측정될 분석물을 함유한다. 의학적 진단과 관련하여, 인간 또는 동물로부터 유래한 샘플이 바람직 하며, 예를 들어 전체 혈액, 조직 단편, 뇨, 객담, 혈청, 혈장, 버피코트 (buffy coat) 및 도말(smear)이 사용될 수 있다. 분석물 및 샘플에 따라, 분석물의 결정을 가능하도록 하기 위해서 샘플을 사전 처리할 필요가 있을 수 있으며, 예를 들어 대부분의 샘플 핵산의 경우 제 1 단계로 추출할 필요가 있다. 이러한 사전 처리된 샘플도 또한 본 발명에 따른 샘플이다.

본 발명에 따르면, 세 가지 이상의 분석물이 결정된다. 이는, 예를 들어 바이러스 HIV, HBV 및 HCV 와 같은 환자에게서의 감염원의 패턴일 수 있고, 이는 혈액 은행에서 각각의 혈액 샘플에 대해 검사되어져야만 한다. 또 다른 예는 몇몇 좌위 및 뚜렷한 대립유전자 형태로 이루어진 조직적합성 좌위 항원 패턴의 결정일 수 있다.

분석물은 특이적 결합 파트너에 의해 결합된다. 분석물에 따라, 특이적 결합 파트너를 선택할 수 있다. 항원 특성을 갖는 분석물은 특이적 항체를 사용하여 결합될 수 있다. 샘플 중의 항체는 결합 파트너로서 특이적 항원을 사용하여 결정될 수 있다. 핵산 분석물이 결정되어야 한다면, 특이적 프로브로서 분석물에 상보적인 핵산 서열을 사용할 수 있다. 또한, 특이적 결합쌍, 예컨대 기질-효소 또는 당-렉틴이 당업계에 알려져 있고, 기술된 방법에 또한 유용할 수 있다.

핵산 분석물은 통상적으로 본래의 샘플을 각종 방법 중 하나로 처리하여 이용가능한 형태로 유도된다. 이는, 예를 들어 pH의 변화 (알칼리성으로), 가열, 온도의 순환적 변화 (냉동/해빙), 생리학적 성장 조건의 변화, 세정제의 사용, 샤오토로픽 염 (chaotropic salt) 또는 효소 (예를 들어, 프로테아제 또는 리파아제) 단독 또는 조합을 포함한다. 예를 들어, 특이적 조건 하에서 핵산과 결합할 수 있는 자기장 유리 입자를 사용할 수 있다. 적합한 입자 및 프로토콜은 WO 96/41811 및 WO 01/37291 에 기술되어 있다.

특이적 결합 복합체가 형성되지만 증가된 배경 시그널을 유도하는 비관련 반응 및 샘플 성분에 대한 결합 파트너의 결합을 최소화하도록 하는, 결합 파트너의 분석물에 대한 특이적 결합을 촉진할 수 있는 반응 조건을 선택하는 것이 중요하다. 상기 반응 조건 및 적합한 프로토콜은 당업계에 공지되어 있다.

소위 프로브로도 또한 불리우는, 핵산 분석물 또는 증폭된 핵산 분석물의 결정을 위한 특이적 핵산 결합 파트너는 바람직하게는 올리고뉴클레오타이드이지만, 천연 포스페이트-당 골격 대신에 예를 들어 펩티드-골격을 갖는 유사체 (PNA, WO 92/20702)를 또한 사용할 수 있다. 분석물에 대한 프로브의 특이적 결합을 가능하도록 하기 위해서, 프로브는 바람직하게는 10 뉴클레오타이드 이상의 길이, 더욱 바람직하게는 10 내지 40 뉴클레오타이드의 길이를 갖는다. 또한, 프로브는 분석물 서열에 충분히 상보성일 것이 또한 요구된다. 따라서, 프로브는 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상이 상보성이다. 가장 바람직하게는, 프로브는 분석물에 대해 전체적으로 상보성이다. 상보성 및 상동성의 정확한 결정은, FastA 와 같은 컴퓨터 프로그램을 사용함으로써 결정될 수 있다 (Pearson 및 Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 85, pp. 2444-2448 (88)).

핵산 분석물의 개시 농도에 따라, 결정이 가능도록 하기 위해서, 분석물을 증폭할 필요가 있을 수 있다. 이런 목적을 위해, 각종 증폭 방법이 당업계에 공지되어 있다 (상기에서 언급됨). 특히 프라이머에 기초한 증폭 방법을 사용하는 경우, 핵산 분석물의 특이적 증폭이 가능하다. 프로브 결합 검사에 병용하여, 검사의 증가된 특이성을 성취할 수 있다. 또한, 분석물의 검출을 가능토록 하기 위해서 표지화된 프라이머를 사용하는 LCR 과 같은 방법이 당업계에 공지되어 있다.

본 발명에 따른 프라이머는, 핵산 주형에 하이브리드형성시키는 경우, 바람직하게는 효소에 의해, 더욱 바람직하게는 예를 들어 원핵 세포 기원의 폴리머라아제에 의해 확장 또는 변형될 수 있는 분자이다. PCR 방법론을 사용하는 경우, T. 아쿠아티쿠스 또는 T. 씨모필루스 DNA-폴리머라아제와 같은 열안정성 폴리머라아제가 바람직하다. 이는 모노데옥시리보뉴클레오사이드트리포스페이트 유래의 모노뉴클레오타이드 단위를 상기 프라이머의 3'-OH-말단에 첨가함으로써 프라이머를 확장시킨다. 프라이머의 전체 길이 및 염기 서열은 증폭 반응의 요구되는 특이성에 의해 결정된다. PCR 을 수행하기 위한 바람직한 프라이머 길이는 10 내지 40, 가장 바람직하게는 15 내지 30 염기 함유 서브유닛으로, 상기 서브 유닛은 모노뉴클레오타이드 및/또는 핵산 유사체 단량체로부터 선택된다. 일반적으로, 상기 길이를 갖는 프라이머는 기타 증폭 방법에 또한 유용하다. 하나 초과의 프라이머가 증폭에 사용되는 경우, 예를 들어 PCR 을 사용하거나 하나의 반응으로 복수 표적 핵산을 증폭하는 경우, 바람직하게는 서로 하이브리드를 형성할 수 없는 프라이머가 사용되며, 이는 이들이 5 개 초과의 연속되는 상보 염기의 임의의 신장체를 함유할 수 없기 때문이다.

표지는 일반적으로 분석물의 존재에 대한 결정을 위해 검출가능하거나 검출가능하게 될 수 있는 그룹으로써 당업자에게 공지되어 있다. 자명하게 공지된 표지에는, 형광 표지 (예컨대 플루오레신(fluoresceine) 및 랜타니드(lanthanide) 칠레이트), 전기화학발광 표지 (예컨대, 루테늄 복합체), 또는 또 다른 분자적 존재물에 의해 인식될 수 있는 부분 구조 (예컨대, 헵텐에 의해 야기된 항체에 의해 인식될 수 있는 헵텐), 또는 고정될 수 있는 부분구조 (예컨대, 스트렙타비딘 코팅된 고체상,

예컨대 비드(bead) 또는 튜브에 결합될 수 있는 바이오틴)이 있다. 특히 균질한 포멧과 관련하여 가장 바람직한 표지는 크로모포어(chromophore)이다. 상기 크로모포어는 단독 또는 또 다른 크로모포어와 조합하여, 또는 예를 들어 비(非)형광 켄쳐(quencher)와 함께 사용될 수 있다.

특히 핵산 분석물의 결정을 위해 균질한 검출 포멧이 사용되는 경우, 각종 포멧이 당업계에 공지되어 있다. TaqMan 검사와 같은 방법 (USP 5,210,015 및 5,487,972) 및 키싱(kissing) 프로브-검사와 같은 방법은 형광 염료의 형광 에너지 전송에 기초한다 (FET, Styer 및 Haughland, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 98, pp. 719-(67)). 서로 밀접한 접근에서 발생하는 경우, 제 1 의 플루오로포어는 제 2 의 플루오로포어 또는 비형광 켄쳐와 상호작용할 수 있다. 예를 들어, 제 1 의 형광 염료의 전자기장 방출 또는 진동 여기(excitation)는 제 2 의 형광 염료 중의 공명을 유도할 수 있다. 사용되는 포멧에 따라, 분석물의 존재에 대한 수단으로써, 예를 들어 제 1 의 형광 염료의 감소된 광방출 또는 제 2 의 형광 염료의 증가된 광방출을 검출할 수 있다. 이런 목적에 사용될 수 있는 형광 염료의 조합은, 당업계에 공지되어 있다. 예에는, 포르스터 유형의 공명 에너지 전송에 적합한 전통적인 염료, 예컨대 6-카르복시플루오레신 (6-FAM) 과 조합된 펜타메틴-인도디카르보시아닌 (Cy5)이 있다.

본원의 문맥에서 표지는, 본 발명의 방법에서 실제로 검출되는 시그널 생성 존재물을 의미한다. 기술된 균질한 포멧과 관련하여, 플루오로크롬의 쌍이 사용되고, 이는 서로 공명하게 되고, 단일 검출 시그널로서 이들 방법에서 검출된다. 비록 두 개의 별개 문자, 예를 들어 두 개의 플루오로크롬이 포함될지라도, 이들은 하나의 표지로서 기능한다. 또한, 용어 "표지"는 별개 표지의 하나 초과의 표지 문자가 결합 파트너 문자에 커플링된다는 것을 의미할 수 있음이 이해되어야만 한다.

사용된 표지에 따라, 상이한 검출기가 표지의 시그널을 측정하기 위해 사용되어야만 한다. 무엇보다도, 특히 형광측정계가 이런 목적을 위해 폭넓게 사용된다. 형광 표지화는 균질성 PCR 과 연계되면 가장 바람직한데, 이는 효소적 또는 화학발광 표지화 기술과 반대로 화학적 유도 시약을 시그널 생성을 위해 첨가할 필요가 없기 때문이다. 이는, 닫힌 튜브 절차에 대해, 가장 효율적인 방식으로 증폭된 물질에의 교차 오염을 피할 수 있도록 한다. 복수 표지 시그널을 결정하는 경우, 시그널은 서로 구분가능한 것이 중요한다. 이러한 교차 작용을 피하기 위해서, 광학 표지를 사용하는 경우, 각각의 표지가 상이한 방출 및/또는 흡광 스펙트럼을 갖는 것이 바람직하다. 그러나, 대부분의 시판되는 표지를 복수 분석물의 검출 검사에 사용하는 경우, 일부 이상의 교차 작용은 피할 수 없다. 단지 몇몇 분석물만을 결정하는 경우, 이런 교차 작용은 측정된 시그널을 컴퓨터 프로그램으로 처리하거나, 필터에 기초한 형광측정계 대신에 더욱 값싼 스펙트럼 형광측정계를 사용함으로써 보상될 수 있다. 균질성 포멧에 관하여, 특히 형광 에너지 전송에 기초한 방법을 사용하는 경우, 추가적인 크로모포어에 대한 요구는 심지어는 간접 가능성을 증가시킨다. 따라서, 실제로서, 복수 검사에서 함께 사용될 수 있는 적합한 표지의 갯수는 한정된다.

본 발명에 따르면, 사용되는 하나 이상의 결합 파트너는 검출가능한 표지의 조합으로 커플링되어 이들 결합 파트너 문자의 각각은 단지 하나의 검출가능한 표지에 커플링된다. 반대로, Samiotaki 등에 의해 기술된 프로브 (상기에서 언급됨)는 복수 표지로 표지화된다 (예컨대, 올리고뉴클레오타이드 마다 10-20 개의 커플링된 5'-말단). 동일한 프로브 문자에 커플링된 검출가능한 표지의 접근성으로 인해, 표지 사이의 간접의 위험이 매우 높고, 표지, 특히 형광 염료의 모든 유형이 사용될 수 있는 것은 아니다.

본 발명에 따른 방법은 복수 분석물 검사에서 증가된 갯수의 분석물의 결정에 사용될 수 있고, 폭넓은 범위의 표지에 적합하다.

다중 검사에 필요한 표지의 갯수를 감소시킴으로서, 색다른 표지에 대한 요구를 피하고, 또한 보다 값싼 검출기, 예컨대 필터에 기초한 형광측정계가 훨씬 더 비싼 스펙트럼 형광측정계 대신에 사용될 수 있다. 또한, 이는 균질성 포멧에 대해, 한정된 감염 위험 및 더욱 적은 취급 단계의 측면에서, 상업적 진단 검사에 관한 현저하게 중요성을 갖도록 할 수 있다.

상기 나타낸 바와 같이, 상이한 조합으로 세 가지의 조합 표지가 7 가지 이하의 상이한 특이적 결합 파트너에 커플링되어, 6 가지의 상이한 분석물의 식별가능한 결정을 가능하게 한다. 이는 하기 표에서 가시화된다. P 는 '변수 = 분석물' 인 것을 나타내고, 채널은 특정 검출가능한 표지의 시그널을 포획하기 위해 최적화된 검출기의 부분으로서 광학적 영역에 대응한다. 이 표는 모든 세 가지의 채널에 걸쳐 시그널의 예상되는 백분율 분포를 나타내고, 화학적으로 또는 수학적으로 표준화된다. 하기의 경우가 고려된다: 분석물 P1 내지 P7 의 것은 단지 한번에 하나만 샘플 중에 존재한다. 상이한 결합 파트너의 표지화는 하기와 같다: 유형 P1 - 표지 1 (채널 1 중의 시그널); P2 - 표지 2 (채널 2 중의 시그널); P3 - 표지 3 (채널 3 중의 시그널); P4 - 절반의 양이 표지 1, 절반의 양이 표지 2; P5 - 절반의 양이 표지 1, 절반의 양이 표지 3; P6 - 절반의 양이 표지 2, 절반의 양이 표지 3; 및 P7 - 1/3 의 양이 표지 1, 1/3 의 양이 표지 2, 1/3 의 양이 표지 3.

변수	채널
----	----

	1	2	3
P1	100		
P2		100	
P3			100
P4	50	50	
P5	50		50
P6		50	50
P7	33	33	33

시그널이 하나의 채널에서만 측정될 수 있다면, 변수 1, 2 또는 3 의 분석물 중 하나의 존재에 대한 명확한 증거를 나타낸다 (표 참조). 시그널이 50:50 의 비율로 두 개의 채널에서 존재한다면, 상기 표에서 나타낸 변수 4, 5 또는 6 의 분석물에 대한 강력한 증거를 나타낸다. 33:33:33 의 시그널 비율은 P7 분석물이 샘플 중에 존재한다는 것을 나타낼 것이다. 그러나, 이는 이상적인 상황을 반영한다. 실제 시그널은 벗어날 수 있으며, 종종 예를 들어 표지, 배경 시그널 및 교차 작용 시그널의 상이한 검출 효율성을 보상하기 위해서 표준화시킬 필요가 있다.

배경 파트너에 커플링되는 상이한 표지는 결합 파트너의 결합 효율성을 변화시키지 말아야 하며, 이는 또한 제 1 의 표지에 결합되는 결합 파트너 : 제 2 의 표지에 결합되는 결합 파트너의 비율을 변화시킴으로써 조정가능할 수 있다. 또한, 상이한 검출 효율성이 이런 방식으로 조정될 수 있다.

50:50 의 시그널 비율은 두 가지의 분석물이 존재하는 경우에 또한 발생할 수 있다. 그러나, 이의 발생은 2 개의 채널로의 50:50 시그널 분포를 생성하는 출발 분자의 갯수의 측면에서 1:1 의 공감염 및 동일한 추출/증폭/검출 효율성; 또는 역가의 차이를 정확하게 역으로 균형을 맞추어서 50:50 의 분포를 생성하는, 상이한 갯수의 출발 물질과 연계된 추출/증폭/검출 효율성에 의존하기 때문에, 그러한 경우는 극도로 드물다. 따라서, 각각 단일 표지화된 프로브에 의해 나타낸 2 가지 변수, 즉 P1 및 P2 의 공감염은,  $>> 50 : << 50 : 0$  또는  $<< 50 : >> 50 : 0$  의 불균등한 분포를 초래해야만 하고, 또한 예를 들어 50:50:0 의 균등한 분포로 나타내어지는 P4 로부터 구별가능해야만 한다. 그러나, 상기 결과는 또한 예를 들어 P4 및 P1 에 대한 두 개의 감염원으로 공감염된 샘플로부터 유래될 수도 있다.

모호한 결과 및 측정된 시그널의 해석에 있어서의 가능한 애리에 대한 위험을 추가로 감소시키기 위해서, 실시예 1 에서 설명한 바와 같이, 둘 이상의 채널에서 발생하는 시그널을 샘플 중의 하나의 가능한 분석물 분포에 명확하게 지정할 수 있는 방식으로 상기 변수를 배열하는 것이 가능하다. 또한, 샘플 중에 존재할 수 있는 잔존하는 가능한 분석물 분포에 대해 특별하게 시험하는 추가의 검사를 수행할 수 있다. 제 1 의 수행에서 대부분의 샘플 중의 별개의 분석물 분포를 결정할 수 있는 반면, 모호한 샘플은 예를 들어 분석물의 갯수를 감소시킨 복수 분석물 검사 (이를 위해서는 모호하지 않은 하나의 표지-하나의 결합 파트너의 조합이 가능해야만 한다)를 사용하는 제 2 의 수행에서 재평가될 수 있기 때문에, 이러한 순차적 방법은 매우 경제적이다. 또한, 핵산 분석물 및 증폭된 핵산 분석물에 관하여, 예를 들어 분석물-프로브 하이브리드형성 복합체 또는 증폭된 핵산의 용융 곡선을 결정할 수 있고, 이는 상이한 분석물을 구별하여, 모호하지 않는 결과를 초래할 수 있다.

또한, 3 가지 이상의 분석물의 결정을 위한 키트는 본 발명의 주제이다. 이러한 키트는 하나 이상의 용기 중에 하기를 함유한다:

- 제 1 의 표지에 커플링된, 제 1 의 분석물에 특이적인 제 1 의 결합 파트너,
- 제 2 의 표지에 커플링된, 제 2 의 분석물에 특이적인 제 2 의 결합 파트너로서, 상기 표지가 상기 제 1 의 결합 파트너에 커플링되는 표지로부터 개별적으로 검출가능한 제 2 의 결합 파트너,
- 제 3 의 분석물에 특이적인 제 3 의 결합 파트너로서, 상기 제 3 의 결합 파트너의 제 1 의 양은 제 1 의 결합 파트너에 커플링되는 것과 동일한 표지에 커플링되며, 상기 제 3 의 결합 파트너의 제 2 의 양은 상기 제 2 의 결합 파트너의 것과 동일한 표지에 커플링되고, 상기 제 3 의 결합 파트너의 상기 제 1 의 양은 상기 제 2 의 결합 파트너에 커플링되는 것과 동일한 표지에 커플링되지 않으며, 상기 제 3 의 결합 파트너의 상기 제 2 의 양은 상기 제 1 의 결합 파트너의 것과 동일한 표지에 커플링되지 않는 제 3 의 결합 파트너.

또한, 상기한 키트는 결합 파트너의 이들 분석물에 대한 특이적 결합을 위한 수단을 또한 함유할 수 있으며, 이는 완충액, 블록킹 시약 및 당업계에 공지된 기타 반응 성분을 포함할 수 있다. 핵산 분석물의 결정을 위한 키트는 또한 상기 기술된 핵산 증폭 방법을 위한 반응 성분을 함유할 수 있다. 또한, PCR 반응 키트는 예를 들어 폴리머라아제, 완충액, 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및/또는 프라이머를 함유할 수 있다.

본 발명을 하기 실시예에 의해 예시한다.

### 실시예

#### 실시예 1

본 발명에 따른 복수-색상 분석은, "전통적" 플루오로크롬 화합물 및 "전통적" 공명 에너지 전송 원리에 기반을 둔 Roche Cobas Taqman 증폭/검출 기술 및 5'-뉴클레오타이드 검사 기술 (EP 0543942 및 US 5210015)을 사용하여 수행할 수 있다. Roche Cobas Taqman 장치는 4 개 이하의 필터 쌍이 장착되어 있다 (EP 0953379, EP 0953837, US 6134000 및 US 6084669 를 또한 참조). 추정 표식자(indicator) 세트는 4 개의 리포터, 및 바람직하게는 1 또는 2 개의 임의의 비형광 켄쳐로 이루어질 수 있다. Cobas Taqman 검출기에 의해 설정된 스펙트럼 범위, 즉 약 420 nm 내지 약 710 nm 에 놓여지는 후보 화합물을 하기를 포함할 수 있다:

- 적색의 폭넓은 벤드의 흡수 영역을 갖는 켄쳐 (Q) 염료로서, 예컨대 폴리메틴-시아닌 염료 (예컨대,  $n = 5$ , 즉 메소머성 (mesomeric) 구조로 기반된 4 개의 콘쥬게이트된 올레핀성 존재물), 또는 콘쥬게이트된 메소머성  $\pi-e^{(-)}$ -시스템에 참여하는 불포화 N-헵테로시클릭 부분구조에 대칭적으로 측면부가 접합되는 로다민 유도체 (둘다 비형광 니트로페닐 유도체로서 바람직하다),

- 쿠마린 염료와 같은 리포터 (R) 염료 형광 분자로서, 플루오레신 유형의 염료 (예컨대 FAM 또는 염소화 유도체), 로다민 유형의 염료, 옥사진 또는 보디피 (bodipy) 유형의 화합물. 이들 중 셋은 표적 변수에 부여되고, 나머지 하나는 IC 모니터링을 위한 것일 수 있다.

후보 염료에 관련된 일반적인 요구사항은 다음을 포함한다: 저장 용액 중에서, 그리고 또한 주혼합물(matermix) 시약 중의 함유물로서의 사용 수준에서 우수한 화학적 안정성; 합성, 정제 및 키트 제조 동안에 주변 빛에 노출시의 안정성; PCR에서 다수의 가열/냉각 사이클 (예컨대,  $n = 60$ )에 노출시의 안정성; 대응하는 RQ 공명 쌍 사이의 충분한 스펙트럼 중첩 및 효율적인 에너지 전송; 높은 흡광 계수 (즉, 흡광도); 및 특히 리포터의 경우, 수용액 중에서, 그리고 Taqman-PCR에 사용되는 pH 범위 (예컨대, pH 7-8.5)에서, 높은 양자 수율.

이런 새로운 개념은, 특정 염료의 고정된 지정을 갖는 것 대신에 Cobas Taqman의 대응하는 3 개의 광학 채널 (이는 특정 검사 변수 및 대응하는 채널을 나타낸다)을 교차하는, 3 개의 리포터 염료 및 이의 이중 조합의 교차작용 및 배경 보정된 표준화 시그널의 분포 측정을 가능하게 한다. 이의 원리는, 최대한의 복잡성을 고려하는 경우, 6 개의 변수를 갖는 다중 검사에 의해 수득되는 포지티브 결과의 완전한 분석 (리포터 R1, R2, R3, R1+R2, R1+R3, R2+R3 을 통해)을 제공한다.

이론적으로, 단일 표지를 사용하는 경우, 각각의 처리된 시그널의 100% 가 소정의 채널에서 발견되고; 이중 표지를 사용하는 경우, 처리된 시그널은 2 개의 대응하는 채널에 균일하게 분포될 것이다 ( $50\% + 50\%$ ).

포지티브/네거티브 집단 (수여부)의 분별은, 시간 경과에 따른 시그널 곡선의 기울기 프로필을 의미하는, 역치 사이클의 결정을 위한 최적화된 알고리즘 (ct 값, 즉 형광 시그널 강도가 배경 수준을 초과하여 현저하게 상승된 반응 배향 상의 지점)에 기반하여 수행될 수 있다.

감염 종류 (검출가능한 산물을 생성하는 검사 파라미터, 즉 병원체의 종류)의 해석은 시그널/시간 곡선 (AUC) 하의 총 면적에 대한, 또는 표준화된 전체 플레토 시그널 강도에 대한 채널 특이적 기여의 분석을 통해 수행될 수 있다. 그러나, 이와 같은 기준에 대한 확실한 분량-반응적 상관관계는 없다 (혈액 스크리닝에는 정량 검사가 의무적으로 필요하지는 않다).

적합한 6 개의 변수 ( $P_1$  내지  $P_6$ )의 다중 검사는 하기의 프로브를 포함할 수 있다 ( $Q =$ 肯쳐,  $R =$ 리포터 및  $N_i = 4$  가지 뉴클레오타이드 중 하나):

변수 1 - 프로브 = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>g</sub>-R1-(N<sub>i</sub>)<sub>h</sub>-3'-PO<sub>4</sub> + 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>g</sub>-R2-(N<sub>i</sub>)<sub>h</sub>-3'-PO<sub>4</sub>

(각각 5 pmol/100 μl 반응 혼합물)

변수 2 - 프로브 = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>a</sub>-R1-(N<sub>i</sub>)<sub>b</sub>-3'-PO<sub>4</sub>

(10 pmol/100 μl 반응 혼합물)

변수 3 - 프로브 = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>c</sub>-R2-(N<sub>i</sub>)<sub>d</sub>-3'-PO<sub>4</sub>

(10 pmol/100 μl 반응 혼합물)

변수 4 - 프로브 = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>e</sub>-R3-(N<sub>i</sub>)<sub>f</sub>-3'-PO<sub>4</sub>

(10 pmol/100 μl 반응 혼합물)

변수 5 - 프로브 = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>k</sub>-R1-(N<sub>i</sub>)<sub>l</sub>-3'-PO<sub>4</sub> + 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>k</sub>-R3-(N<sub>i</sub>)<sub>l</sub>-3'-PO<sub>4</sub>

(각각 5 pmol/100 μl 반응 혼합물)

변수 6 - 프로브 = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>n</sub>-R2-(N<sub>i</sub>)<sub>m</sub>-3'-PO<sub>4</sub> + 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>n</sub>-R3-(N<sub>i</sub>)<sub>m</sub>-3'-PO<sub>4</sub>

(각각 5 pmol/100 μl 반응 혼합물)

다시 말해서, 2 - 4 의 경우, 균질하게 표지된 프로브의 약  $1 \times 6^{12}$  분자 (동일한 올리고뉴클레오타이드/동일한 리포터)가 변수마다 PCR 로 도입될 수 있고; 1, 5 및 6 의 경우, 다시 표지된 포로브의 약  $1 \times 6^{12}$  분자가 변수마다 PCR 로 도입될 것이고, 약  $1/2 \times 6^{12}$  분자는 한 종류의 tag 를 갖고, 약  $1/2 \times 6^{12}$  분자는 다른 종류의 tag 를 갖고며 (동일한 올리고뉴클레오타이드/상이한 리포터), 이는 통계적으로 균형맞춰 소비될 것이다.

모든 경우, 10 pmol 의 변수 특이적 프로브가 이용가능하다.

모호한 결과의 위험에 관하여, 단일 표지와 단지 이중 조합만을 사용하는 것에 초점을 맞추면, 각각 단일 표지화된 프로브에 의해 나타내어지는 2 개의 변수로 공감염된 경우, 예를 들어 P2 ⇌ R1 + P4 ⇌ R3 의 경우에 있어서의 모호한 결과는, 아마도 극히 드물 것이라는 것을 주장할 수 있다. 2 개의 채널로의 50:50 의 분포를 생성하는, 출발 분자의 갯수 면에서 1:1 의 공감염 및 동일한 추출/증폭/검출 효율성의 가능성; 또는 역가의 차이를 정확하게 역으로 균형을 맞추어서 다시 50:50 의 분포를 생성하는, 상이한 갯수의 출발 물질과 연계된 추출/증폭/검출 효율성의 가능성은, 무시할 정도로 거의 고려되지 않는다. 따라서, >(>) 50 : <(<) 50 : 0 또는 <(<) 50 : >(>) 50 : 0 의 불균일한 분포가 초래되며 (케이스 I), 또한 이는 50:0:50 의 균일한 분포에 의해 나타내어지는 P5 ⇌ R1R3 로부터 구별될 수 있다. 2중 표지 프로브의 1:1 혼합물에 의해 나타내어지는 2 개의 변수에 의한 공감염, 예컨대 P1 ⇌ R1R2 및 P5 ⇌ R1R3 는 3 개의 채널로의 시그널 분포로 인해 항상 명백해야만 한다 (예컨대, 약 50 : 25: 25, 공통적인 추출/증폭/검출 효율성을 가정).

2 개의 변수에 의한 공감염 (하나는 1 개의 리포터에 의해 나타내어지고, 다른 하나는 2 개의 리포터에 의해 나타내어짐) 은, 공통적인 추출/증폭/검출 효율성을 다시 가정하면, 3 개의 채널로의 시그널 분포에 의해 인식되어져서, 약 33 : 33 : 33 (케이스 III, 예컨대 R1R2 + R3) 또는 약 75 : 약 25 : 0 패턴 (케이스 IV, 예컨대 R1R2 + R1)이 생성될 수 있다. 케이스 II 및 III 의 경우에, 공통적인 특징은 본질적으로 "제로 시그널"로서 표적에 관련된 광학 채널이 존재하지 않을 것이다. 다시 말해서, "진정한 제로" 와 구별하기 위한 "제로 + x" 역치가 중요할 것이다. 케이스 IV 의 경우에, 아마도 가장 중요할 것이며, 해석은 검사의 전체적인 효율성에 의존하고, 이는 생성된 분포가 실질적으로 50:50 의 상황과 상이한지, 그렇지 않은지의 여부를 결정한다. 아마도 대개는, 부가적인 수학적 기준이 모호성, 특히 후자의 경우를 해석하기 위해서 고려되어야만 한다. 이롭게는, 실시간 Taqman-PCR 은 이러한 "헬퍼 알고리즘"을 제공한다. 이런 주제는 좀더 상세하게 하기에서 언급한다.

극도록 낮게 발견되고, 덜 효율적으로 증폭되는 변수에 단일 표지 프로브를 지정함으로써, 모호성의 드문 발생, 즉 공감염으로부터 발생하는 50 : 50 시그널-분포의 결과를 추가로 최소화할 수 있고, 이는 배치적(geographical) 분포를 고려함으로써 보충될 수 있다.

HIV-1-M, HIV-1-O, HIV-2, HCV, HBV 및 HAV의 결정을 위한 리포터 ( $R = \text{표지}$ )의 추정 지정 및 검사는 하기와 같을 수 있다:

#### 증폭 및 검출 효율성

$P_1 \Leftrightarrow \text{HIV-1-M} \Leftrightarrow R_1/R_2$  높음

$P_2 \Leftrightarrow \text{HIV-1-O} \Leftrightarrow R_1$  낮음

$P_3 \Leftrightarrow \text{HIV-2} \Leftrightarrow R_2$  낮음

$P_4 \Leftrightarrow \text{HCV} \Leftrightarrow R_3$  높음

$P_5 \Leftrightarrow \text{HBV} \Leftrightarrow R_1/R_3$  낮음

$P_6 \Leftrightarrow \text{HAV} \Leftrightarrow R_2/R_3$  중간

$\text{IC} (\text{내부 대조군}) \Leftrightarrow R_4$ .

안정성 이유로, 상업적 검사와 관련하여, 예를 들어 제 4 의 표지 ( $R_4$ )에 커플링된 프로브에 의해 검출될 수 있는 내부 대조군을 또한 첨가할 수 있다.

여기에서, HIV-1-O 및 HIV 의 공감염은 매우 다를 수 있으며, 둘 다 매우 드물고, 배치적으로 또한 분리되어 있고 (그러나, 수년에 걸쳐 변화할 수 있음), 전체적인 결과는 이러한 비예측적인 결과의 경우에서도 "HIV 양성"일 수 있다.

반면, HIV-1-O 및 HCV 의 공감염 또는 HIV-2 및 HCV 의 공감염은, 현행 증폭 효율성 (HIV-1-O 및 HIV-2 의 경우 낮음)을 나타내고, HBV 또는 HAV 각각의 단일 감염에 대해 판단 오류를 갖지 않는다면, 50 : 0 : 50 또는 0 : 50 : 50 의 균일한 분포를 초래할 수 없다. 따라서, 예를 들어 Roche Cobas Taqman 장치 중에서 사용되는, 개별적으로 검출되는 내부 표준을 포함하는 6 개의 변수 검사를 수행하기 위하여, 표준 4 개 채널 형광측정계를 사용하는 것이 가능하다.

따라서, 검사 변수 면에서, 6 개의 변수의 다중 검사의 완전한 해석을 위한 이런 개념은, 본 발명의 화학계 및 장치 플랫폼과 비교하여 보통의 추가적인 노력을 필요로 할 수 있다. 또한, 더욱 정교한 분석용 소프트웨어의 관점에서의 요구사항은, 하기에 나타낸 고려사항에서 보는 바와 같이, 상당히 요구되는 것은 아니다. 더욱 상세하게는, 이는 하기를 포함할 것이다:

- 3 개의 프로브에 대한 이중 논리 흐름(tracking) (동일 올리고뉴클레오타이드, 상이한 형광 tag)
- 단일 tag 프로브로부터의 개별 리포터에 대한 시그널 출력 및 표준화 인자의 정교성을 확립하기 위한 표준화된 절차 (각각의 올리고뉴클레오타이드 중의 서열 환경, 예를 들어 Em ( $R/Q$ ) 비율에 의해 나타내어지는 정제 정도, 과장 의존적 에너지 함량 및 CTM ASICS 의 스펙트럼 민감도 유래의 효과를 고려함)
- 100% 함량으로써 제공하기 위한 가장 신뢰할만한 출력 기준 또는 기준 세트의 정교성, 분포 패턴의 가변성에 대한 결정, 및 예측값의 수용 범위 경계의 세팅.
- 보정된 표준화 시그널의 3 개의 표적 채널로의 분포를 분석하기 위한, 상술한 모든 변수를 혼입시킨 소프트웨어 알고리즘의 개발.

#### 실시예 2

Roche Cobas TaqMan™ 장치와 같은 자동화 검사 장치에 대한 검사 프로토콜에 관하여, 적합한 처리 도식은 하기와 같다 (도 1 참조).

소정의 새로운 시약의 이용성, 보정할 주요 데이터, 및 자동화 검사의 데이터 처리 도식은 하기와 같을 수 있다.

- 데이터 수집: 상황:

1. 다크 평균 (= 장치 노이즈) DM 이미 수행됨

2. 다크 드리프트 DD 이미 수행됨

(=  $f(t)$  로서의 드리프트 보정 인자)

3. 교차작용 및 사전 설정된 보정 인자 XT 이미 수행됨

4. 리포터를 위한 시그널 출력 표준화 인자  $NF_{Ri}$  부가적임

(= 양자 생성, 미세 환경적 영향, 스펙트럼

민감도 등을 보정하기 위해 사전 설정된 인자)

5. 배경 강도 BG 이미 수행됨

(= 혼합물 중에 함유된 모든 프로브에 대해

이로부터 측정된 화학적 노이즈)

6. 시간 경과에 따라 측정된 총 시그널 TFI 이미 수행됨

바람직하게는, 모든 단계는 Cobas TaqMan 장치 상에서 광학 채널 1, 2, 3 및 4에 대해 개별적으로 수행된다.

- 데이터 처리:

1) 각각의 채널에 대해, 시간 경과에 따른 시그널의 그래프로서, 하기를, 즉 채널-특이적 표준화 보정 형광 강도를 계산한다:

$$\{TFI_{f(t)} - [(DM \times DD_{f(t)}) + BG]\} \times XT \times NF_{Ri} = NFI$$

2) 채널 1, 2, 3이 리포터 염료에 대응하고, 채널 4가 IC 염료에 대응하는 경우,

$$NFI_4 = 100\% \text{ IC 반응 강도},$$

$$NFI_{1+2+3} = 100\% \text{ 표적 반응 강도}.$$

3) 이들 채널에 교차하는 분포의 관점에서 분석됨, 즉 채널 1에서 x%, 채널 2에서 y%, 채널 3에서 z%.

이어서, 생성된 시그널 분포 갯수를 상기한 사전에 계산된 값과 비교하여, 검출되는 병원체의 동정을 광학 채널 특이적 게인 (gain) 및 대응하는 리포터 염료와 함께, 보조 인자의 상관관계를 통해 유추한다.

따라서, 다시말해서, 상기 검사는 표적 염기에 대해서는 보정하지 않지만 (즉, 예를 들어 헬액 은행에서 스크리닝 적용을 위해서 적합한 포지티브/네거티브 결과를 생성하는 정량적 스크리닝 검사가 여전히 있다), 소정의 농도에서 변수-특이적 프로브의 시그널 출력에 관하여서는 (다중 증폭의 포지티브 결과에 대한 원인을 동정하기 위해서) 보정한다.

개개의 샘플 분석은 도 1에서 나타낸 바와 같이 진행시킬 수 있다.

이러한 처리 알고리즘의 논리를 이해하기 위해서, 중요한 검사 원리를 검토해보도록 한다.

5'-뉴클레아제 기술에서 (Taqman-PCR, 본원에 기재된 본 발명에 대한 바람직한 구현예), 증폭 및 검출 반응 각각은 밀접하게 엮여있다. 이의 말기까지, 2 개의 특정한 화학적 변형을 갖는 검출 프로브는 PCR 주혼합물에 첨가된다. 이들 변형 중 하나는, 프로브 골격에 공유 결합적으로 부착되는 형광생성 리포터 그룹 (R, 예를 들어 6-카르복시-풀루오레신의 유도체)이고, 다른 하나는 리포터의 형광 빛을 흡수할 수 있는 염료 (예컨대, 폴리메틴-시아닌 유도체)이며, 이를 켄치(quench)하기 위한 것(켄쳐 Q)이다. 상기 켄쳐는 전형적으로 5'-말단에서 프로브 골격에 부착되며, 이때 상기 리포터는 뉴클레오타이드 핵립 블록의 갯수에 의해 켄쳐로부터 공간을 띄운 올리고 서열내에 위치한다. 프로브는, 프라이머 (리버스 또는 포워드)의 3'-말단에 가까운 표적 핵산 (센스 또는 앤티센스 가닥)에 결합한다. 프라이머가 표적에 어닐링되고, DNA-폴리머라아제가 프라이머 : 표적 하이브리드에 결합하자마자, 확장이 개시된다. 효소의 5'-뉴클레아제 활성으로 인해, 카페 스트랜드의 합성과 함께, 동시에 폴리머라아제가 프로브 결합 부위에 도달하자마자 프로브가 절단되고, 리포터 및 켄쳐가 분리되어, 형광 시그널이 측정될 수 있게 된다. 이런 처리는 매 사이클마다 반복되고, 반응의 말단에서 시약이 고갈될 때까지, 더 옥더 형광 리포터가 용액중에 축적된다. 따라서, 시간의 경과에 따른 시그널의 플롯에서, S 자형 (sigmoidal) 성장 곡선이 생성된다. 임의의 형광 강도 (AFI, 상대적 광 단위, RLU 라고도 불려짐)가 배경 시그널로부터 현저하게 구별될 수 있는, 시간 축 상의 지점은 역치 사이클 (ct)이라고 부른다. ct 는 분석물 염기의 척도로서, ct 값이 더욱 작을수록, 출발 분자의 갯수가 더욱 높고/거나 추출 또는 증폭/검출 효율성이 더욱 우수하다. ct 값은 상이한 수학적 조작에 의해서 계산될 수 있다. 예를 들어, 컷오프 접근법 (일정한 인자에 의해서 증가되는 평균 배경 시그널 강도가 포지티브로부터 네거티브를 식별하기 위한 컷오프 시그널 강도를 생성한다), 또는 시간 경과에 따른 시그널 곡선의 1차 또는 2차 도함수 (즉, 가파름 또는 기울기의 프로필)의 최대 위치가 곡선 피팅(fitting) 후에 인식되는 접근법이 사용될 수 있다. 기울기 프로필 접근법은, 시그널 역치 접근법과 반대로, 배경 강도 수준에 본질적으로 독립적이어서, 반응 혼합물 중에 존재하는 모든 프로브로부터의 축적된 배경을 갖는 다중 검사를 위해 매우 흥미롭다.

이러한 원리에 기초하여, 상술한 처리 도식에 따르면, 1차 결과 (포지티브 또는 네거티브의 여부) 및 2 차 결과 (어떤 종류의 감염이 포지티브를 생성하는지의 여부)를 생성하기 위해서 상이한 수단을 사용할 수 있다.

하나의 통상적인 표지를 이용하여 다중 검사를 수행하는 것과 비교하여, 각종 광학 채널로의 시그널의 희석, 및 이에 따른 특정한 채널 중의 감소된 특이적 시그널 성장 곡선으로 인한 민감성의 잠재적인 손실이 존재한다. 따라서, 1차 결과를 생성하기 위해서, 시간 경과에 따른 복수의 시그널 곡선을 이용하여 임의로 작업할 수 있다. 이에 의해서, 전체적인 특이적 시그널 생성이 하나의 시간 경과에 따른 시그널 곡선으로 수집된 후, 이는 역치 사이클 (ct) 및 샘플의 주요 상황 (포지티브/네거티브)을 결정하기 위해 사용된다. 기울기 프로필 접근법을 사용하면, 배경 강도의 추가가 해로운 것이 아니며, 특이적 시그널 개인의 더욱 확고한 성장 특성을 인식하는 것의 잠재적 이점을 탐색할 수 있다.

한편, 2차 결과를 생성하기 위해서, 표준화 시그널 (NFI 강도)의 채널-특이적 분포를 참조하여, 상술한 패턴의 사전 계산된 매트릭스와 생성된 분포 패턴을 비교함으로써 감염의 종류를 유추할 수 있다. 또한, 분별력을 강화시키기 위해서, 비표준화된 특이적 시그널 강도를 또한 표준화된 시그널의 약 50 : 약 50, 또는 약 75 : 25 분포 (즉, 실질적으로 중요한 값)의 분석을 위해 고려될 수 있다.

- 프로브의 1:1 혼합물에 의해 표시되는 단일 감염의 경우에, 비표준화된 배경 보정 시그널 R1/R2 의 생성된 비율은 전체적인 증폭/검출 공정에 걸쳐서, 예를 들어 40/50 으로 일정할 것이다. 이는, 두 종류의 표지화된 프로브 (동일한 올리고뉴클레오타이드 서열)가 동일한 비율로 절단될 수 있기 때문에, 동등량의 정제된 염료에 의해 수득되는 표준화 인자 (0,80)의 값과 정확하게 동등해야만 한다. 배경 (BG)-보정이 필요하며, 이는, 본원에 제시된 개념에 따른 6개 변수-다중 검사의 해석과 함께, 각각의 채널-특이적 배경이 동일한 표지의 tag 를 갖는 3 가지의 상이한 프로브의 시그널 출력으로부터 만들어질 수 있기 때문이다. 따라서, BG 강도는 표지의 광학적 특성의 함수일 뿐만 아니라, (더욱 일반적으로는) 자기 상보성의 정도에 의한 프로브의 구조적 특성 (즉, 선형 또는 헤어핀)의 함수이고, 2차 구조의 형상적 평형에 영향을 미치는 측정 동안의 온도의 함수이다. 따라서, 하이브리드형성되지 않은 프로브의 2차 구조는 BG 강도에 관한 관점에서 고려되어야만 하고, 하기에 의해서 보조적 계산이 특이적 형광 강도 (SFI)에 기초해야만 한다:

$$SFI = TFI_{f(t)} - [(DM \times DD_{f(t)}) + BG] \times XT_i = AFI - BG$$

반대로, 특이적 시그널은, 프로브의 표적에 대한 본질적으로 완전한 하이브리드형성, 즉 프로브 올리고뉴클레오타이드의 선형화에 의존하고, 이에 따라 프로브의 구조에는 본질적으로 독립적인 폴리미라아제의 5'-뉴클레아제 활성에 의해서 생성된다. 또한, 이는,  $T_m$  (용융점)의 부수적인 감소로 인한 표적 스트랜드로부터의 해리 후 절단된 절단 프로브에 관한 것이다. 잔류 프로브 올리고머중의 짧은 내부 하이브리드는 PCR에서 어닐링/확장에 사용되는 상승온도에서 안정하지 않을 수 있다. 양자 생성에 있어서의 차이 또는 용매 효과에 대한 감수성에 대해 보상하는 표준화 후, 채널 1 및 2에서의 시그널 분포는 50 : 50 일 수 있다. 예측된 NFI 및 SFI의 비율을 확인하는 것은 단일 감염에 대한 2중 검증이다.

- R1 및 R2로 각각 표지화된 2 가지 특이적 프로브를 통해 나타내어지는 이중 감염의 경우 (케이스 I)에, 초기 분석물 역가 또는 전체적인 검사 효율성으로서 2 가지 검사에 대해 시그널 동역학 (시간의 함수로서의 성장)은 매우 상이할 것이고, 이들 둘 다 아마도 상이할 것이다. 따라서, NFI 수준 상에서 > 50 : < 50 상황에 대한 확률에 대해서, R1/R2의 SFI 비율은 반응의 어느 정도의 초기, 중기 및 후기에 대해 상이해야만 하고, 즉 SFI 비율은 가변적일 것이다. 상기 비율은 일정한 경향을 가질 것이고, 정제된 염료의 동등 혼합물에 의해 수득되는 각각의 표준화 인자와는 상이할 것이고, 바람직하게는 모델 프로브 (비가역적인 미세환경적 인자, 예컨대 연결자, 국부적 변화를 고려함), 예컨대  $T_3-R-R_{16}$ -올리고뉴클레오타이드에 커플링되고, 이는 구조적 형상으로 인해 시그널 출력을 변형시키지 않는다.

- R1 + R1R2에 의해 나타내어지는 이중 감염 및 2 가지 검사에 대한 실질적으로 상이한 전체적인 회수의 경우에, 50 : 50, 예컨대 55 : 45와는 매우 상이하지 않은 표준화된 시그널 분포가 채널 1 및 2에서 관찰될 수 있다. 그러나, 비표준화된 시그널 강도의 면에서, 비율 R1/R2는 예컨대 44/50 (0.88)일 것이고, 즉 표준화 인자보다는 클 것이다. 따라서, 표준화 및 비표준화 수준 상에서의 "예측되는 것보다 큰" 이중 편중은, 이중 감염을 나타낼 것이다. 더욱 구체적으로, 예컨대 AUC 등을 통해 추적된 R1/R2의 비율은, 식별력을 강화시키는 상이한 증폭 효율성으로부터 초래된 시그널 동역학의 상이함으로 인해 전체적인 검사에 걸쳐 아마도 가장 일정하지 않을 것이다.

- 만약, 이중 감염의 경우에, 두 검사 모두는 대략적으로 동등한 효율성을 가지고, 실질적인 차이 또는 대략적으로 동등한 분석물 역가로부터 출발한다면, 75 : 25 : 0의 NFI 패턴은 R1 + R2 또는 R1 + R1R2 표지화 (케이스 I 이거나 케이스 IV임)에 대략적으로 접근하거나 심지어는 그를 초과할 것이다. 여기에서, 케이스 IV 및 강하게 편중된 케이스 I 형태의 공감염 사이의 식별은, 절대적으로 특이적인 시그널 강도 (R1 강도는 케이스 I의 상황에서 훨씬 낮을 수 있다) 또는 체널-특이적인, 임의로는 조정된 SFI 값의 절대적인 차이에 의해서 성취될 수 있다. 그러나, 결과가 일부의 경우에 완전히 명확하지는 않을 수 있다.

이에 더하여, 복수의 AFI/t 곡선은 곡선 모양 특성에 관하여 분석될 수 있다. 단일 감염의 경우, 1 개의 변곡점을 갖는 단일 S 자형 곡선이 예상된다. 그러나, 이중 감염의 경우, 2 개의 감염원으로부터 추출된 2 종류의 핵산 표적 각각으로부터 생성된 2 가지의 성장 곡선은, ct 면에서 (즉, 곡선 밴드가 위로 향하고 배경 및 드리프트 수준을 초과하여 상승하는 시간 축 상의 지점), 그리고 모양 및 특이적 시그널 강도 면에서, 매우 동일하지 않을 것이다. 따라서, 2 개의 변곡점을 갖는 이중 S자형 곡선 모양이 형성될 수 있다. 따라서, 단일 또는 이중 S자형 곡선 모양은 조사중인 샘플 중에 존재하는 단일 또는 이중 감염의 지표일 수 있다. 그러나, 바람직하지 않은 경우로, 2 개 이상의 곡선의 겹침이, 기울기의 윤곽이 뚜렷한 최대값을 갖지 않고 노이즈가 증가된, 불규칙한 모양으로 유도될 수 있다. 여전히 또 다른 가능성은, 2 개의 거의 동일한 곡선이 겹치는, 1 개의 변곡점을 갖는 복잡한 곡선이다.

요약하자면, 감염의 형태의 면에서 포지티브 다중검사 결과의 해석을 성취하기 위해 이용가능한 수많은 수학적 수단이 존재한다. 이들은, 제한되지는 않지만, 하기를 포함한다:

기초적 수단 - 표적에 관한 2 개 또는 3 개의 광학 채널에서 현저한 시그널 강도를 갖는 상황에 있어서의 참조 NFI 분포 패턴, 및 편차의 형태. 참조 패턴으로부터 수용된 편차 범위는 절대 수치 (즉 정확한 데이터에 기초한 각각의 NFI 값 또는 이들의 조합에 대한 % 밴드)에 의해서 설정될 수 있다.

보조적 수단 - 통상적인 편중에 대한 특정 광학 채널에 관한 NFI 및 SFI 비율의 분석; 사이클 횟수의 함수로서의 NFI 또는 SFI 비율의 분석, 즉 반응 배향에 동적으로 따름 (일정하게 또는 가변적으로); NFI 비율 및 대응하는 절대적 SFI 값의 비율의 관련성, 또는 조사중인 상이한 감염원에 대한 공지된 검사 특이적인 전체적 효율성 (추출/증폭/검출)을 고려한, 임의의 2 개의 광학 채널 (표준 분량 차이에 관련하여서 임의로 조정함) 사이의 절대적인 SFI 값의 차이; (적용 가능하다면) 시간 경과에 따른 복수의 AFI 곡선의 모양 분석.

이런 기준 세트에 대한 추정되는 적용 방식은 도 1 및 2에 예시한다.

더욱 구체적으로, 전체적인 처리를 모니터링하기 위해서, 인공적인 핵산 구축물이 모든 샘플에 첨가될 수 있고, 바람직하게는 변형된 바이러스 입자 중에 포장(보호)되며, 이는 천연 표적과 함께 동시 추출 및 동시 증폭된다. 이런 내부 대조군 (IC)은 IC 검출 프로브에 대한 영역에 결합하는 유일한 프로브라는 것을 특징으로 하고, 이는 식별 가능한 방출 특성을 갖는 상이한 리포터 그룹에 의한 표적 특이적 프로브와는 상이하다. 따라서, IC 시그널은 표적 시그널로부터 식별될 수 있으며, IC로서 샘플 중에 존재한다는 것이 알려져 있고, 이는 모니터링 제제로서 기능한다. IC 반응이 존재하지 않는다면, 개개의 반응이 유효하지 않고 다시 반복되어야 하는 것으로 여겨져야만 한다.

동시에 추출/증폭/검출되는 각각에 첨가되는 내부 대조군 (IC) 및 처리되어 (즉, 비공지물 및 외부 대조군 또는 보정자 모두) R4로 나타내어지는 모든 표본에 대하여, 외부 포지티브 대조군은 검사의 일부일 것이다. 이를 "공지물"은 "비공지물"과 반대로 포지티브로 확인되어야만 하는 것이고, 모든 표적 관련 광학 채널에서 시그널을 야기하는 혼합 대조군 샘플로서 고안될 수 있다. 이어서, IC와 조합하여, 전체 광학 시스템의 이용성이 완전한 추출/증폭/검출 처리의 기능성에 대하여 모니터링될 수 있다. 혈액 은행 중의 핵산 기재 스크리닝 적용의 경우, 기술적으로 실현 가능하다면, 예를 들어 높은 민감성의 정량 검사가 각각의 모든 포지티브 제공자를 동정하는 것을 요구할 것이다. 따라서, 외부 포지티브 대조군의 역가가 낮은 농도 범위에서 설정될 수 있다.

### 실시예 3

실시예 1의 변수 목록에 기초하여, 하기에서 보여지는 시그널 분포를 분석한다. 검사중인 6개의 변수 각각에 대해, 표적 검출에 지정된 3개의 광학 채널에 교차하는 시그널 분포의 참조 패턴이 존재한다. 예를 들어 하기가 동시 수용된 범위에 대해서 보충되었다:

각각의 참조 패턴:

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	50	50	0
P2	100	0	0
P3	0	100	0
P4	0	0	100
P5	50	0	50
P6	0	50	50

NFI 참조 패턴:

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	10	10	9, 17
P2	10	1,67	6,25
P3	7,08	10	7,92
P4	4,17	1,67	10
P5	10	4,17	10
P6	5,83	10	10

100% 및 50% 평균값에 관한 추정 10%/20% 오프셋 밴드, 및 다수의 거의 제로 값의 5×(이는 참조 패턴에 대해 수용되는 범위로 해석한다):

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	40–60	40–60	0–9
P2	90–100	0–2	0–6
P3	0–7	90–100	0–8
P4	0–4	0–2	90–100
P5	40–60	0–8	40–60
P6	0–8	40–60	40–60

수용되는 편차 범위는, 예를 들어 백분율 값 (%), 절대 수치, 복수의 단순한 표준 편차, 또는 이들의 조합으로서 계산될 수 있다.

각각의 샘플(변수)에 대해, 채널 1(리포터 R1), 채널 2(리포터 R2) 및 채널 3(리포터 R3)에서의 시그널 분포는, 하기 표(오른쪽 부분)에서 보는 바와 같이, 각각에 대해 6번의 결정에 기초한 6 개의 평행 모사시험 데이터 세트에 의해서 제공된다. 왼쪽 축부상에서, 시그널 데이터 평가를 위한 이후의 단계가 보여진다.

모사시험 분포			모사시험 데이터 세트					
	Ch1	Ch2	Ch3	Ch1	Ch2	Ch3		
P1	49,33	48,83	1,83	P1	52	48	0	100
P2	98,42	0,33	1,25		49	48	3	100
P3	1,42	97,00	1,58		47	52	1	100
P4	0,83	0,33	98,83		50	46	4	100
P5	48,17	1,67	50,17		48	49	3	100
P6	1,17	50,33	48,50		50	50	0	100
평균값(산술평균) 참조 패턴에 따른 값, 편차			P2	98	0	2	100	
				97,5	0	2,5	100	
				99	0	1	100	
	Ch1	Ch2	Ch3	P3	100	0	0	100
P1	5,25	6,12	5,17		96	2	2	100
P2	4,69	2,45	3,25		100	0	0	100
P3	2,75	5,02	3,34	P3	1	96	3	100
P4	3,51	1,55	4,81		2	96	2	100
P5	7,92	6,75	7,92		2	97	1	100
P6	3,51	6,48	7,29		1	99	0	100
3중(threefold) 표준편차 참조 패턴에 따른 값, 편차			P4	0	99	0	100	
				2,5	95	2,5	100	
				0	0	100	100	
	Ch1	Ch2	Ch3	P5	0	0	100	100
P1	50	50	0		3	1	96	100
P2	100	0	0		1	0	99	100
P3	0	100	0	P6	0	0	100	100
P4	0	0	100		1	1	98	100
P5	50	0	50		46	6	48	100
P6	0	50	50		50	1	49	100
NFI 참조 패턴			P6	45	0	55	100	
				52	0	48	100	
				49	1	50	100	
	Ch1	Ch2	Ch3	P6	47	2	51	100
P1	10,00	10,00	9,17		0	50	50	100
P2	10,00	1,67	6,25		1	49	50	100
P3	7,08	10,00	7,92	P6	1	53	46	100
P4	4,17	1,67	10,00		2	47	51	100
P5	10,00	8,33	10,00		3	52	45	100
P6	7,50	10,00	10,00		0	51	49	100

100% 및 50% 평균 값에 관한 10%/20% 오프셋 밴드,  
및 0% 값에 관한 인자 5,  
즉 참조패턴에 대해 수용되는 범위

P5에 관하여, 대략적으로 50:50인 Ch1:Ch2:Ch3의 분포가 확인되고, 두 평균값 및 산란은 수용되는 범위내에서 존재한다. 이는 결과 "P5-포지티브"로 유도되고, 이는 HBV에 의한 단일감염을 의미한다.

#### 실시예 4

실시예 1 및 2에서 나타낸 주요한 고려사항의 진행에서 상기 개요된 바와 같이, 50:50의 분포는 항상 단일 감염의 유효한 지표인 것이 아닐 수 있다. 상기한 모호한 결과가 발생하지 않는 각종 적용이 존재한다는 것이 언급될 수 있을지라도, 수많은 다른 경우에, 특히 진단적 적용을 위해서는, 추가적인 분석이 종종 요구된다. 추가적인 분석이 가능하기 위해서, 예를 들어 균일한 증폭 방법에서 수득되는 추가적인 곡선 특성이 사용될 수 있다. 이는, Ru 엔료의 SFI 수준 및 NFI 추적 특성(NFI 비율 상수/변수; 최종 분포에 대한 초기/후기의 접근; 편중도 < 1 / > 1 등)과 같은 추가적인 곡선 특성이 감염 변수(들)을 해석하기 위해서 사용되는, 도 5에서 보여진 도식을 반영한다.

말단점 조건만을 고려하는 것 대신에, 반응 배향에 동적으로 따르는 실시간 검사 데이터를 분석함으로써 해석이 현저하게 강화될 수 있다는 것이 이들 실시예로부터 명백하다. 특히, 샘플 S4-S6의 경우에, 순수한 말단점 분석만이 단일 감염 진단의 위험을 생성할 수 있는 반면, 분석용 기술의 포괄적인 세트는 더욱 정확한 지정을 가능하게 한다. S5의 경우에, 예를 들어 말단점 NFI 분포는 실시예 3에서와 같이 HBV 단일 감염을 모방하는 반면, 반응 배향에 동적으로 따르는 NFI 분포의 분석에 의해서, 오류 지정, 즉 "HBV 단일 감염"을 쉽게 거부할 수 있고, 정확한 지정, 즉 "HIV-1-O + HCV의 공감염"

(HCV는 효율적으로 증폭되고 R3로 나타내어진다)으로 재평가되며, 덜 효율적으로 증폭되고 R1으로 나타내어지는 HIV-1-O 보다 훨씬 쉽게 특이적 형광 강도 (SFI)를 상승시킨다. 따라서, R1/R3 그래프는 50:50의 기준선 이하로 빠르게 떨어지고, R1이 일부 지연과 함께 진행되면, 포지티브 편중도와 함께 지속하여, 최종 분포에 근접한다.

#### 실시예 5 : HBV 단일 감염에 의한 실험 데이터

25 - 5000 카피/ $\mu\text{l}$ 의 분량으로 다양한 계놈 표적 (HBV 서브타입 A), 및 내부 대조군 구축물을, PCT/EP00/11459에 기재된 자기장 유리 입자 기술을 사용하여 혈장 샘플로부터 추출하였다. 용출된 핵산은, AmpliLink<sup>®</sup> 버전 2.1 (Roche Molecular Systems)에 의해 작동되는 COBAS TaqMAN<sup>TM</sup> 장치 상에서 균질한 실시간 Taqman-PCR로 특이적으로 증폭하고 검출하였다. 본원에서 기록된 기본 연구를 위해, HBV 특이적 프로브 (코드: JW144)를, FAM ( $\lambda_{\text{EX}} =$  약 494 nm;  $\lambda_{\text{EM}} =$  약 518 nm)로 표지된 7.5 pmol/100  $\mu\text{l}$ 에서, 그리고 JA274 ( $\lambda_{\text{EX}} =$  약 580 nm;  $\lambda_{\text{EM}} =$  약 609 nm)로 표지된 7.5 pmol/100  $\mu\text{l}$ 에서 적용하였다. 본 발명에 따른 추가의 데이터 분석 (예를 들어, 특이적 시그널 계인, 표준화 시그널 강도, 반응 배향에 따른 NFI 비율 및 NFI 추척, NFI 추적 그래프의 일정/오프셋/포지티브 기울기를 갖는 변수/네거티브 기울기를 갖는 변수로의 분류에 대한, 유효한 사이클 범위의 계산 [SFI >> AFI-BG 노이즈], 그리고 결과의 그래프적 표현을 위해)을 위해, 결과를 MS Excel<sup>®</sup> 버전 7.0으로 옮겼다.

균질한 다중 PCR 반응이, 표준 PCR 조건 하에서, HIV-1M, HIV-1-O, HIV2, HCV 및 HBV에 대한 특이적 프라이머 쌍 및 프로브를 사용하여 수행되었다.

도 3 a-d에서 보는 바와 같이, 하나의 그리고 동일한 생화학적 반응 (즉, HBV-DNA의 추출 및 증폭)으로부터 생성된 FAM 및 JA274 시그널은 본 발명의 개념에 따라 커플링된 방식, 즉 SFI 수준이 배경 이상으로 현저하게 상승하자마자 50:50의 분포선에서의 진동의 양상을 가졌다. HBV 분량이 높을수록, 더욱 초기에 이것이 성취되고, 반응의 말단점까지 일정하게 유지된다. 이는, COBAS TaqMan<sup>TM</sup> 상에서 측정된 시그널 출력이 FAM 및 JA274에 대해 매우 상이하여, 약 11.5:1의 표준화 인자 NF<sub>(JA274/FAM)</sub>을 초래하기 때문에, 매우 주목할만하다. 이어서, 이는, FAM에 의해 나타내어지는 유사한 반응과 비교하여 JA274에 의해 나타내어지는 반응의 강화된 분석용 민감도로 해석되고, 즉 검출 가능한 HBV의 더욱 낮은 말단 분량에서 이런 염료쌍을 사용하여 50:50의 NFI 분포로 수득하는 것이 중요하다 ("가장 나쁜 경우의 모델). 그러나, 실험적으로 확립된 NF<sub>(JA274/FAM)</sub>을 사용하여 SFI를 NFI로 해설할 때에, 통상적인 생화학 반응에 의해서 커플링되는 이런 염료는 현저한 정확성과 함께 50:50의 분포를 생성한다 (도 4b 참조).

#### 실시예 6: 상이한 공감염에 의한 실험적 데이터 (타입 I 및 타입 IV)

공감염된 샘플로부터 추출된 표적에 의존하여, HBV, HCV 또는 HIV-1-O에 특이적인 프로브가 증폭/검출 반응에 소비되었다는 것을 제외하고는, 절차 및 시약 세트는 실시예 5에 기재된 바와 같았다. HBV 프로브는 FAM- 또는 JA274로 표지된 올리고뉴클레오타이드의 동등량의 혼합물로서 사용되었고, HCV 프로브는 전체적으로 FAM 표지화되었으며, HIV-1-O 프로브는 전체적으로 JA274로 표지화되었다. HBV + HCV 포지티브 혈장 샘플 및 HBV + HIV-1-O 포지티브 혈장 샘플은 타입 IV 공감염이고, HCV + HIV-1-O 포지티브는 타입 I 공감염이다. 주: HIV-1-O의 경우, 역가는 배양 상 청액의 X-배 희석액 중에서 제공되었고; 모든 다른 변수의 경우, 정확하게 정량되어 (cp/ $\text{m}\ell$ ), 표준화된 물질이 이용되었다.

도 4a - d의 플롯으로부터 알 수 있는 바와 같이, NFI 분포 그 자체, 및 반응 배향에 따른 NFI 추적은 단일 감염으로부터 생성되는 것과는 상이하다. 예를 들어, 도 4a에서, 반응 #1-12는 낮고 대략적으로 동등한 역가의 HBV (매우 잘 증폭되고; 역전사 단계가 포함되지 않음) 및 HCV (잘 증폭되지만, HBV 보다는 다소 느리고, 역전사 PCR을 통하여; HCV 표적은 명백한 2차 구조로 인해 접근하기 용이하지 않음)를 특징으로 한다. 결과적으로, 특이적 반응 SFI<sub>(FAM)</sub> 및 SFI<sub>(JA274)</sub>의 개시가 상당한 양으로 HBV 반응을 통해 생성한 후에 곧바로, NFI<sub>(JA274/FAM)</sub> 비율은 50:50의 분포선 (=1)으로 접근하려는 경향이 있다. 그러나, 절차진행을 순환시키면, HCV는 약간 지연되어 반응하고, 추가적인 SFI<sub>(FAM)</sub>를 생성하여, 네거티브 기울기를 갖는 그래프와 함께 NFI<sub>(JA274/FAM)</sub> 비율을 동등선 이하로 되게 한다. 도 4a에서, 반응 #13-24는 낮은 분량 HBV 감염 및 100 배 과량의 HCV 분량을 특징으로 하며, 이는, 점진적으로 NFI<sub>(JA274/FAM)</sub>의 비율을 증가시키는 낮은 분량의 HBV 반응으로부터 SFI<sub>(FAM)</sub> 및 SFI<sub>(JA274)</sub>의 "커플링된" 생성의 진행에 있어서 SFI<sub>(FAM)</sub>이 높은 분량의 HCV 반응으로부터 생성되기 때문에, 초기 킥오프(kick-off)에 대한 유효한 사이클 범위의 이동, 동등선 훨씬 이하로 감소시켜 포지티브 기울기를 느리게 증가시키는 NFI<sub>(JA274/FAM)</sub> 비율 그래프를 초래한다.

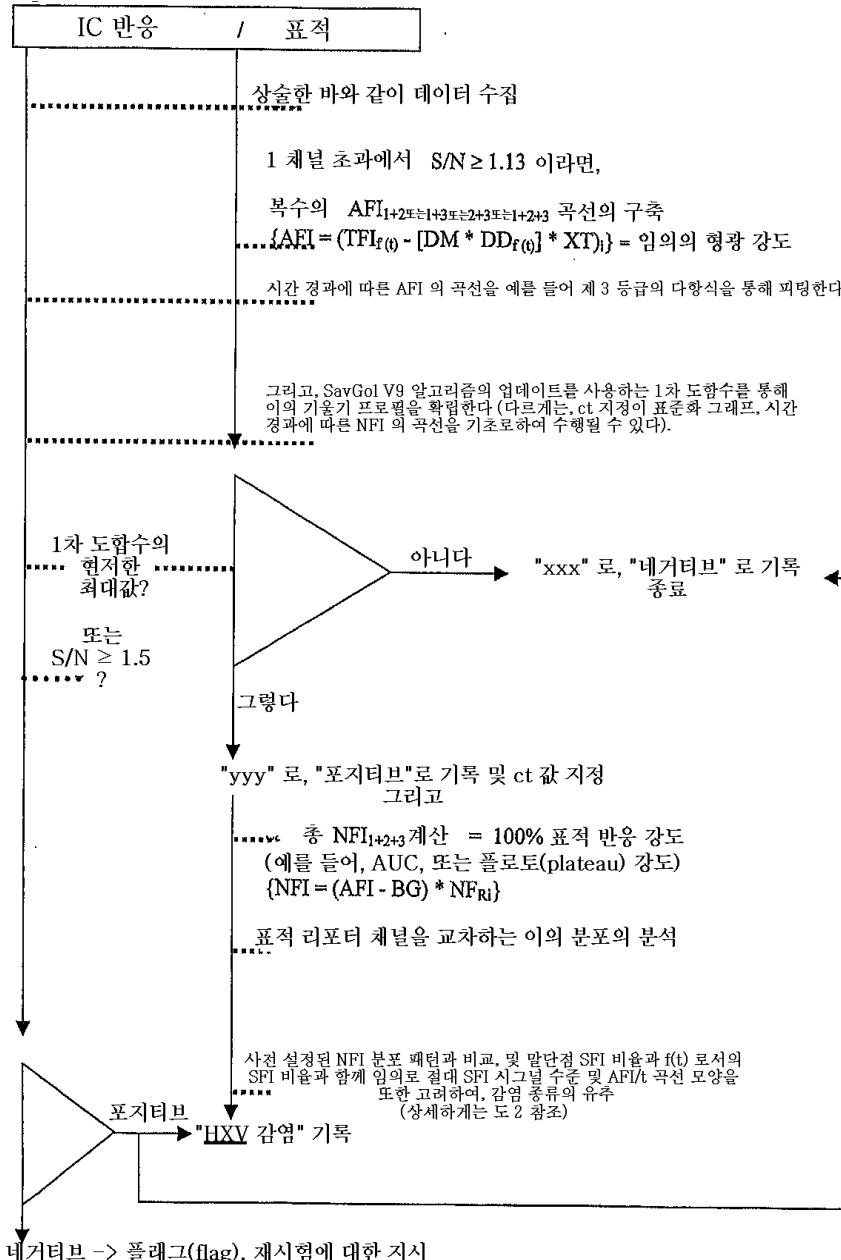
따라서, 도 1 및 2에 나타낸 정렬된 순차적 방식으로 도 2에 기재된 기준을 적용함으로써, 상기 분석은 "HBV 및 HCV의 공감염"을 생성할 수 있다. 이는, 높은 분량의 HBV 및 낮은 분량의 HCV의 조합(고수준의 SFI<sub>(FAM)</sub> 및 SFI<sub>(JA274)</sub> 와, 거의 추가되지 않은 SFI<sub>(FAM)</sub> 단독, 도 4d 참조), 또는 높은 분량의 HBV 및 낮은 분량의 HIV-1-O의 조합(높은 수준의 SFI<sub>(FAM)</sub> 및 SFI<sub>(JA274)</sub> 와, 거의 전혀 추가적이지 않은 SFI<sub>(JA274)</sub> 단독, 도 4 참조; 반응 #7-24)에 대해서도 사실이다. 몇몇 경우에, 특히 후자의 설정에 있어서, 가시적으로 조사된 NFI 곡선의 모양 및 예비의 수학적 서술자(NFI 말단점 비율, NFI 추적 특성, 절대적 SFI 수준 등)는 단일 감염으로 나타나는 것에 거의 근접한다. 그러나, 이는, 화학적(대략적으로 유사한 방출 강도를 갖는, 즉 표적 분량에 대해 독립적으로 더욱 안정한 NFI 비율 및 부수적인 수준의 절대 시그널 생성을 갖는 염료의 사용), 수학적(1차 성장 및 2차 NFI 곡선 각각의 분석에 적용되는, 더욱 정교한 통계학적 기술), 및 기술적(본원에서 사용된 TC 프로필에 대한 빠른 사이클링에 특이적으로 고안된, TC 블록, 및 작동 소프트웨어 설치; 이는 NFI 비율 추적 그래프를 차례로 안정화시키는 1차 성장 곡선을 부드럽게 되도록 돋는다) 수단에 의해서 개선될 수 있다.

더욱 구체적으로, 도 4b(반응 #13-24) 및 도 4c(반응 #1-6)는 타입 I 공감염의 예(즉 이 경우에는 HCV 및 HIV-1-O)를 나타내고, 이는 SFI<sub>(FAM)</sub> 및 SFI<sub>(JA274)</sub>의 "비커플링된" 생성을 초래한다. 결과적으로, HCV는 HIV-1-O 보다 훨씬 더 잘 증폭되기 때문에, NFI 비율 추적 그래프가 작성되면, 동등선 훨씬 이하로 유지된다(특히 프라이머/프로브 결합 부위에 영향을 미치는 다형성의 결과). 더욱이, HIV-1-O 단독으로부터 그라파트된 JA274 특이적 시그널 강도는, 다시 이론에 따른 HBV 단독 감염으로부터 생성된 것보다 상당히 낮다. 이는 단일 감염으로부터 공감염이 더욱 식별되도록 돋는다.

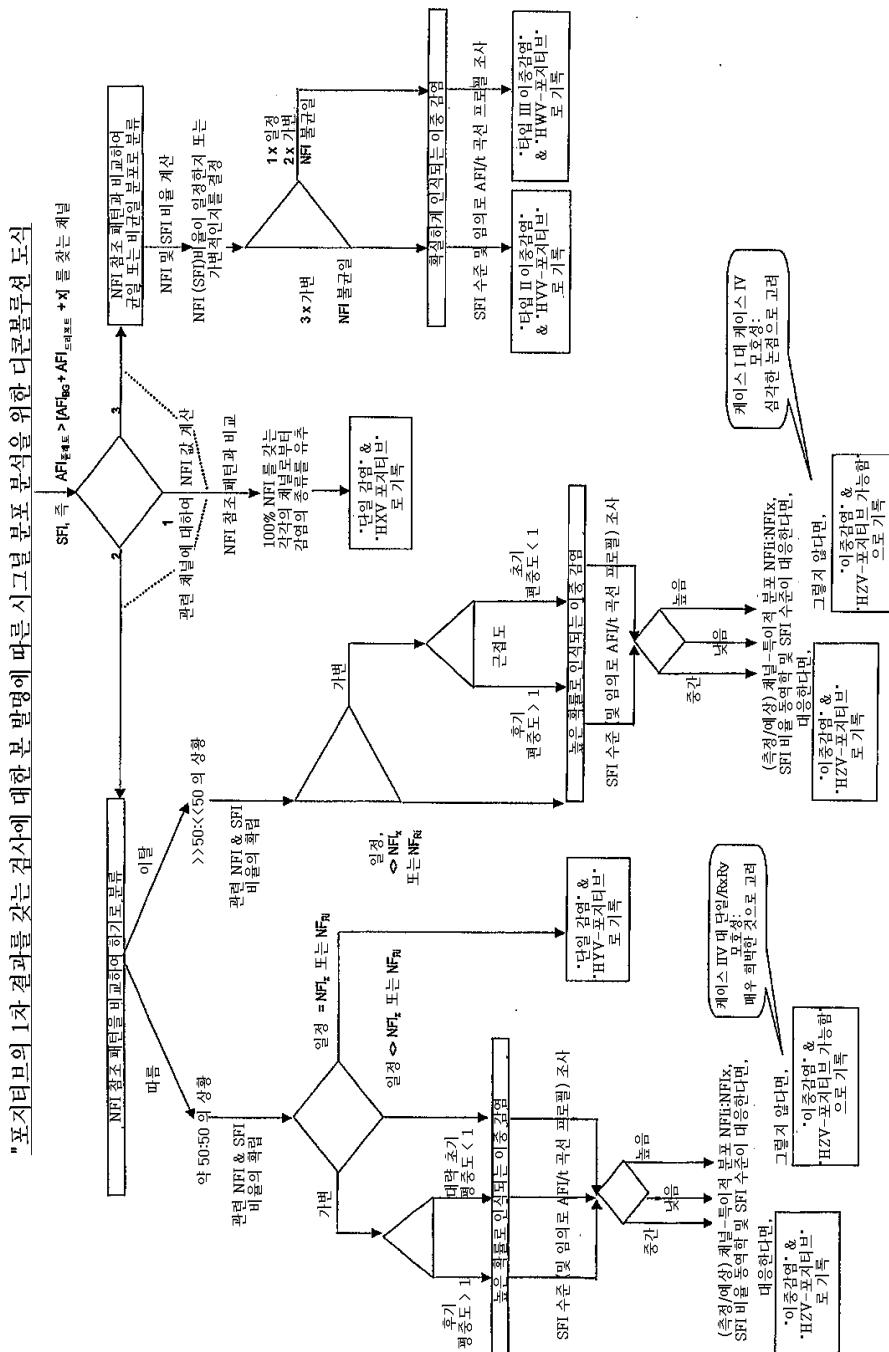
일반적으로 말하자면, 타입 IV 공감염은, 특히 높은 분량의 변수 5(R1[Ry] 및 R3[Rx]) 모두에 대해 높은 SFI 수준을 생성함)가 훨씬 낮은 수준의 변수 2(거의 추가적이지 않은 R1만으로 생성)와 조합되는 경우, 단일 감염으로부터 식별하기 더욱 어렵지만, 대부분의 경우에, 이는 예비적 시험 시스템에서와 같은 다소 단순한 수학적 기준, 및 "가장 나쁜 경우의 모델"에서의 염료쌍을 사용하여도 가능하다. 타입 IV 공감염에 있어서의 2 가지의 잘 증폭되는 표적의 조합(예를 들어, 변수 5[R1 + R3로 나타내어짐] 및 변수 4[R3로 나타내어짐])은, R3 강도의 실질적인 양이 비동시적 및 비대칭적으로 첨가되기 때문에, 훨씬 덜 모호하다. 그러나, 변수 5에 대한 변수 4의 상대적 풍부성이 무시할 정도가 된다면, 해석의 유사한 제한이 관찰된다.(예측되는 것으로서) 변수 2와 관련된 타입 IV 공감염과 반대로, 타입 I 공감염은 동일한 생화학적으로 커플링된 염기쌍에 의해 나타내어지는 단일 감염으로부터 매우 쉽게 식별된다. 이는, 말단점 NFI 비율의 수준과 반응 배향에 따른 NFI 추적, 및 또한 R1[Ry] 염료의 현저하게 낮은 시그널 강도 상에서 명백하게 된다. 이는, 실질적인 R3 강도가 심지어 낮은 분량의 변수 4에 의해서도 생성되는 반면 변수 2 특이적 프로브의 절단으로부터 생성된 R1 강도는 대개 낮고, 60 사이클 과정 동안에 다소 후기에 생성된다는 사실에 기인한다. 따라서, 초기 역가 또는 추출/용출/증폭 효율성의 거의 어쩔수 없는 차이로 인해, 대부분은 전반응에 걸친 시그널이 50:50 분포를 생성할 것 같지는 않다.

## 도면

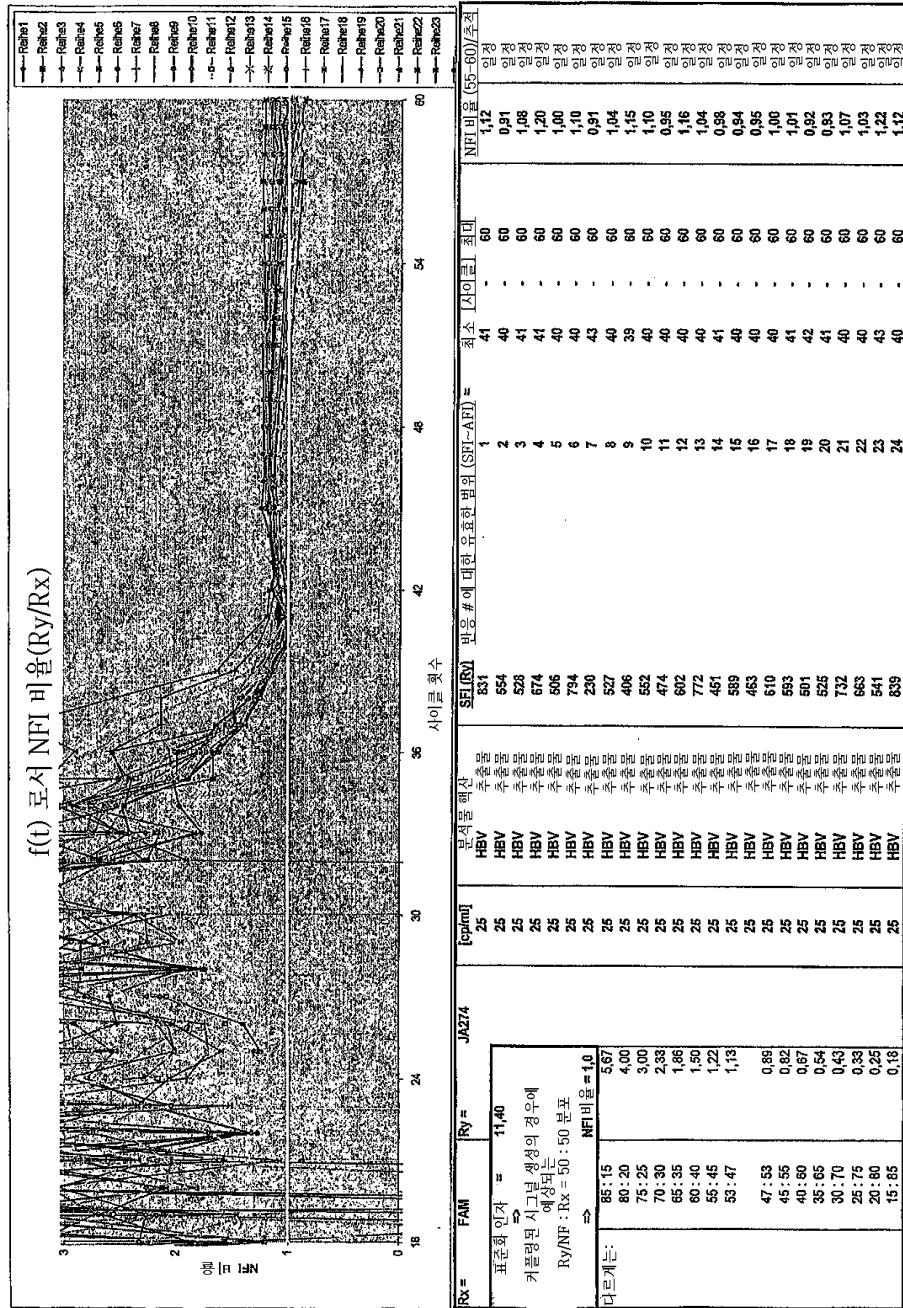
## 도면1



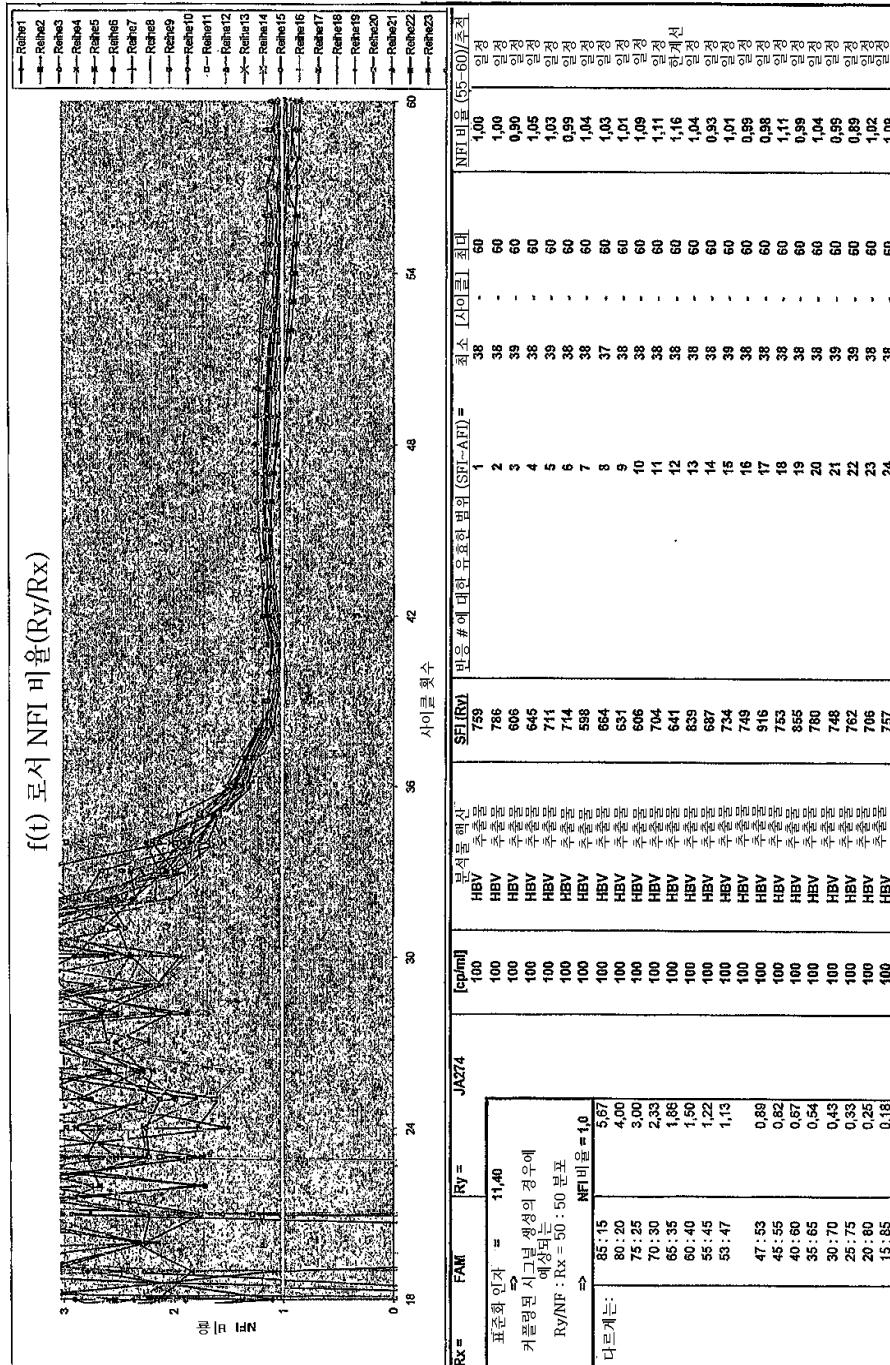
## 도면2



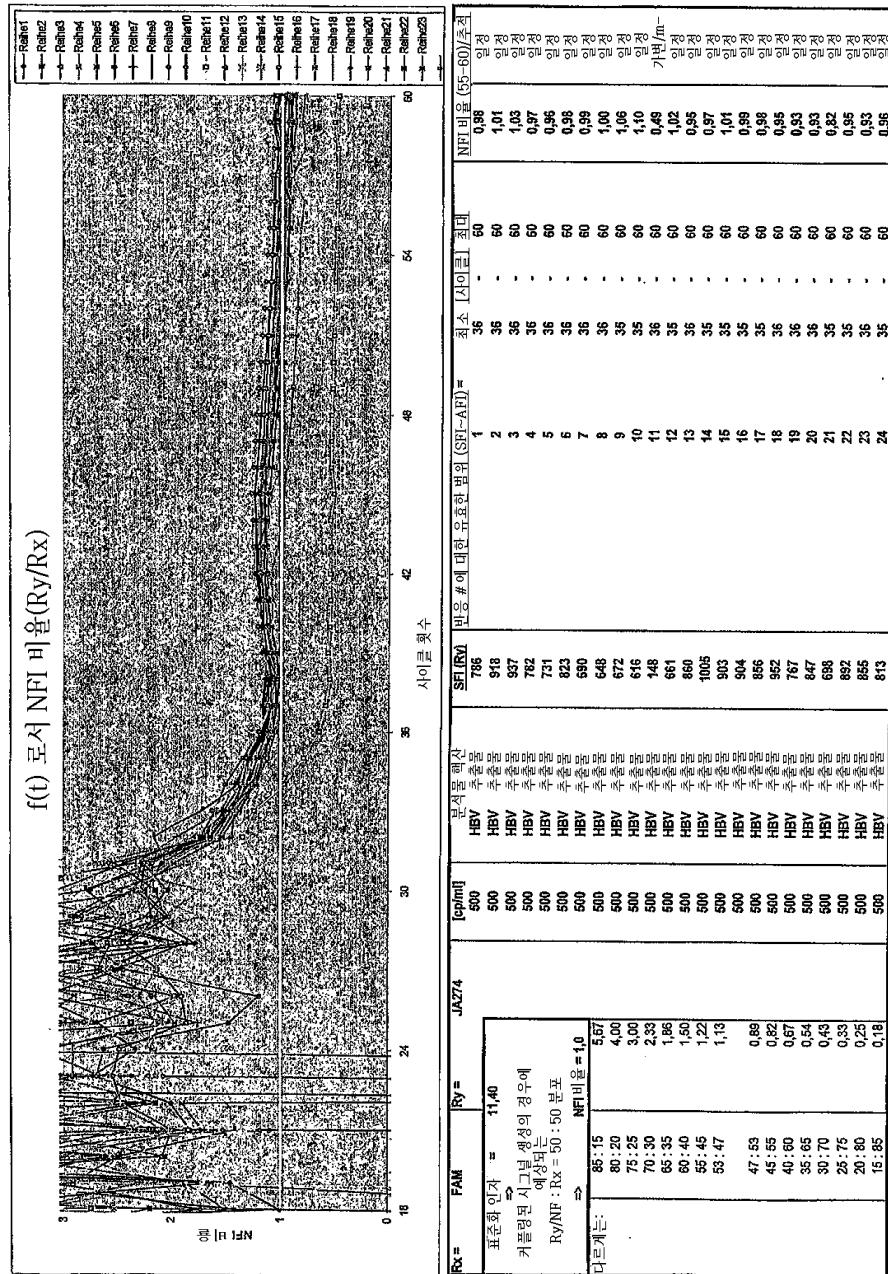
## 도면3a



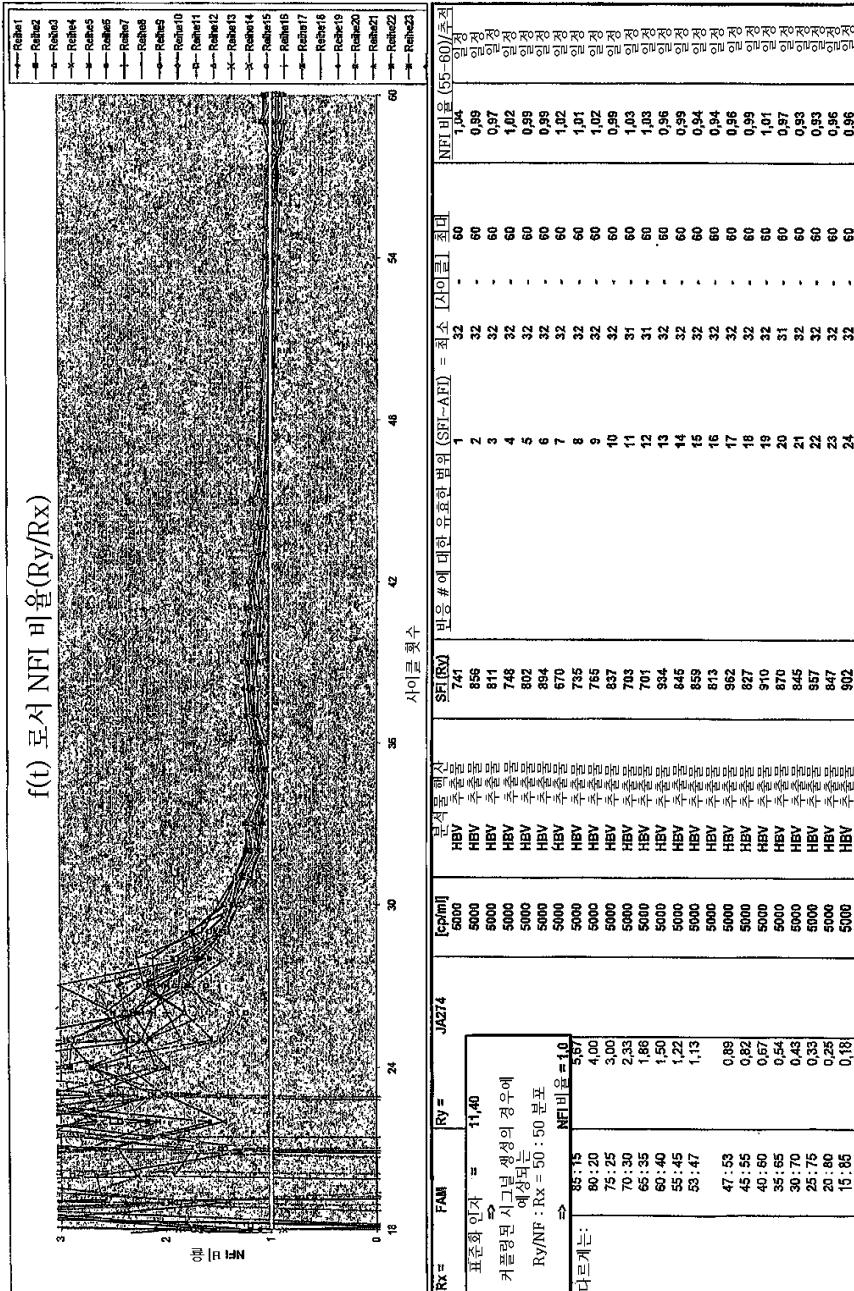
## 도면3b



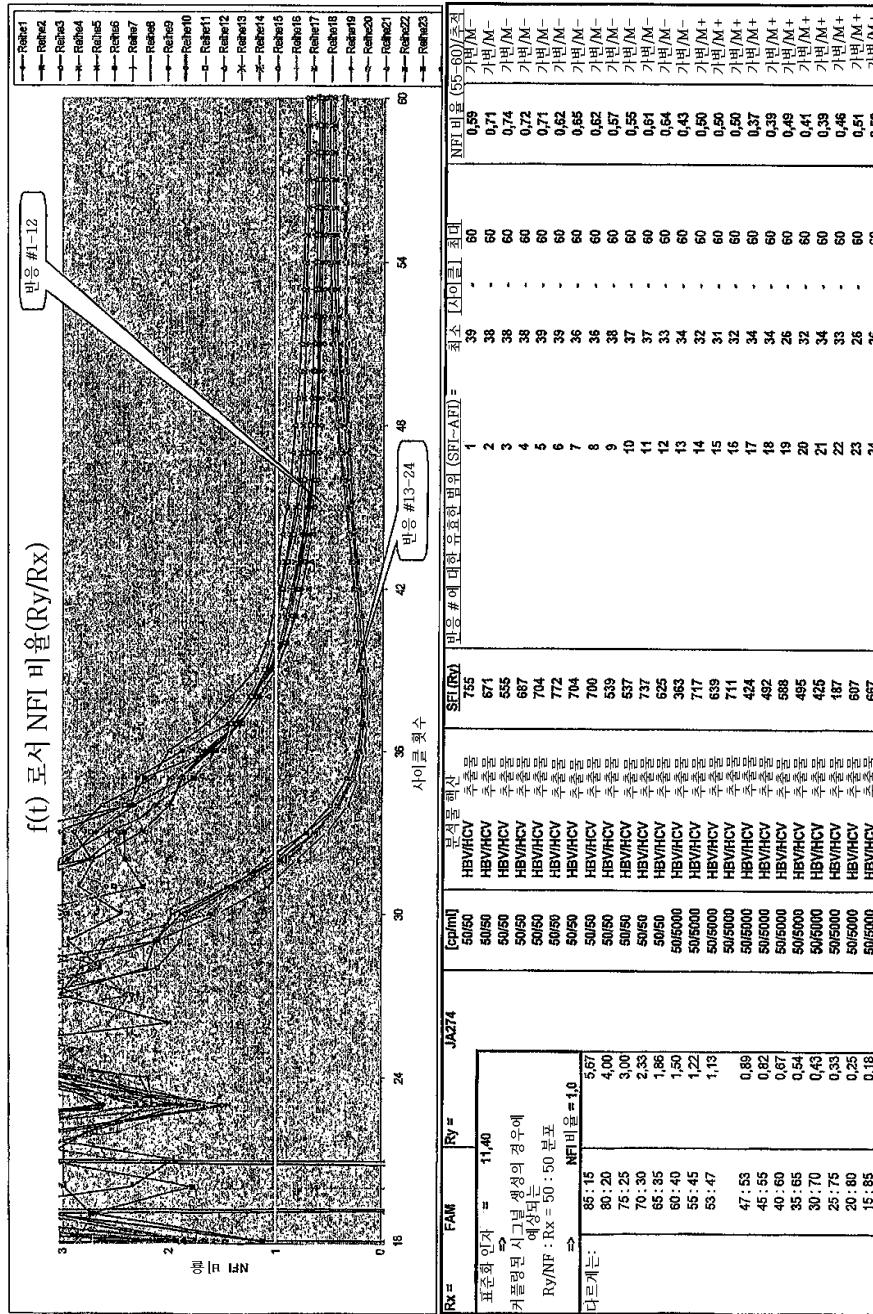
## 도면3c



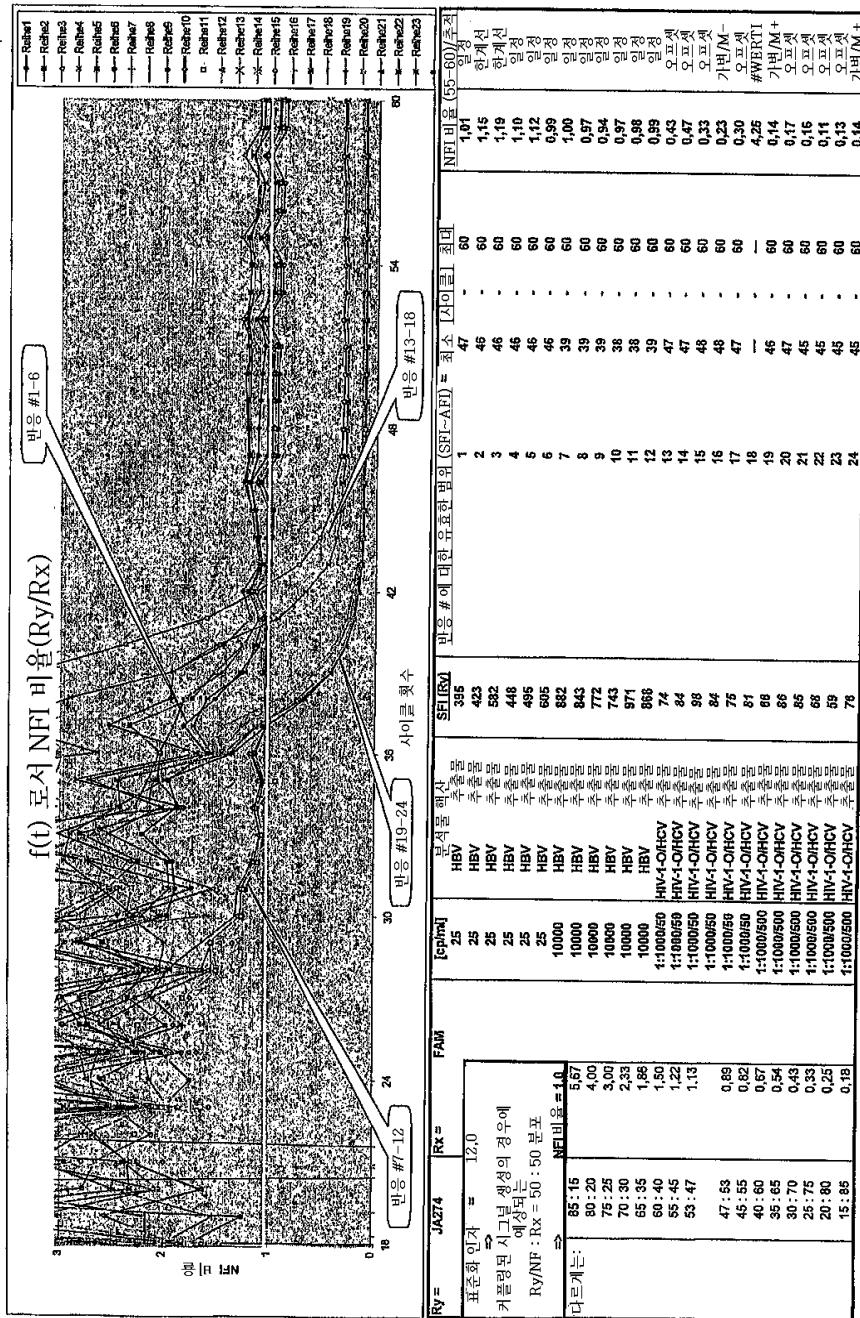
## 도면3d



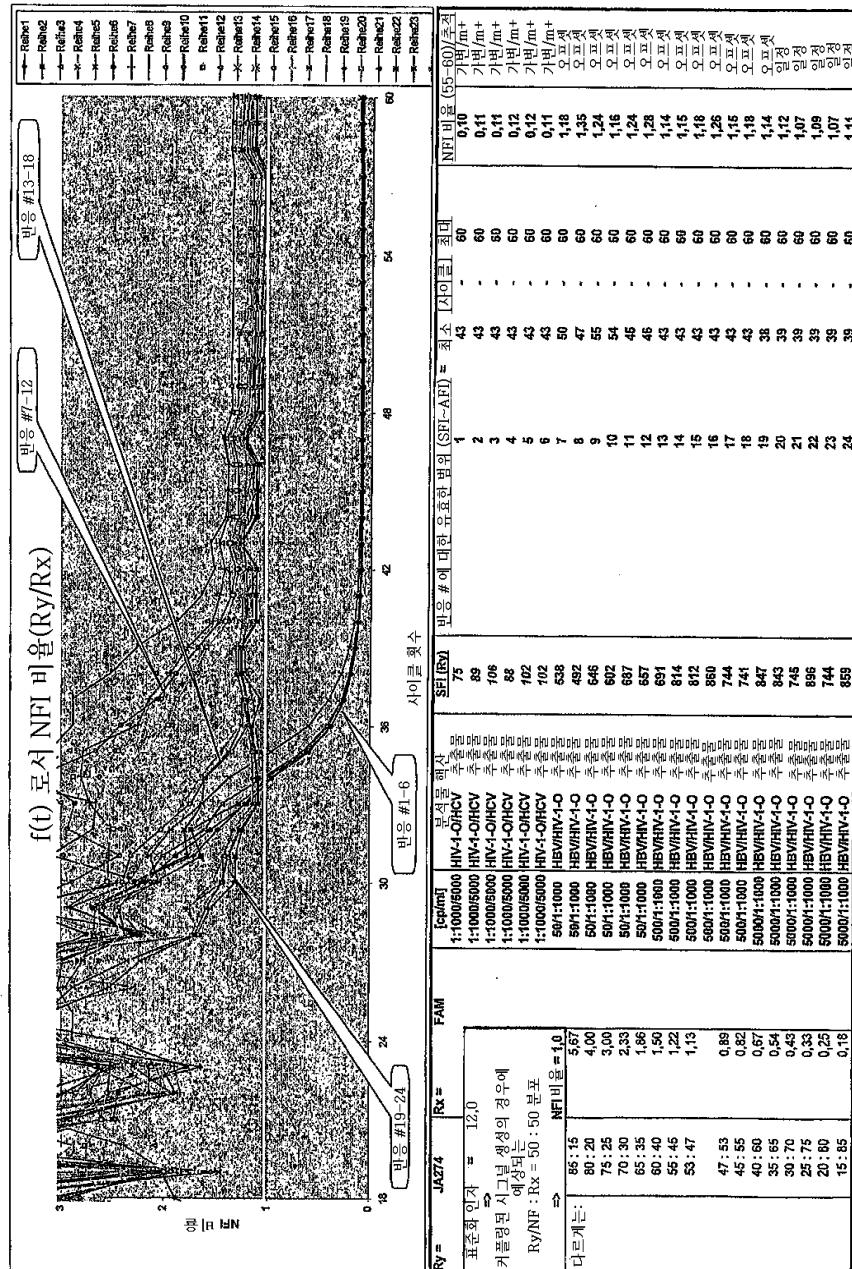
## 도면4a



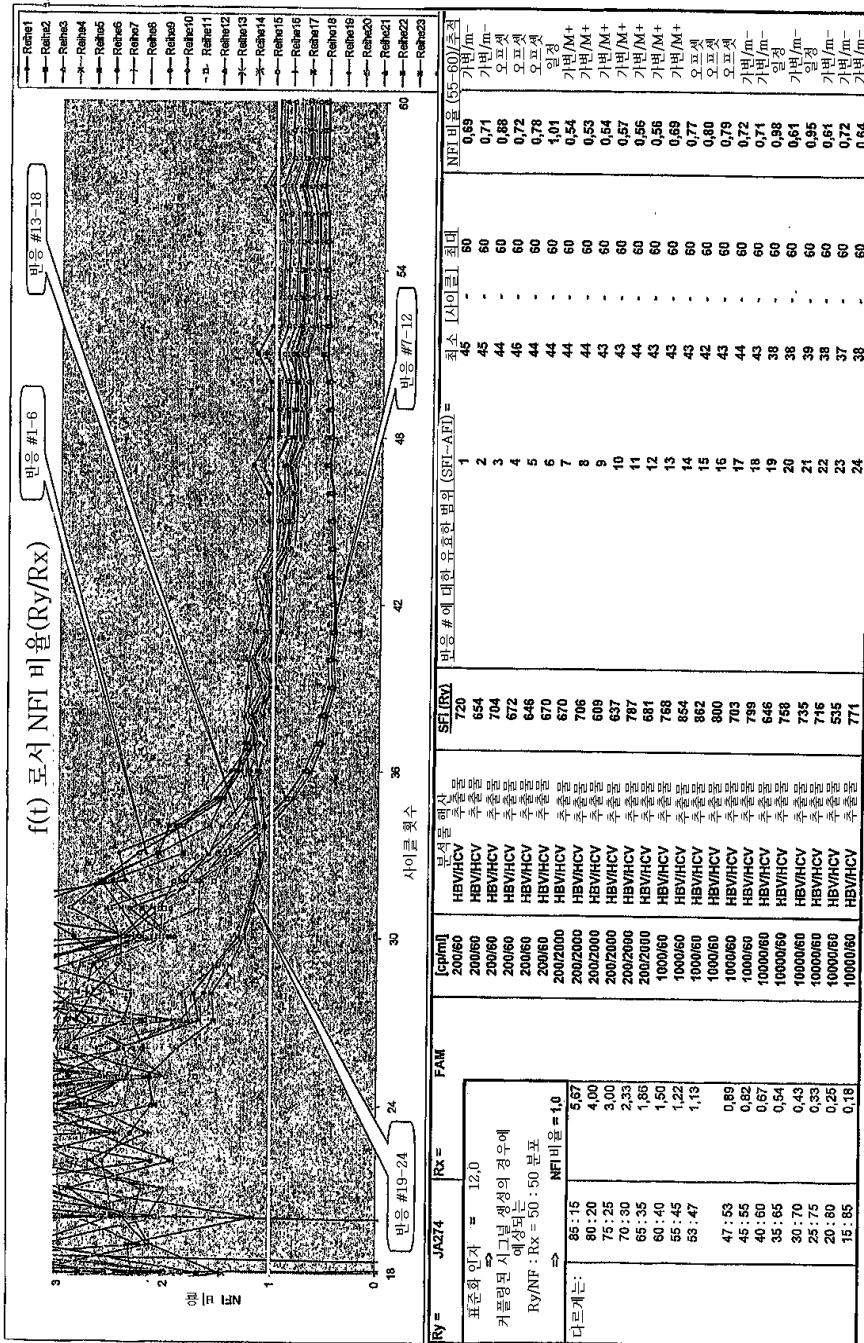
## 도면4b



도면4c



## 도면4d



## 도면5

자 친		Antigen		효 응 성 :	
P1	NFI+M	R1 / R2	Native	Native	Native
P2	HIV-1-O				
P3	HIV-2	R2			
P4	HCV	R3			
P5	HIV	R1 / R2			
P6	CMV	R2 / R3			
"보조 분석 수단"		NFI 분석 수단		NFI 분석 수단	
"기초 분석 수단"		(6)로서 NFI 주제		(6)로서 NFI 주제	
S1 = ?		NFI 분석 NFI 비율		R1/R2	
S1 = ?	31	30	38	99	Native
	34	33	33	100	Native
	32	35	33	100	Native
	33	32	36	100	Native
	32	30	38	100	Native
	30	33	37	100	Native
S2 = ?	3	15	62	100	Native
	2	20	73	100	Native
	1	24	75	100	Native
	0	27	73	100	Native
	1	20	75	100	Native
	3	21	75	100	Native
S3 = ?	24	49	27	100	Native
	21	49	30	100	Native
	28	46	26	100	Native
	27	44	29	100	Native
	25	48	27	100	Native
S4 = ?	52	46	0	100	Native
	50	49	1	100	Native
	47	52	1	100	Native
	50	46	2	100	Native
	49	50	1	100	Native
S5 = ?	46	1	52	98	Native
	45	0	55	100	Native
	49	0	51	100	Native
	46	1	53	100	Native
S6 = ?	40	0	60	100	Native
	41	1	55	100	Native
	43	1	55	100	Native
	37	2	61	100	Native
	42	3	55	100	Native
	38	0	62	100	Native

집체적으로 모호한 쟁점의 페널을 고려한다.