



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201022448 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：098136144

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 26 日

(51)Int. Cl. : *C12Q1/68 (2006.01)* *G01N33/553 (2006.01)*
C12M1/40 (2006.01)

(30)優先權：2008/10/27 美國 61/108,687
2009/05/01 美國 61/174,848

(71)申請人：奎根蓋瑟斯堡股份有限公司 (美國) QIAGEN GAITHERSBURG, INC. (US)
美國

(72)發明人：艾德 保羅 EDER, PAUL (US)；佩尼 艾瑞克 PAYNE, ERIC (US)；納薩瑞克
艾里納 NAZARENKO, IRINA (US)；瑞瑪夏德倫 蘇吉 RAMACHANDRAN, SUGI
(US)；維爾馬尼 亞范德 VIRMANI, ARVIND (US)；貝爾 勞拉 BELL, LAURA
(US)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：6 共 66 頁

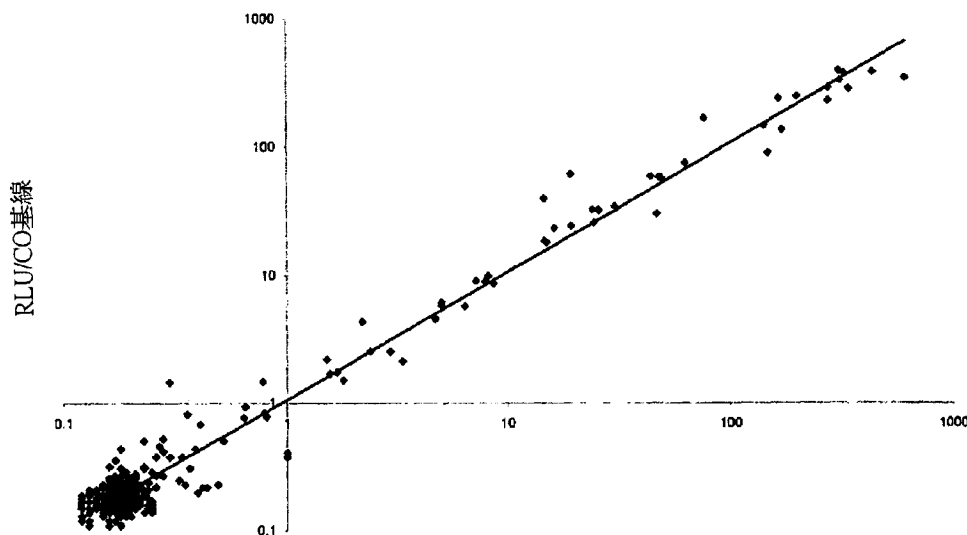
(54)名稱

於自動平台上之快速結果雜交捕捉法

FAST RESULTS HYBRID CAPTURE ASSAY ON AN AUTOMATED PLATFORM

(57)摘要

本發明包含一種能提供快速及可信賴的結果、用來偵測存在於樣品中的標的核酸分子之方法。



RLU/CO 21天在33°C下



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201022448 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：098136144

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 26 日

(51)Int. Cl. : *C12Q1/68 (2006.01)* *G01N33/553 (2006.01)*
C12M1/40 (2006.01)

(30)優先權：2008/10/27 美國 61/108,687
2009/05/01 美國 61/174,848

(71)申請人：奎根蓋瑟斯堡股份有限公司 (美國) QIAGEN GAITHERSBURG, INC. (US)
美國

(72)發明人：艾德 保羅 EDER, PAUL (US)；佩尼 艾瑞克 PAYNE, ERIC (US)；納薩瑞克
艾里納 NAZARENKO, IRINA (US)；瑞瑪夏德倫 蘇吉 RAMACHANDRAN, SUGI
(US)；維爾馬尼 亞范德 VIRMANI, ARVIND (US)；貝爾 勞拉 BELL, LAURA
(US)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：6 共 66 頁

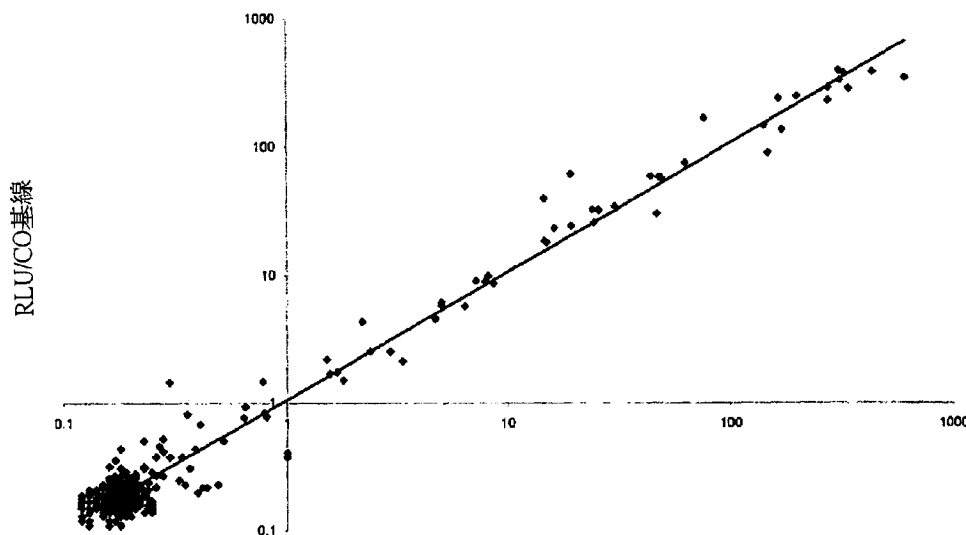
(54)名稱

於自動平台上之快速結果雜交捕捉法

FAST RESULTS HYBRID CAPTURE ASSAY ON AN AUTOMATED PLATFORM

(57)摘要

本發明包含一種能提供快速及可信賴的結果、用來偵測存在於樣品中的標的核酸分子之方法。



RLU/CO 21天在33°C下

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

此申請案主張2008年10月27日所提出的美國臨時專利申請案案號61,108,687及2009年5月1日所提出的美國臨時專利申請案案號61/174,848二者之優先權。全部申請案的內容其全文於此以參考方式併入本文。

發明領域

本發明係關於用來測量存在於樣品中的核酸之方法、試劑、高生產量系統及成套工具。

【先前技術】

發明背景

已經使用特定的核酸序列與序列改變之偵測及特徵來偵測象徵感染之病毒或細菌的核酸序列存在、與疾病及癌相關的哺乳動物基因之變異株或對偶基因存在、及鑑別在法醫樣品中和在親權決定中所發現的核酸來源。

例如，許多微生物及病毒的RNA或DNA已經被分離及定序出來。核酸探針已經用來檢驗大量的流行病。先前已經使用可與在測試樣品中的互補RNA或DNA序列雜交之可偵測的核酸序列。探針之偵測指示出在測試樣品中對探針特定的特別核酸序列存在。除了輔助科學研究外，可使用DNA或RNA探針來偵測病毒及微生物(諸如細菌、酵母菌及原生生物)和聯繫至在患者樣品中的特定病症之基因突變的存在。

核酸雜交探針具有高靈敏度及特異性超過其它偵測方

法的優點，且不需要存活的有機體。雜交探針可例如以容易偵測的放射性物質或以允許其捕捉及偵測的生化學標誌(諸如例如，生物素)標記。核酸分子亦可被對DNA雜交物特定的第一抗體捕捉，其中該雜交物可包含DNA-RNA雜交物、DNA-DNA雜交物或RNA-RNA雜交物。隨後，該雜交物可藉由第二、經標記的抗體(其可例如以生化學標誌(諸如鹼性磷酸酶或任何其它能偵測的標誌)標記)偵測。

當來自人類及病原有機體的基因之核酸序列資料累積時，對快速、成本有效及容易使用測試的需求增加。已對能較快及較多地測量在樣品中的標的核酸提供新穎且有效的方法、組成物及成套工具有所需求。本發明之方法及分析滿足這些需求且可使用於高生產量自動化系統中。在另一個觀點中，可在部分自動化系統中執行該方法及分析。

【發明內容】

發明概要

一個觀點係關於一種用來測量在包含生物物質的樣品中之標的核酸分子存在的方法。該生物物質可包括子宮頸上皮細胞或來自子宮頸細胞的核酸。使用所揭示的方法，可相當快速地(例如，在少於約二或三小時內)獲得標的核酸分子是否存在於樣品中之測量。

在一個觀點中，用來測量在樣品中之標的核酸分子存在的方法包括：

- a)將該樣品懸浮在一收集媒質中；
- b)讓標的核酸分子從樣品中釋放至該收集媒質中；

c)讓雙股標的核酸分子轉變成單股標的核酸分子；

d)在允許探針與標的單股標的核酸分子雜交形成一雙股核酸雜交物之條件下，讓一或多種探針與該單股標的核酸分子接觸；

e)捕捉該雙股核酸雜交物；

f)分離該雙股核酸雜交物與未結合的單股標的核酸分子；及

g)偵測該雙股核酸雜交物，因此指示出該標的核酸存在。

另一個觀點係關於在樣品中的標的核酸分子之快速偵測。該偵測方法可自動化、完全自動化或部分自動化(換句話說，需要某些人類輸入)。

另一個觀點係關於同時或在非常短的時間內偵測在多個樣品中的標的核酸分子，例如在機器或一系列的機器中。

在一個觀點中，該方法、分析及裝置從樣品負載步驟至測試結果傳遞完全自動化。

更另一個觀點係關於一種用來在簡單的地點中進行標的核酸分子偵測方法之工具。該工具結合許多或全部執行該方法的步驟之其它各別工具。

另一個觀點係關於一種用來偵測在樣品中之標的核酸分子的成套工具。

進一步觀點係關於一種在一將含標的核酸分子之樣品收入其中的收集媒質內之試劑。該標的核酸分子可被保持在該收集媒質中，以具有該標的核酸分子最小降解的方式

保存超過時間數週或數個月。在一個觀點中，以DNA為基礎之標的樣品物質可以具有該標的核酸分子最小降解之方式被保持在該收集媒質中超過時間數週或數個月。在一個觀點中，該以清潔劑為基礎的收集媒質允許樣品的快速分析及處理。

圖式簡單說明

第1圖顯示出該以清潔劑為基礎的收集媒質在微滴板井中抓住磁性小珠比已知的收集或樣品運送媒質(STM)(以非清潔劑為基礎的媒質)好。

第2圖顯示出每毫升的樣品僅具有0.2皮克標的核酸(DNA)之樣品，使用本發明之方法能提供可讀取的信號。

第3圖顯示出臨床樣品在室溫下21天的安定性。

第4圖顯示出臨床樣品在33°C下21天的安定性。

第5圖顯示出測試結果闡明0.2皮克/毫升的HPV 16質體(其等於1000個HPV 16 DNA複製品)之 $S/N > 2.0$ 。

第6圖顯示出懸浮在以清潔劑為基礎的收集媒質中及貯存在室溫下11天的軟丸粒之安定性資料。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

本揭示涵蓋用來快速測量存在於樣品中的核酸分子之方法、組成物、試劑、系統及成套工具。該方法、組成物、試劑、系統及成套工具可使用於臨床診斷的目的，包括(但不限於)偵測及鑑別病原有機體及偵測特別疾病的基因體質。

在一個觀點中，本揭示提供一種用來測量存在於樣品中之標的核酸分子的方法。該方法包括：

a)將該樣品懸浮於一包含清潔劑的收集媒質中；

b)變性該標的核酸分子；

c)在允許探針與標的核酸分子雜交之條件下，讓一或多種多核苷酸探針與該標的核酸分子接觸，因此形成一雙股核酸雜交物；

d)在塗佈有對該雙股雜交核酸雜交物特定之第一抗體的固體載體上捕捉該雙股核酸雜交物，因此形成一雙股核酸雜交物/固體載體複體；

e)分離該雙股核酸雜交物/固體載體複體與未結合的核酸；

f)讓該複體與對該雙股核酸雜交物特定或對該第一抗體特定之第二抗體結合，以形成一雙股核酸雜交物/固體載體抗體複體，其中該第二抗體經可偵測的標誌標記；

g)以一包含清潔劑的清洗緩衝液清洗該雙股核酸雜交物/固體載體抗體複體；及

h)偵測在該第二抗體上的標籤，其中該偵測指示出該標的核酸分子存在。

在另一個觀點中，本揭示提供一種用來測量存在於樣品中之標的核酸分子的方法，其包括將一樣品懸浮在一包含清潔劑的收集媒質中；變性一標的核酸分子；在允許探針與該標的核酸分子雜交或黏結之條件下，讓一或多種多核苷酸探針與該標的核酸分子接觸；及在塗佈有對該雙股

雜交核酸雜交物特定之第一抗體的固體載體上捕捉該雙股核酸雜交物。

在一個觀點中，本揭示提供一種用來測量存在於樣品中的標的核酸分子之方法，其包括將一樣品懸浮在一包含清潔劑的收集媒質；變性一標的核酸分子；在允許探針與該標的核酸分子雜交或結合之條件下，讓一或多種多核苷酸探針與該標的核酸分子接觸，在塗佈有對雙股雜交核酸雜交物特定之第一抗體的固體載體上捕捉該雙股核酸雜交物；及分離該雙股核酸雜交物/固體載體複體與未結合的核酸。

在一個觀點中，本揭示提供一種用來測量存在於樣品中的標的核酸分子之方法，其包括將一樣品懸浮在一包含清潔劑的收集媒質中；變性一標的核酸分子；在允許探針與該標的核酸分子雜交或結合之條件下，讓一或多種多核苷酸探針與該標的核酸分子接觸，在塗佈有對該雙股雜交核酸雜交物特定之第一抗體的固體載體上捕捉該雙股核酸雜交物，因此形成一雙股核酸雜交物/固體載體複體；分離該雙股核酸雜交物/固體載體複體與未結合的核酸；及結合該複體與對該雙股核酸雜交物特定或對該第一抗體特定之第二抗體，以形成一雙股核酸雜交物/固體載體抗體複體。

在另一個觀點中，本揭示提供一種用來測量存在於樣品中的標的核酸分子之方法，其包括將一樣品懸浮在一包含清潔劑的收集媒質中；變性一標的核酸分子；在允許探針與該標的核酸分子雜交或結合之條件下，讓一或多種多

核苷酸探針與該標的核酸分子接觸，在塗佈有對該雙股雜交核酸雜交物特定的第一抗體之固體載體上捕捉該雙股核酸雜交物，因此形成一雙股核酸雜交物/固體載體複體；及分離該雙股核酸雜交物/固體載體複體與未結合的核酸；結合該複體與對該雙股核酸雜交物特定或對該第一抗體特定的第二抗體，以形成一雙股核酸雜交物/固體載體抗體複體，其中該第二抗體經可偵測的標誌標記；及以一包含清潔劑的清洗緩衝液清洗該雙股核酸雜交物/固體載體抗體複體。

在另一個觀點中，本揭示提供一種用來測量存在於樣品中的標的核酸分子之方法，該方法包括：

- a)將該樣品懸浮在一包含清潔劑的收集媒質中；
- b)變性在該樣品中的標的核酸分子；
- c)藉由讓至少一種多核苷酸探針與該標的核酸分子接觸以形成一雙股核酸雜交物；
- d)藉由將該雙股核酸雜交物捕捉在載體上以形成一雙股核酸雜交物-載體複體，其中該載體包含一第一抗體；
- e)藉由讓該雙股核酸雜交物-載體複體與第二抗體接觸以形成一雙股核酸雜交物-載體-第二抗體複體，其中該第二抗體經可偵測的標誌標記；
- f)以一清洗緩衝液清洗該雙股核酸雜交物-載體-第二抗體複體；及
- g)偵測該在第二抗體上的標誌，其中該偵測指示出該標的核酸分子存在。

在一個觀點中，該固體載體包含一經改質的順磁性小球，其經塗佈或已向那裏接附一對雙股雜交核酸免疫特異的第一抗體。使用磁場來分離該雙股核酸-磁珠-抗體複體與未結合的核酸。

在一個觀點中，該方法不包括樣品預處理步驟。例如，該以清潔劑為基礎的收集媒質允許減少樣品製備時間，此依次可導致標的核酸分子之偵測加速。該樣品可藉由本揭示的方法、分析或裝置以直接分析的方式分析。在一實施例中，在使用本揭示的分析評估前，未在樣品上進行純化步驟。在一個觀點中，藉由本揭示的方法、分析或裝置直接分析粗產物溶成物。在另一個觀點中，該樣品不進行標的放大步驟。

一個觀點係關於使用於本文中所提供的方法、成套工具、分析及裝置來診斷癌之方法。在一個觀點中，藉由鑑別與HPV及HPV變異株相關的核酸分子來偵測子宮頸癌。在另一個觀點中，可使用於本文中所提供的方法、成套工具、分析及裝置來篩選子宮頸上皮內贅瘤形成(CIN)。在藉由於本文中所提供的方法、成套工具、分析及裝置診斷後，可隨後治療被偵測到的癌。在一個觀點中，被診斷的癌為子宮頸癌及其變異株。

在一個觀點中，本揭示提供一種包含一已懸浮在一收集媒質中的生物樣品之組成物，其中該收集媒質包含約0.5%至約2.0%的NP-40、約0.10%至約0.40%的去氧膽酸鈉、約25 mM至約75 mM的Tris-HCl、約10 mM至約50 mM

的EDTA、約50 mM至約200 mM的NaCl及約0.01%至約0.10%的疊氮化鈉。

在一個觀點中，本揭示供應一種組成物，其包含：

(a)一懸浮在下列物質中的生物樣品：約0.5%至約2.0%的NP-40、約0.10%至約0.40%的去氧膽酸鈉、約25 mM至約75 mM的Tris-HCl、約10 mM至約50 mM的EDTA、約50 mM至約200 mM的NaCl及約0.01%至約0.10%的疊氮化鈉；及

(b)至少一或多種多核苷酸探針。

在一個觀點中，本揭示供應一種組成物，其包含：

(a)一已懸浮在一收集媒質中的生物樣品，其中該收集媒質包含約0.5%至約2.0%的NP-40、約0.10%至約0.40%的去氧膽酸鈉、約25 mM至約75 mM的Tris-HCl、約10 mM至約50 mM的EDTA、約50 mM至約200 mM的NaCl及約0.01%至約0.10%的疊氮化鈉；

(b)至少一或多種多核苷酸探針；及

(c)一第一抗體。

在一個觀點中，本揭示供應一種組成物，其包含：

(a)一已懸浮在一收集媒質中的生物樣品，其中該收集媒質包含約0.5%至約2.0%的NP-40、約0.10%至約0.40%的去氧膽酸鈉、約25 mM至約75 mM的Tris-HCl、約10 mM至約50 mM的EDTA、約50 mM至約200 mM的NaCl及約0.01%至約0.10%的疊氮化鈉；

(b)一第一抗體；及

(c)一第二抗體。

在一個觀點中，本揭示供應一種組成物，其包含：

(a)一已懸浮在一收集媒質中的生物樣品，其中該收集媒質包含約0.5%至約2.0%的NP-40、約0.10%至約0.40%的去氧膽酸鈉、約25 mM至約75 mM的Tris-HCl、約10 mM至約50 mM的EDTA、約50 mM至約200 mM的NaCl及約0.01%至約0.10%的疊氮化鈉；

(b)至少或一或多種多核苷酸探針；

(c)一塗佈有第一抗體的載體；及

(d)一第二抗體。

在一個觀點中，本揭示供應一種組成物，其包含：

(a)一已懸浮在一收集媒質中的生物樣品，其中該收集媒質包含至少一種清潔劑；

(b)一變性試劑；

(c)至少一種能結合至標的核酸分子的多核苷酸探針；

(d)一塗佈有第一抗體的載體；及

(e)一經可偵測的標誌標記之第二抗體。

在一個觀點中，可使用任何上述之組成物與任何描述於本文的收集媒質。在一個觀點中，在上述組成物中的生物樣品為子宮頸細胞樣品或人類子宮頸細胞樣品。在另一個觀點中，變性在該生物樣品中的核酸分子。在上述組成物中的生物樣品當貯存在該收集媒質中時可在33°C下具有至少21天之安定性。在一個觀點中，該第二抗體經可偵測的標誌標記。

生物樣品

本發明的方法可使用來從樣品中偵測出標的核酸分子之存在，其中該樣品包括(不限於)樣本或培養物(例如，細胞、微生物及病毒培養物)(包括生物及環境樣品)。該生物樣品可來自動物，包括人類、流體、固體(例如，糞)或組織；和液體與固體食物及飼料產物與原料，諸如奶製項目、蔬菜、肉及肉副產物；及廢棄物。該環境樣品包括環境物質，諸如表面物質、土壤、水及工業樣品；和從食物及奶製品加工工具、裝置、設備、器皿、可棄換式及非可棄換式項目所獲得的樣品。

特別佳的生物樣品包括(但不限於)子宮頸上皮細胞(例如，從子宮頸拭子獲得的樣品)、腺樣細胞、肛門上皮細胞、血液、唾液、腦脊髓液、胸水、乳、淋巴、痰及精液。該樣品可包含雙股核酸分子或可包含單股核酸分子。若雙股核酸分子存在時，其可藉由多種在此項技藝中已知之方法(例如，使用鹼、使用蛋白酶K/SDS、離液序列高的鹽(chotropic salt))製備成用於雜交分析。該製備用於雜交分析的雙股核酸分子之方法通常包括將其轉變成單股核酸分子。此方法通常已知為變性。但是，亦考慮到雙股核酸分子可沒有變性而被偵測，例如，經由三股構成體。

在樣品中的標的核酸分子可為DNA或RNA或DNA與RNA二者。該標的核酸分子可被包含在較大的核酸分子內。由本揭示思量可偵測該標的核酸分子或包含該標的核酸分子之較大核酸分子。

該生物樣品可包含子宮頸細胞，特別是人類子宮頸細

胞。該樣品可使用在技藝中已知的任何方法或裝置收集，包括化學惰性的收集裝置，諸如達克隆(Dacron)尖端拭子。可使用其它可接受的收集裝置，包括(但不限於)棉花拭子、子宮頸刷、採集拭子(如達克隆拭子的拭子形，但是以能夠收集更多細胞及較易釋放細胞之耐綸纖維製得)、子宮頸帚、迷你帚、灌洗或經常使用在子宮頸抹片(Pap smear)檢查中之任何收集裝置。

在一個觀點中，該方法包括從年齡超過30歲的女性收集樣品。該方法亦可包括經由子宮頸抹片或可比較的測試從超過30歲的女性收集樣品。藉由子宮頸抹片或可比較的測試收集之樣品可為子宮頸細胞樣品。

一旦樣品收集，其可被放置在樣品管中。可密封管子以防止污染。該收集裝置(拭子、刷子等等)可進一步包含一機械裝置，藉此一旦其在樣品管內時，其可被移動。在一個觀點中，該收集裝置包括一可使用磁鐵移動的塞子。在一個觀點中，此塞子包含金屬。在另一個觀點中，此塞子包含磁性物質。該磁性物質包括順磁性、鐵磁性及反磁性物質。該收集裝置一旦在樣品管內時移動其的一個優點為避免該收集裝置與任何樣品萃取或樣品偵測裝置接觸。該樣品萃取裝置的實施例包括吸量管、自動化吸量器及吸量管管嘴。樣品偵測裝置的實施例包括探針及探針針頭。

樣品管

可使用任何型式的樣品管。該樣品管可有利地被關閉或密封以減少污染。該閉合構造可為永久性或可移除。可

移除的閉合構造之實施例包括壓蓋(snap cap)、螺旋蓋、橡膠翻口塞(rubber septa)、箔及薄膜。該閉合構造可包括一或多個開口或穿孔，其當被刺穿時可再被密封。包含此開口或穿孔的閉合構造之一個優點為，當藉由例如樣品萃取裝置或樣品偵測裝置刺穿時，該閉合構造不會提供無效果。一旦該樣品萃取裝置或樣品偵測裝置經移除，該閉合構造會再度密封，因此減少污染。

生物樣品之儲存

一旦該樣品在樣品管中時，該樣品可藉由一基質乾燥其、或在防腐媒質中、或二者來貯存。藉由壓力乾燥或以化學物質乾燥達成去濕。此移除大部分的水及合適於長時間安定性。再者，該樣品可與一基質(如漏蘆糖)冷凍乾燥(冷凍-乾燥)，以保證樣品的安定性。

已由熟知技藝之人士知曉及明瞭的另一個可能性為該樣品可藉由懸浮在防腐媒質中貯存。該防腐媒質的目的為保護可降解的生物組分。例如，樣品細胞、探針混合物、在捕捉步驟中所使用的抗體：小珠複體及在偵測步驟中所使用的二級抗體全部易受降解影響。在收集初始步驟時的防腐媒質理想地提供樣品安定性及完整性，及會影響在核酸捕捉及偵測方法中的下游步驟。

收集媒質

在一個觀點中，該樣品可被收集及貯存在一收集媒質中。該收集媒質具有一些功能，包括作為防腐媒質以保存核酸及抑制核酸酶以防止核酸在分析前降解。在一個觀點

中，該收集媒質包含至少一種清潔劑。在另一個觀點中，該收集媒質包含至少二種清潔劑、至少三種清潔劑或至少四種清潔劑。在一個觀點中，每種清潔劑不同。在另一個觀點中，該以清潔劑為基礎的收集媒質包含二種不同清潔劑，一種能夠控制背景信號及另一種清潔劑改良磁珠行為(例如，漂移通過一黏的樣品、收集(即，將磁性小珠一起收集在樣品井底部的有多好)及保留(即，當從包含該樣品的容器中移除上層液時，磁性小珠適當停留的有多好))。

在一個觀點中，在該分析的雜交、捕捉及偵測步驟期間使用加熱。甚至隨著清潔劑及施加熱，在分析中所使用的抗體仍然有功能。

第1圖闡明以清潔劑為基礎的收集媒質大大改良能力，以防止磁珠在處理期間損失及漂移(如與標準收集媒質比較)。該以清潔劑為基礎的收集媒質可包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：一、二、三或四或更多種清潔劑。該清潔劑在技藝中已知及可包括(但不限於)陽離子型清潔劑，諸如(但不限於)溴化鯨蠟基吡錠、溴化鯨蠟基三甲基銨(共同已知為十六烷基三甲基銨化合物)及氯化烷基苄基二甲基銨(共同已知為苄烷銨化合物)、及烷基三甲基銨鹽；陰離子型清潔劑，諸如(但不限於)硫酸十二烷基鈉(SDS)及沙空梭(Sarkosyl)；及非變性清潔劑，諸如NP-40；及其它清潔劑。NP-40亦已知為托吉妥(Tergitol)-型式NP-40，其為壬基苯氧基多乙氧基乙醇。NP-40不夠強大到足以打破核膜，但是可打破漿膜。如此，其可使用來獲得細胞培養物

的細胞質內容物。

可使用其它清潔劑及清潔劑組合，及其組合有利地提供控制背景雜訊及改良磁珠行為(當所使用的固體載體包含磁性小珠時)之能力。在某些觀點中，一種清潔劑為陰離子型清潔劑及第二清潔劑為非陰離子型清潔劑。例如，在一個觀點中，非離子與陰離子型清潔劑之組合幫助維持低背景雜訊。在一個觀點中，該以清潔劑為基礎的收集媒質包含陰離子型清潔劑(諸如去氧膽酸鈉，其控制背景雜訊)及NP-40(其改良磁珠行為)。

這二種型式的清潔劑之組合所提供的協同利益超過一起加入二種清潔劑的簡單組合：控制背景雜訊、較好的小珠行為及增加分析速度。這些清潔劑之存在(在以清潔劑為基礎的收集媒質中)提供達成較快的分析結果，但是不會在下游分析步驟期間負面影響核酸或捕捉抗體之能力。

此外，該以清潔劑為基礎的收集媒質改善從收集裝置移出樣品，如該樣品更容易地被溶解。此外，該以清潔劑為基礎的收集媒質改善樣品的均勻性(與其它收集媒質(諸如(但不限於)普利熱塞(Preservcyt)(使用40%的甲醇溶液)、STM(使用離液劑)及醇)比較)。該以清潔劑為基礎的收集媒質亦減低樣品在混合(手動或自動化)後之黏度。

NP-40在收集媒質中的濃度範圍可從約0.5%至約2.0%、從約0.1%至約1.0%、和在所敘述的範圍內之任何數值。在某些觀點中，NP-40的存在濃度從約0.8%至約1.5%、從約0.9%至約1.2%及在某些觀點中為約1.0%。在另一個觀

點中，NP-40的存在濃度從約0.1%、約0.2%、約0.3%、約0.4%、約0.5%、約0.6%、約0.7%、約0.8%、約0.9%、約1.0%、約1.1%、約1.2%、約1.3%、約1.4%、約1.5%、約1.6%、約1.7%、約1.8%、約1.9%或約2.0%。去氧膽酸鈉在收集媒質中的濃度範圍可從約0.10%至約0.40%、從約0.20%至約0.30%、和在所敘述的範圍內之任何數值。在一個觀點中，去氧膽酸鈉的濃度為約0.10%、約0.15%、約0.20%、約0.25%、約0.30%、約0.35%或約0.40%。

該以清潔劑為基礎的收集媒質可包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：緩衝劑、二種清潔劑、螯合劑及防腐劑。該緩衝劑可為Tris-HCl，其濃度從約25 mM至約75 mM、從約30 mM至約60 mM、從約40 mM至約50 mM及從約45 mM至約55 mM、和在所敘述的範圍內之任何數值。該緩衝劑亦可為濃度約25 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM、約50 mM、約55 mM、約60 mM、約65 mM、約70 mM或約75 mM的Tris-HCl。

可使用任何防腐劑及其選擇可依諸如想要的功能、最小副作用、成本等等因素而定。合適的防腐劑包括慶大黴素(gentomycin)、普羅克林(ProClin)、戴莫梭(dimersol)及疊氮化鈉。該防腐劑在收集媒質中的濃度依諸如防腐劑型式、其效力、其副作用等等因素而定。例如，對疊氮化鈉來說，該疊氮化鈉的濃度範圍可從約0.01%至約0.1%、從約0.025%至約0.075%及從約0.04%至約0.06%、和在所敘述的範圍內之任何數值。該防腐劑(例如，疊氮化鈉)亦可以約

0.01%、約0.02%、約0.03%、約0.04%、0.05%、約0.06%、約0.07%、約0.08%、約0.09%或約0.10%存在。

在一個觀點中，該以清潔劑為基礎的收集媒質包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：1.0%的NP-40、0.25%的去氧膽酸鈉、50 mM的Tris-HCl、25 mM的EDTA、150 mM的NaCl及0.09%的疊氮化鈉。在另一個觀點中，該以清潔劑為基礎的收集媒質包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：約0.5%至約2.0%的NP-40、約0.10%至約0.40%的去氧膽酸鈉、約25 mM至約75 mM的Tris-HCl、約10 mM至約50 mM的EDTA、約50 mM至約200 mM的NaCl及約0.01%至約0.10%的疊氮化鈉。在其它觀點中，該以清潔劑為基礎的收集媒質包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：約0.8%至約1.5%的NP-40、約0.20%至約0.40%的去氧膽酸鈉、約30 mM至約60 mM的Tris-HCl、約20 mM至約40 mM的EDTA、約100 mM至約200 mM的NaCl及約0.025%至約0.075%的疊氮化鈉。在更另一個觀點中，該以清潔劑為基礎的收集媒質包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：約0.9%至約1.2%的NP-40、約0.20%至約0.30%的去氧膽酸鈉、約30 mM至約60 mM的Tris-HCl、約20 mM至約30 mM的EDTA、約100 mM至約150 mM的NaCl及約0.04%至約0.06%的疊氮化鈉。

在一個觀點中，該收集媒質包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：NP-40及EDTA。在另一個觀點中，該收集媒質包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：

NP-40、EDTA及疊氮化鈉。在一個觀點中，該收集媒質包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：去氧膽酸鈉、EDTA及疊氮化鈉。在一個觀點中，該收集媒質包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：NP-40、去氧膽酸鈉、EDTA及疊氮化鈉。在一個觀點中，該收集媒質包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：NP-40、去氧膽酸鈉、Tris-HCl、EDTA及疊氮化鈉。

在另一個觀點中，該收集媒質包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：0.5%至約2.0%的NP-40及10 mM至約50 mM的EDTA。在另一個觀點中，該收集媒質包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：0.5%至約2.0%的NP-40、10 mM至約50 mM的EDTA及約0.01%至約0.10%的疊氮化鈉。在一個觀點中，該收集媒質包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：約0.10%至約0.40%的去氧膽酸鈉、10 mM至約50 mM的EDTA及約0.01%至約0.10%的疊氮化鈉。在一個觀點中，該收集媒質包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：約0.5%至約2.0%的NP-40、約0.10%至約0.40%的去氧膽酸鈉、10 mM至約50 mM的EDTA及約0.01%至約0.10%的疊氮化鈉。在一個觀點中，該收集媒質包含下列、基本上由下列組成或由下列組成：約0.5%至約2.0%的NP-40、約0.10%至約0.40%的去氧膽酸鈉、約25 mM至約75 mM的Tris-HCl、約10 mM至約50 mM的EDTA及約0.01%至約0.10%的疊氮化鈉。

在一個觀點中，該收集媒質為一種非離液型媒質。也

就是說，例如，該收集媒質不包含離液型媒質或離液序列高的鹽。不欲限制，在一個觀點中，該收集媒質不包含胍鹽酸或尿素。使用非離液型收集媒質的潛在優點為樣品較好再懸浮、測試更可再現及測試液份更均勻(相對於包含離液型媒質或離液序列高的鹽之媒質)。

使用以清潔劑為基礎的收集媒質之優點為其保存樣品的安定性。貯存在以清潔劑為基礎的收集媒質中的樣品(如所揭示)安定至少31天，及當保持在溫度從15°C至33°C下時安定至少21天。在一個觀點中，樣品當在以清潔劑為基礎的收集媒質中於-20°C下冷凍時，其安定至少六個月。在另一個觀點中，子宮頸細胞樣品當保持在溫度從15°C至33°C下時安定至少31天、至少21天；及在以清潔劑為基礎的收集媒質中於-20°C下至少6個月。

該以清潔劑為基礎的收集媒質亦導致改良在嚴格的雜交及捕捉條件(例如，在溫度65°-75°間)下之分析性能(相對於包含變性劑的收集媒質)。

存在一、二、三、四或更多種清潔劑可減低樣品黏度，其輔助從液相中移除磁性小珠和輔助樣品混合。

在一個觀點中，可收集樣品(諸如血液或片狀剝落的子宮頸細胞樣本)及將其懸浮在以清潔劑為基礎的收集媒質中。該樣品可以化學惰性的收集裝置(諸如達克隆尖端拭子)收集。可使用任何其它合適的拭子，諸如耐綸纖維拭子。該樣品可貯存在以清潔劑為基礎的收集媒質中，以防止核酸在分析前降解及維持樣品安定性。

可以其它已知的收集媒質來收集樣品，然後可使用在本文所描述的方法中。其它收集媒質之實施例包括普利熱塞、蘇雷佩斯(SurePath)、DCM(狄金(Digene)收集媒質)，及STM(樣品/樣本運送媒質)。某些收集媒質具核酸特定。例如，當該標的核酸為RNA時，不使用DCM。收集在這些媒質某些中的樣品可在偵測及分析於樣品中的核酸前需要處理。多種處理樣品的方法(亦已知為製備該樣品)在技藝中已知。例如，收集在用於細胞學分析的媒質(諸如普利熱塞)中之子宮頸細胞樣品可與以清潔劑為基礎的溶解緩衝液結合，接著加入包含核酸結合表面的磁性小珠。此外，收集在其它已知通常可獲得的收集媒質中之其它細胞樣品可與以清潔劑為基礎的溶解緩衝液結合，接著加入包含核酸結合表面之磁性小珠。

預處理

在一個觀點中，該分析不包括樣品預處理製備步驟。在另一個觀點中，當使用以清潔劑為基礎的收集媒質時，該分析不包括樣品預處理製備。例如，當該以清潔劑為基礎的收集媒質包含下列、基本上由下列組成或由下列組成時，不需要樣品預處理製備：約0.5%至約2.0%的NP-40、約0.10%至約0.40%的去氧膽酸鈉、約25 mM至約75 mM的Tris-HCl、約10 mM至約50 mM的EDTA、約50 mM至約200 mM的NaCl及約0.01%至約0.10%的疊氮化鈉。亦考慮到該等組分之任何組合。

在另一個觀點中，當使用普利熱塞或蘇雷佩斯作收集

媒質時，該分析可包括一預樣品處理製備步驟。該預處理可手動或可自動化地完成。

自動化預處理機器的一個實施例為採用來處理生物樣品之預分析系統(Pre-Analytic System)(PAS)工具，其包括讓液基細胞學(LBC)樣品進入包含經萃取的樣品核酸之標準96井板中。在PAS中，樣品在八試管的長條(稱為萃接管單位(ETU))中處理。每個ETU與96井板的一列相應。在一個觀點中，該系統的生產量為約35分鐘完成第一ETU且以約2分鐘區間完成隨後的ETU。

為了滿足生產量需求，該工具可以並聯方式處理ETU。在該處理完成前，每個ETU通過10個步驟。這些步驟以類似步驟來歸納而產生六個處理模組，由該站的字母鑑別。ETU在六個站間藉由六軸自動控制裝置以約二分鐘區間移動。因為培養時間，某些步驟需要ETU保持在該站多於約二分鐘。於此實例中，在該站中提供額外的場所以考慮到先進先出的製程。

PAS可包含數種構件，諸如：1)ETU運送機制；2)ETU及ETU夾；3)用來吸引順磁性小珠的磁鐵站；及4)吸量器站，其將濃核酸從ETU轉移至板。該PAS可在少於5小時內從液基細胞學樣品產生最高十個經萃取的DNA之96井板，用於隨後在經設計來進行該用來測量標的核酸分子存在之方法的工具中之分析。PAS經設計，以解決來自液基細胞學測試之萃取DNA的某些現在挑戰，包括所需要的樣品體積(4毫升)、有限的自動化及手動樣品轉變協定的低生產量。

標的核酸分子

該標的核酸分子包括(不欲限制)在樣本或培養物(例如，細胞、微生物及病毒培養物)(包括生物及環境樣品)中找到之核酸分子。該標的核酸分子可在來自動物，包括人類、流體、固體(例如，糞)或組織；和液體與固體食物及飼料產物及原料，諸如奶製項目、蔬菜、肉及肉副產物；及廢棄物的生物樣品中找到。該標的核酸分子可在環境樣品及包括環境物質，諸如表面物質、土壤、水及工業樣品；和從食物及奶製品加工工具、裝置、設備、器皿、可棄換式及非可棄換式的項目所獲得之樣品中找到。

該標的核酸分子在生物樣品中找到，包括(但不限於)子宮頸樣品(例如，從子宮頸拭子獲得的樣品)或子宮頸細胞樣品、腺樣細胞、肛門上皮細胞、血液、唾液、腦脊髓液、胸水、乳、淋巴、痰、尿及精液。該標的核酸分子可來自其它病毒、細菌、分枝桿菌或瘧原蟲，例如巨細胞病毒(CMV)、疱疹、HIV、H1N1、衣原體、淋病、陰道毛滴蟲(*Trichomonas vaginalis*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、結核病、SARS相關的冠狀病毒或流行性感冒。在一個觀點中，該標的核酸分子與下列之任何一種相結合的核酸分子有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少98%、至少99%或100%相同：子宮頸樣品(例如，從子宮頸拭子獲得的樣品)或子宮頸細胞樣品、腺樣細胞、肛門上皮細胞、血液、唾液、腦脊髓液、胸水、乳、淋巴、痰、尿及精液、其它

病毒、細菌、分枝桿菌或瘧原蟲，例如巨細胞病毒(CMV)、疱疹、HIV、H1N1、衣原體、淋病、淋病雙球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)(GC)、沙眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)(CT)、陰道毛滴蟲、金黃色葡萄球菌、結核病、SARS相關的冠狀病毒或流行性感冒。

在一個觀點中，該標的核酸分子為人乳頭瘤病毒(HPV)及包括HPV的基因變異株。該變異株包括同質多形體、突變體、衍生物、經改質、改變或其類似形式之標的核酸。在一個觀點中，該標的核酸為HPV核酸。在另一個觀點中，該HPV核酸為高風險HPV型式的HPV DNA。在另一個觀點中，該HPV核酸為高風險HPV型式的HPV RNA。在另一個觀點中，該標的核酸為高風險HPV型式16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68及82之任何一種或低風險HPV型式6、11、40、43、53、61、67、69、70、71、72、81及83之任何一種。

在另一個觀點中，該標的核酸分子有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少98%、至少99%或100%與下列之任何一種相結合的核酸分子相同：HPV、HPV的基因變異株、高風險HPV型式的HPV DNA或高風險HPV型式的HPV RNA。在另一個觀點中，該標的核酸有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少98%、至少99%或100%與下列相結合的核酸分子相同：高風險HPV型式16、18、26、31、33、35、39、45、51、

52、56、58、59、66、68及82之任何一種或低風險HPV型式6、11、40、43、53、61、67、69、70、71、72、81及83之任何一種。

使用本發明之方法，該標的核酸分子可以每毫升少於約1皮克、每毫升少於約0.75皮克、每毫升少於0.5皮克、每毫升少於0.25皮克及甚至低如每毫升0.2皮克的濃度存在。如在第2圖中看見，當使用HPV-16 DNA作為標的核酸分子且以濃度每毫升0.2皮克存在時，可獲得優良的信號對雜訊比率。

如先前提到，該標的核酸分子可為DNA或RNA。當該標的核酸分子為DNA時，該探針為RNA較佳；及當該標的核酸為RNA時，該探針為DNA較佳。但是，可使用DNA探針與DNA標的核酸分子及可使用RNA探針與RNA標的核酸分子。亦如先前指示出般，該標的核酸分子可決定所使用的收集媒質。

變性

在如上所述之以清潔劑為基礎的收集媒質中收集樣品後，該樣品可以變性試劑處理，以提供可進入雜交的標的核酸分子。在一個觀點中，該樣品以鹼性溶液變性。可使用任何可將溶液的pH帶至約pH 12、約pH 13或約pH 14的鹼。額外的是，可使用任何可將溶液的pH帶至範圍約pH 12至約pH 13、從約pH 12至約pH 14及從約pH 13至約pH 14的鹼。合適的鹼濃度包括從約1.0 N至約2.0 N、從約1.25 N至約1.75 N、及從約1.25 N至約1.5 N、及約1.5 N、和在所敘

述的範圍內之任何數值。不欲限制，合適的鹼包括NaOH及KOH。

在一個實施例中，可以約半體積1.75 N的NaOH溶液處理大約一體積懸浮在以清潔劑為基礎的收集媒質中之樣品。例如，在某些觀點中，從懸浮在以清潔劑為基礎的收集媒質中之樣品移出大約50微升液份，及將大約25微升1.75 N的NaOH溶液加入至該50微升樣品液份。該經變性試劑處理的樣品可藉由手動混合或機械搖晃在約800 rpm、約900 rpm、約1000 rpm下、在約600至約1000 rpm間、或在約600至1200 rpm間混合。在一個觀點中，該樣品的pH在加入變性試劑後可為約14。在另一個觀點中，該pH可為約pH 12或pH 13。此鹼性pH將二者逮捕及變性在樣品中的多數核酸。此外，鹼性處理可中斷在胜肽與核酸間之交互作用，以改良標的核酸的可存取性及降解蛋白質。

蛋白質的鹼性處理有效地均質化該樣本，以對所提供的樣品保證分析結果之再現能力。其亦可減低樣品黏度以增加動力學、均質化樣品及藉由破壞任何在樣品中的內生性單股RNA核酸、DNA-RNA雜交物或RNA-RNA雜交物來減低背景。其亦幫助可存在於樣品中的酵素(諸如RNA酶類及DNA酶類)失活。熟知技藝之人士將察知，若RNA為標的核酸(如與DNA相反)時，不同試劑可較佳，包括(但不限於)酚萃取及TCA/丙酮沉澱、及胍鹽硫氰酸鹽-酚-氯仿萃取。

可使用其它變性方法，諸如使用加熱步驟，例如，將樣品加熱至約95°C以分離核酸的股。同樣可使用酵素，諸

如解旋酶。該油可為聚矽氧油。在一個具體實例中，在加熱前將油或油型式物質加入至樣品。此油可具有黏度約5 cSt。加入油的一個優點為樣品被更均勻地加熱。

在一個觀點中，將1.5 N至2.0 N的NaOH加入至樣品及加熱。在另一個觀點中，將1.75 N的NaOH加入至樣品及加熱。該樣品與變性試劑可加熱至約60°C至約80°C約30分鐘、至約65°C至約75°C約30分鐘、至約67°C至約70°C約30分鐘、或至約70°C約30分鐘、或在所敘述的範圍內之任何數值。在另一個觀點中，該樣品與變性試劑加熱至約60°C至約80°C約20至約40分鐘、或至約65°C至約75°C約20至約40分鐘、至約67°C至約70°C約20至約40分鐘、或至約70°C約30分鐘、或在所敘述的範圍內之任何數值。所描述的時間及溫度條件之目的為提供樣品在最小量的時間內有最大的變性，同時將標的核酸遺留在合適於進行雜交、捕捉、清洗及偵測之剩餘步驟的條件下。因此，樣品可在變性試劑中加熱約5至約120分鐘、約10至約60分鐘、約20分鐘至約40分鐘、約30分鐘、或在所敘述的範圍內之任何數值。將由一般技藝人士容易地了解，可調整而使用在較低的溫度下培養較長的時期或在較高的溫度下培養較短的時期，以對描述於本文的條件提供類似效應。

探針之雜交及結合

在變性該包含核酸之樣品後，在足以讓一或多種多核苷酸探針雜交至在樣品中的標的核酸之條件下，讓其與一或多種多核苷酸探針接觸，以形成一雙股核酸雜交物。該

探針可為全長、截斷或合成的DNA或全長、截斷或合成的RNA。若該標的核酸為DNA時，則該探針可為RNA；及若該標的核酸為RNA時，則該探針可為DNA。在探針稀釋劑(其亦可作用為中和雜交緩衝液，以中和該鹼性變性試劑)中稀釋該一或多種多核苷酸探針較佳。

該使用於DNA或RNA探針的探針稀釋劑將由於對DNA與RNA安定性所需要的需求不同而不同。例如，若該探針為RNA時，首先中和該樣品，然後加入探針較佳；或此外，同時將RNA探針與中和劑(探針稀釋劑)加入至樣品(因為NaOH可破壞RNA)。該探針稀釋劑可使用來溶解及稀釋該探針，及亦幫助將樣品恢復至約中性pH(例如，約pH 6至約pH 9)，以提供更適合於雜交的環境。可使用足夠的探針稀釋劑體積(樣品體積的一半較佳)來中和該經驗處理的樣品。

在一個觀點中，該探針稀釋劑包含緩衝劑、聚丙烯酸、NaOH及疊氮化鈉。該探針稀釋劑可包含醋酸。在一個觀點中，該探針稀釋劑包含2.2 M的BES(N,N-雙(2-羥乙基)-2-氨基乙烷磺酸)、2.6%的聚丙烯酸(PAA)、0.7 N的NaOH及0.09%的疊氮化鈉。該探針稀釋劑可包含從約1.2 M至約2.6 M的BES、從約1.5 M至約2.5 M的BES、從約1.75 M至約2.25 M的BES、從約2 M至2.4 M的BES或約2.2 M的BES、和在所敘述的範圍內之任何數值。在一個觀點中，該探針稀釋劑可包含從約2%至約3.0%的PAA或在所敘述的範圍內之任何數值。在另一個觀點中，該PAA濃度從約2.2%至約2.7%。

在更另一個觀點中，該PAA濃度為約2.6%。在進一步觀點中，該探針稀釋劑可包含從約0.6 N至約0.8N的NaOH，例如，約0.7 N的NaOH。當BES的量增加時，NaOH的濃度通常增加。

該探針稀釋劑具有一黏度，其准許藉由自動吸量管吸取技術準確給料。換句話說，調整該探針稀釋劑的黏度，使得可準確及自動地吸出想要的體積。若黏度太低時，該探針稀釋劑無法形成穩定的液滴。另一方面，若黏度太高時，該探針稀釋劑滴將太大。當此滴進入樣品管中時，其可造成已經在樣品管中的內容物明顯干擾(例如，濺污樣品管壁)。

對全長探針來說，可將熱鹼性溶液加入至樣品，然後可在室溫下將探針稀釋劑加入至樣品，然後可再加熱該樣品。此方法可抑制二級結構形成。抗體趨向於不可逆地結合至含有二級結構的結構。當使用非全長探針(諸如截斷或合成的探針)時，可不需要加熱該溶液或樣品，因為不存在二級結構問題。在一個觀點中，當與截斷或合成的探針使用時，不加熱樣品。

在以變性試劑處理後，可在允許探針與標的核酸發生雜交或結合之適當條件下，將一中和緩衝液的液份(在一個觀點中，所描述已溶解一或多種探針的探針稀釋劑)加入至樣品。該中和緩衝液可包含一單緩衝鹽。在一個觀點中，該中和緩衝液不包含多於一種單緩衝鹽。該雜交條件足以允許一或多種多核苷酸探針黏著至在樣品中之相應的互補

核酸序列(若存在時)，以形成一雙股核酸雜交物。

使用合適於在本文中所描述的特別探針及稀釋劑之雜交條件。例如，可培養該探針及樣品核酸一段雜交時間，至少約5至約30分鐘較佳、約5至約20分鐘、或從約7至約15分鐘、或約10分鐘、和在所敘述足以允許一或多種多核苷酸探針黏著至相應的互補核酸序列之範圍內的任何數值。該雜交條件可包括雜交溫度至少約65°C、約68.5°C、及約67°C至約70°C、和在所敘述的範圍內之任何數值。對所提供的標的核酸及所提供的探針來說，一般技藝人士可容易地藉由例行的實驗決定想要的雜交條件。一般技藝人士將進一步察知必需最佳化雜交時間及溫度(其彼此相關)。因此，較高的雜交溫度可進行較短的時間，反之亦然。不欲限制，可藉由增加溫度、增加離子條件至大於0.5 M(例如，NaCl)或減低PAA濃度來控制嚴謹的雜交條件。至於非為限制的實施例，嚴謹的雜交條件可包括在高溫下進行雜交反應，諸如至少約65°C、至少約68.5°C、在約67°C至約70°C間及在約69°C至約70°C間。嚴謹的雜交條件亦可包括高溫，諸如至少約65°C、至少約68.5°C及在約67°C至約70°C間。

在非為限制的觀點中，該探針能雜交或結合至與下列相結合的核酸分子有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少98%、至少99%或100%相同的核酸分子：HPV、HPV的基因變異株、高風險HPV型式的HPV DNA或高風險HPV型式的HPV

RNA、或高風險HPV型式16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68及82之任何一種或低風險HPV型式6、11、40、43、53、61、67、69、70、71、72、81及83之任何一種。在另一個觀點中，該探針與下列互補：HPV、HPV的基因變異株、高風險HPV型式的HPV DNA、高風險HPV型式的HPV RNA、或高風險HPV型式16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68及82之任何一種或低風險HPV型式6、11、40、43、53、61、67、69、70、71、72、81及83之任何一種。

在一個觀點中，將該樣品懸浮在以清潔劑為基礎的收集媒質中，以變性試劑來變性標的核酸及雜交至已懸浮在中和緩衝液中的核酸探針。在另一個觀點中，該中和緩衝液為本發明之探針稀釋劑。該探針稀釋劑可包含2.2 M的BES(N,N-雙(2-羥乙基)-2-胺基乙烷磺酸)、2.6%的聚丙烯酸、0.7 N的NaOH及0.09%的疊氮化鈉。

捕捉

在允許探針雜交至標的核酸分子及形成一雙股核酸雜交物後，該雜交物由一對該雙股核酸雜交物特定之分子捕捉。對該雙股核酸雜交物特定的分子包括(但不限於)單株抗體、多株抗體、蛋白質(諸如(但不限於)核糖核酸酶H)、核酸(包括(但不限於)適合體(aptamers)或序列特定的核酸)。適合體為無規序列的短伸展體(short stretches)，其藉由雜交至標的，放大該經雜交的適合體及重覆該選擇方法成功地選自於序列資料庫。在一個觀點中，該對雙股核酸雜交物特

定的分子由抗體(已知為抗雜交物抗體)捕捉。

在一個觀點中，使用在技藝中的標準技術將第一抗雜交物抗體固定到一載體上。合適的載體之實施例包括共價連結或吸附，例如，蛋白質-蛋白質交互作用、蛋白質-G小珠、生物素-抗生蛋白鏈菌素交互作用、EDAC以連結至羧基或甲苯磺醯基等等；或使用例如序列特定的核酸在親和力管柱中直接雜交到固體載體上。

該載體包括(但不限於)小珠、磁性小珠(其如先前指示出般包括順磁性、反磁性、鐵磁性及反磁性小珠)、管柱、板、濾紙、聚二甲基矽氧烷(PDMS)及量桿。可使用任何載體，只要其允許液相之萃取及提供分離出結合與未結合的抗體之能力。磁性小珠特別有用，其中它們可被遺留在溶液中，且若施加磁場來固定小珠時，該液相可被萃取或傾出。小且具有高表面積的小珠較佳，諸如直徑約1微米的小珠。同樣可使用其它使用電荷切換或二氧化矽捕捉(如與磁場相反)的小珠。

以已接附至載體的抗雜交物抗體來培養雜交物足夠的時間量，以允許該雙股核酸雜交物由被固定的抗雜交物抗體捕捉。在一個觀點中，該載體為小珠。

該抗雜交物抗體可為單株或多株。在一個觀點中，該抗體為單株。在一個觀點中，該抗體藉由1-乙基-3-[3-二甲基胺基丙基]碳化二醯亞胺鹽酸(EDAC)連結劑耦合至載體。在一個觀點中，該載體為聚苯乙烯小珠。在一個觀點中，在小珠稀釋緩衝液中稀釋該已耦合至抗體的載體或小

珠。該小珠稀釋緩衝液在減少於小珠上蛋白質變性上有幫助。小珠稀釋緩衝液的一個實施例包含6%的酪蛋白、100 mM的Tris-HCl、300 mM的NaCl及0.09%的疊氮化鈉。

在一個觀點中，在約67°C至約70°C下，以該樣品培養經該抗雜交物抗體塗佈的小珠約30分鐘。在另一個觀點中，在約68°C至約69°C下培養該小珠及樣品約30分鐘。在更另一個觀點中，在約68.5°C下培養該小珠及樣品30分鐘。培養時間的範圍可從約5分鐘至約60分鐘、從約15分鐘至約45分鐘、從約20分鐘至約40分鐘或在所敘述的範圍內之任何數值，及通常與溫度呈反比。將由熟習該項技術者了解，可改變培養時間、溫度及/或搖晃條件來達成另一種如想要的捕捉動力學。

在如上所述之捕捉標的核酸/探針雜交物後，該被捕捉的雜交物可藉由清洗掉未被捕捉的核酸與剩餘樣品而分離。

結合

在該方法中的另一個步驟可包括提供一第二抗體，其亦對雙股核酸雜交物特定或此外對第一抗體特定。該第二抗體可經可檢測地標記(直接或間接)，及可為單株或多株抗體。在一個觀點中，該第二抗體為單株。在另一個觀點中，該第二抗體直接以可偵測的標誌標記及為單株。該第二抗體使用來偵測雙股核酸雜交物之存在。在一個觀點中，該第二抗體具有一標籤，其必需與一基質反應以提供一可被偵測的信號。該第二抗體可溶解在合適的緩衝液中。在一

個觀點中，該緩衝液包含100 mM的TrisHCl、pH 7.4、0.5 M的NaCl、0.1 mM的ZnCl₂、1.0 mM的MgCl₂、0.25%的屯(Tween)20、0.2毫克/毫升的核糖核酸酶A、4%的羥丙基-β-環糊精(環糊精)、30%的小珠稀釋緩衝液(如先前討論)、0.05%的山羊IgG、0.09%的疊氮化鈉。在一個觀點中，該結合反應在室溫下發生。在另一個觀點中，該結合反應在約37°C、約45°C或約50°C下進行。在一個觀點中，該結合反應在約37°C、約45°C或約50°C下、在35°C至約40°C間、在40°C至約50°C間進行在約20分鐘至40分鐘間。在一個觀點中，該結合反應在約37°C、約45°C或約50°C下進行在約20分鐘至40分鐘間。在另一個觀點中，該結合反應在約45°C下進行約30分鐘。

將由熟習該項技術者了解，可使用任何可偵測的標籤，諸如(但不限於)酵素、放射性分子、螢光性分子或金屬粒子(諸如黃金粒子)。在某些觀點中，該可偵測的標籤為鹼性磷酸酶。將標籤結合至抗體的方法已知。例如，抗體可以二硫蘇糖醇(DTT)還原，以產生單價抗體片斷。然後，該經還原的抗體可藉由下列方法直接結合至經順丁烯二酸酯化的鹼性磷酸酶：石川(Ishikawa)等人，免疫學檢定法期刊(J. Immunoassay)4：209-237(1983)及明思(Means)等人，Chem. 1：2-12(1990)，其每篇的內容全文以參考之方式併入本文；及所產生的結合物可藉由HPLC純化。該結合物亦可使用任何型式的尺寸排除色層分析法純化。純化的一個利益為一蛋白質對一抗體之結合物可與具有其它蛋白質對

抗體比率的那些結合物分離。

在另一個觀點中，該雙股核酸雜交物可以未直接標記的第二抗雜交物抗體偵測。例如，該第二抗體可為老鼠免疫球蛋白，其藉由經標記的山羊抗老鼠抗體偵測。

清洗

在與該第二抗體結合後，使用基礎的清洗緩衝液清洗該樣品。該清洗緩衝液可包含一或多種清潔劑或可無清潔劑。若該清洗緩衝液包含一清潔劑時，該清潔劑可為離子或非離子型清潔劑。非離子型清潔劑的一個實施例為崔通 (Triton)-X。該清潔劑可以下列濃度存在於該清洗緩衝液中：約0.05%至約1.5%、或從約0.075%至約1.0%、或從約0.1%至約0.75%、或約0.5%、或在所敘述的範圍內之任何數值。合適的清洗緩衝液之一個實施例包含40 mM的Tris、pH 8.2、100 mM的NaCl、0.5%的崔通-X 100及0.05%的疊氮化鈉。

該樣品可以該清洗緩衝液清洗一至十次、或從三至七次、或從四至六次、或五次、或在所敘述的範圍內之任何數值。在一個觀點中，以二種不同的清洗緩衝液清洗該樣品至少四次。在另一個觀點中，清洗該樣品至少四次，其中三次清洗以一種緩衝液進行及另一次清洗步驟以不同緩衝液進行。該樣品亦可以單一清洗緩衝液或以多種清洗緩衝液清洗。每次清洗可使用相同清洗緩衝液或不同清洗緩衝液。例如，可對一次清洗使用含清潔劑的清洗緩衝液，同時可對另一次清洗使用無清潔劑的清洗緩衝液。在一個

觀點中，該清洗緩衝液之一不包含崔通。

該含清潔劑的清洗緩衝液之一個利益為在小珠行為上的正效應(當與無清潔劑的清洗緩衝液比較時)。該含清潔劑的清洗緩衝液允許快速、有效率及恢復小珠對磁場之結合。小珠對磁場之結合足夠強，使得小珠透過物理逆轉保持結合及傾出。同時無清潔劑的清洗緩衝液通常不允許物理逆轉而沒有小珠損失，它們可使用於其它目的。使用無清潔劑的清洗緩衝液之一個實施例為移除或稀釋在該樣品中的清潔劑，因此減低任何可能的偵測問題。

偵測

偵測存在於該第二、或第三、或更多抗體上的標籤，以因此指示出標的核酸分子存在。用來偵測多種標籤的方法在技藝中已知。例如，由考特利(Coutlee)等人，J. Clin. Microbiol. 27: 1002-1007(1989)(其內容全文以參考之方式併入本文)所描述之比色法、放射性、表面電漿共振或化學發光方法。

例如，可藉由化學發光，以諸如LUMI-PHOS 530試劑(MI之底特律(Detroit)的魯米君(Lumigen))或DR2(CA之福斯特市(Foster City)的應用生物系統(Applied Biosystems))之試劑，使用諸如E/LUMINA冷光儀(CA之加登葛魯夫(Garden Grove)的來源科學系統公司(Source Scientific Systems, Inc.))、歐脫康 I 冷光儀(Optocomp I Luminometer)(CT之黑姆登(Hamden)的MGM設備(MGM Instruments))或其類似設備(諸如吞拿生物系統(Turner

Biosystems)之飛瑞特斯微板冷光儀(Veritas Microplate))之偵測器，來偵測結合的鹼性磷酸酶結合物。在一個觀點中，可使用螢光儀來偵測該結合物。亦可串聯或並聯使用多種偵測技術。例如，可藉由化學發光及螢光性偵測該結合物。在另一個觀點中，可藉由化學發光偵測該結合物。

使用不同用於結合物之偵測技術的偵測器可例如以模組化方式，可逆或不可逆地連接至一能進行該用來測量存在於樣品中的標的核酸分子之方法的機器。

如於本文中所描述，偵測到在該第二抗體上的標籤為於該樣品中存在有與該一或多種探針互補之一或多種標的核酸分子之象徵。在清洗後，將該樣品懸浮在例如包含用於在該第二抗體上的標籤之基質的偵測緩衝液中。

在一個觀點中，該樣品由子宮頸細胞組成。該用來測量存在於子宮頸細胞樣品中的標的核酸分子之方法包括將該樣品懸浮在以清潔劑為基礎的收集媒質中及藉由手動混合來混合。在另一個觀點中，該混合為機械式。移出大約50微升液份的樣品及與約25微升的變性試劑混合。藉由手動混合或機械搖晃(在約600至約1200 rpm間)混合該樣品約30至約60秒，及在約70°C下加熱約30分鐘。在一稀釋劑中製備高風險HPV RNA探針及將其稀釋至約375奈克/毫升。在70°C的加熱區塊上，將約40微升的稀釋探針加入至樣品。進一步在大約68.5°C下培養樣品，伴隨著在約1150 rpm下搖晃約30分鐘。可藉由滴管瓶或其它低技術裝置移除上層液。將約35微升的偵測試劑加入至樣品。該偵測試劑包

含經標記的第二抗體。該第二抗體對雙股核酸雜交物特定。在約45°C下培養包含該偵測試劑之樣品約30分鐘，放置在磁性架子上約30秒至3分鐘及傾出上層液。在另一個觀點中，在室溫下培養該包含偵測試劑的樣品。然後，以清洗緩衝液清洗該樣品約四或五次。

抗雜交物抗體

根據本發明所形成的雙股核酸雜交物可使用對雙股核酸雜交物特定的抗體捕捉及偵測。該抗體對雙股雜交物特定，諸如(但不限於)RNA-DNA、DNA-DNA、RNA-RNA及其模仿物，其中模仿物指為行為類似於RNA-DNA、DNA-DNA或RNA-RNA雜交物之分子。該抗雙股核酸雜交物抗體(即，所使用的抗雜交物抗體)將依所形成的雙股核酸雜交物型式而定。在一個觀點中，該抗雜交物抗體對RNA-DNA雜交物具免疫特異性。

將由熟習該項技術者了解，在如下列描述之本分析中可使用多株或單株抗雜交物抗體及/或將其耦合至小珠及/或固定在載體上。可使用該使用標準技術所製備的單株抗體取代多株抗體。單株抗體可藉由在技藝中標準的方法製造。在一個觀點中，使用於該標的核酸之捕捉及偵測的抗體為單株抗體。在一個觀點中，單株抗體支援在捕捉步驟期間的高嚴格培養溫度。不欲限制，在捕捉步驟期間的高嚴格培養溫度可在約65°至約75°C間或在約68°至約75°C間。該用來捕捉及偵測的第一及第二抗體可相同(即，藉由相同雜交骨髓瘤細胞株製造)，或可不同及藉由不同雜交骨

髓瘤細胞株製造。在一個觀點中，該使用來捕捉及/或偵測的第一及第二單株抗體相同且對RNA-DNA雜交物特定。亦包括對雙股雜交物特定的抗體之免疫片斷或衍生物，其中此些片斷或衍生物包括該抗體之結合區域。

例如，可使用來自己融合至脾細胞(其已以RNA-DNA雜交物免疫)的骨髓瘤細胞之單株抗RNA-DNA雜交物抗體。該雜交物特定的抗體可藉由對著已固定在固體載體上的RNA-DNA雜交物之親和力純化來純化，例如，如描述在北我(Kitawaga)等人，*Mol. Immunology*，19：413(1982)；及美國專利案號4,732,847中，其每篇的內容全文以參考之方式併入本文。

可使用其它合適的製造或分離抗體(包括人類或人造抗體)方法，包括例如從資料庫選擇重組抗體(例如，單鏈F_v或F_{ab}、或其其它片斷)，或依賴能製造人類抗體譜的基因轉殖動物(例如，老鼠)之免疫作用的方法(參見例如，賈扣波維次(Jakobovits)等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，90：2551(1993)；賈扣波維次等人，*自然*，362：255(1993)；及美國專利案號5,545,806及美國專利案號5,545,807，其每篇的內容全文以參考之方式併入本文)。

在一個觀點中，欲偵測的標的核酸為DNA(例如，HPV基因組DNA或cDNA)或RNA(例如，mRNA、核糖體RNA、核RNA、傳送RNA、病毒RNA、異質性核RNA)，其中該一或多種多核苷酸探針各別為多核糖核苷酸或多去氧核糖核苷酸。在較佳的觀點中，該雙股核酸雜交物為藉由標的DNA

與探針RNA雜交所形成之DNA-RNA雜交物，及可使用對RNA-DNA雜交物具免疫特異性之抗體來偵測。

在本發明之觀點中，使用來自雜腫瘤細胞株的單株抗RNA-DNA雜交物抗體。此雜腫瘤細胞株描述在美國專利案號4,865,980、美國專利案號4,732,847及美國專利案號4,743,535中，其每篇的內容全文以參考之方式併入本文。可使用在技藝中的標準技術來製備雜交物特定的單株抗體。該雜交物特定的單株抗體可使用來二者捕捉及偵測標的核酸。

雖然可使用任何脊椎動物來製備多株抗RNA-DNA雜交物抗體，但山羊或兔較佳。使用合成的多(A)-多(dT)雜交物來免疫山羊或兔較佳，其根據習知的注射程序將雜交物注射進入動物中。可根據熟知的抗體分離技術，從含有對已免疫的動物之物種特定的抗體之動物血液中收集及純化多株抗體。對單株抗體之製造來說，可在足夠量的時間後，從動物中移出脾，及脾細胞可與適當的骨髓瘤細胞融合，以製造雜交瘤。然後，可依分泌抗雜交物抗體的能力來篩選雜交瘤。然後，可使用經選擇的雜交瘤來注射進入第二動物之腹腔腔中來製造腹水流體，其可被萃取及使用作為想要的單株抗體之富含化來源(其以參考之方式併入本文)。

多核苷酸探針

將該多核苷酸探針設計成可與標的核酸分子雜交或結合。在另一個觀點中，將該多核苷酸探針設計成結合至標的核酸分子。在一個觀點中，該探針能雜交或結合至HPV

及HPV高風險變異株。在額外的觀點中，該多核苷酸探針對HPV及HPV高風險變異株特定。高風險(HR)核酸探針可包括用於HPV高風險型式16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68及82的探針。在其它觀點中，該RNA或DNA探針為片斷。在一個觀點中，該探針的長度約6至約8千鹼基，且約7.5千鹼基較佳，及可使用一使用布魯斯克里普特(Bluescript)載體的質體樣板來製造。但是，其它質體、載體及方法在技藝中已知及亦可使用來製造描述於本文中的RNA探針。

該探針的量可從每次分析每種HPV型式約7.5奈克變化至約60奈克，或從每次分析每種HPV型式約20奈克至約45奈克，或對每種HPV型式每次分析使用約30奈克的探針。因此，在一個觀點中，該HR探針由下列組成或基本上由下列組成：用於HPV高風險型式16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68及82或低風險HPV型式6、11、40、43、53、61、67、69、70、71、72、81及83之一或多種探針，其中每次分析每種探針使用約30奈克來偵測該標的核酸分子。

該RNA探針可為短的合成RNA探針，其特別僅結合至標的核酸分子。實施例描述在2009年4月17日所提出之美國專利申請案案號12/426,076中，其內容全文以參考之方式併入本文。

交叉反應性

本發明亦供應分析組成物、探針及條件，其中當與標

準FDA所批准的HPV分析及探針組比較時，在HPV HR探針組與低風險HPV型式間之交叉反應性戲劇性減低。在一個觀點中，該HPV HR探針組選自於由下列所組成之群：HPV高風險型式16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68及82或低風險HPV型式6、11、40、43、53、61、67、69、70、71、72、81及83。使用本分析與這些HR HPV探針，在低風險HPV型式與高風險HPV探針間之交叉反應性減低。參見例如，美國專利申請案案號12/426,076。

本發明亦提供一種用來測量存在於樣品中的標的核酸分子(諸如HPV)之方法，其使用上述討論的方法在約2小時或較短、約2.5小時或較短、約3小時或較短、約3.5小時或較短、約4小時或較短、約5小時或較短、約6小時或較短、約7小時或較短、約8小時或較短、約12小時或較短、約24小時或較短內，在其它觀點中，少於約3.5小時測量至少10個樣品。為何可在短時間內測量HPV或其它標的核酸分子存在的一個理由為因為該方法不在偵測前放大該標的核酸分子。取代標的放大，可使用信號放大來準確地偵測HPV或其它標的核酸分子之存在。在一個觀點中，本揭示的方法可包括一信號放大步驟。在一個觀點中，本揭示的方法不包括標的放大步驟。在另一個觀點中，本揭示的方法可包括信號放大步驟且無標的放大步驟。

本揭示亦提供一種藉由偵測存在於樣品中的標的核酸分子(諸如HPV)來偵測癌(例如，子宮頸癌)之方法及分析，其使用上述討論的方法及分析，在約2小時或較短、約2.5

小時或較短、約3小時或較短、約3.5小時或較短、約4小時或較短、約5小時或較短、約6小時或較短、約7小時或較短、約8小時或較短、約12小時或較短、約24小時或較短內，在其它觀點中，少於約3.5小時偵測至少10個樣品。

將由熟習該項技術者了解，本發明可在一些平台上進行，包括(但不限於)管子、量桿、微陣列、微板(microplates)、384井板、其它微滴板及微流體系統。將由熟習該項技術者了解，其可自動化。

本發明的另一個觀點提供一種在其中收集包含該標的核酸之樣品的收集媒質。該收集媒質提供數天、數週或數個月的樣品安定性。例如，該收集媒質可提供至少1週、至少2週、至少3週、至少4週、至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個月、至少5個月、至少6個月、從約1週至約4週、從約1個月至約3個月、從約3至約4個月、或從約3個月至6個月的樣品安定性。在另一個觀點中，該收集媒質提供在33°C下至少21天或在20°C下至少6個月的樣品安定性。在一個觀點中，上述樣品為子宮頸細胞樣品或人類子宮頸細胞樣品。合適的收集媒質描述於本文。在一個觀點中，該收集媒質包含下列、由下列組成或基本上由下列組成：NP-40、去氧膽酸鹽、Tris-HCl、EDTA、NaCl及疊氮化鈉。在其它觀點中，該收集媒質包含下列、由下列組成或基本上由下列組成：1.0%的NP-40、0.25%的去氧膽酸鈉、50 mM的Tris-HCl、25 mM的EDTA、150 mM的NaCl及0.09%的疊氮化鈉。

另一個觀點為一種包含下列、由下列組成或實質上由下列組成之含清潔劑的清洗緩衝液：40 mM的Tris、pH 8.2、100 mM的NaCl、0.1%至0.5%的崔通X-100及0.09%的疊氮化鈉。更另一個觀點為包含下列、由下列組成或實質上由下列組成之無清潔劑的清洗緩衝液：40 mM的Tris、pH 8.2、100 mM的NaCl及0.09%的疊氮化鈉。

用於核酸分子之回收、偵測及分析的樣品轉變

一個觀點係關於將一收集媒質加入至一已經先前製備用於診斷分析的樣品。在一個觀點中，該加入收集媒質的樣品已經預先使用液基細胞學(LBC)分析製備。LBC媒質可包括組織固定劑(諸如醇及福馬林)，其提供以安定樣品、抑制細菌生長、保存細胞形態及診斷集群、及保證組織單層細胞載片之製備。但是，許多使用來保存生物樣品的組成物(諸如蘇雷佩斯)包括醇或福馬林，其可對分析核酸分子有害。在一個觀點中，該細胞載片包括子宮頸細胞樣品或任何其它能被評估的生物樣品。在一個觀點中，使用蘇雷佩斯媒質來製備LBC樣品。

除了細胞製備外，LBC樣品可使用來偵測病症，諸如常見的性傳遞病原體，尤其包括人乳頭瘤病毒(HPV)、淋病雙球菌(GC)及沙眼披衣菌(CT)。至於其作為篩選工具的應用之補充，可使用LBC樣品來監視在對特別疾病之治療後，患者的病毒廓清率，告知進一步遵循及治療方案。在一個觀點中，LBC樣品的HPV測試可使用來監視在對以子宮頸為基礎的疾病治療後之患者的病毒廓清率。

在一個觀點中，收集生物樣品及將其保存在一媒質(諸如蘇雷佩斯媒質)中。貯存包含該生物樣品的保存媒質直到需要進一步處理。包含該生物樣品的保存媒質可被移出及懸浮在水中，因此形成"軟丸粒"。可移出該軟丸粒的一部分及在載片上分析。在一個觀點中，使用LCB分析製備該樣品。取代將更多保存媒質(諸如蘇雷佩斯)加入至剩餘的軟丸粒懸浮液，可將描述於本文之以清潔劑為基礎的收集媒質加入至剩餘的生物樣品。已分散在描述於本文之以清潔劑為基礎的收集媒質中之樣品可直接使用在核酸分子偵測分析中分析是有利的。額外的是，該已懸浮在以清潔劑為基礎的收集媒質中之生物樣品在室溫下安定至少11天(第6圖)。比較上，許多使用來保存生物樣品的組成物(諸如蘇雷佩斯)包含醇或福馬林，其可對分析核酸分子有害。

任何所揭示之以清潔劑為基礎的收集媒質皆能加入至該軟丸粒。在另一個觀點中，可使用清潔劑及螯合劑媒質來再溶解該丸粒。在非為限制的觀點中，可使用包含約0.5%至約2.0%的NP-40、約0.10%至約0.40%的去氧膽酸鈉、約25 mM至約75 mM的Tris-HCl、約10 mM至約50 mM的EDTA、約50 mM至約200 mM的NaCl及約0.01%至約0.10%的疊氮化鈉之收集媒質來溶解該軟丸粒。在加入該以清潔劑為基礎的收集媒質後，該軟丸粒樣品可使用與任何描述於本文中相關連的方法或分析來分析。例如，該軟丸粒可在如描述於本文之高生產量裝置和描述在2009年5月1日所提出的美國臨時專利申請案案號61/174,848中之裝置分析。

高生產量分析

一個觀點係關於一種高生產量分析及能實行任何描述於本文的方法或組成物之裝置。該高生產量分析能準確且快速地在短時間內處理樣品，大量樣品。

在一個觀點中，該高生產量分析能在少於3小時內處理至少300個樣品、在約5小時內900個樣品、在約6小時內至少1000樣品或在約8小時內至少1500個樣品。在另一個觀點中，高生產量分析能在約5小時內處理至少10微滴板(例如，96井板)、在約7小時內至少15微滴板(例如，96井板)或在約8小時內至少20微滴板(例如，96井板)。在一個觀點中，從該方法或分析開始至完成進行樣品之處理。

成套工具

亦提供一種用來偵測在樣品中之標的核酸分子的成套工具，該成套工具包含下列、由下列組成或實質上由下列組成：

- a)一收集媒質；
- b)一變性試劑；
- c)一多核苷酸探針；
- d)一塗佈有第一抗雜交物抗體的小珠；
- e)一包含第二抗多雜交物抗體的偵測試劑，其中該第二抗體經可檢測地標記；
- f)一清洗緩衝液；及
- g)一第二偵測試劑，其包含一用於第二抗體上之標籤的基質。

該收集媒質、變性試劑、小珠、第一及第二抗體、多核苷酸探針、偵測試劑及清洗緩衝液先前已經描述。

裝置

一個觀點係關於一種能使用描述於本文的任何方法或組成物實行之高生產量裝置。在較佳的觀點中，描述於本文之組成物、方法、分析及成套工具與描述在2009年5月1日所提出的美國臨時專利申請案案號61/174,848(其全文於此以參考方式併入本文)中之裝置一起使用。此高生產量裝置具有寬廣的基礎應用及能在短時間內準確且快速地處理樣品，大量的樣品。不欲限制，可使用描述在2009年5月1日所提出的美國臨時專利申請案案號61/174,848中之高生產量裝置來偵測及分析與下列之任何一種相結合的核酸分子：子宮頸樣品(例如，從子宮頸拭子獲得的樣品)或子宮頸細胞樣品、腺樣細胞、肛門上皮細胞、血液、唾液、腦脊髓液、胸水、乳、淋巴、痰、尿及精液、其它病毒、細菌、分枝桿菌或瘧原蟲，例如巨細胞病毒(CMV)、疱疹、HIV、H1N1、衣原體、淋病、淋病雙球菌(GC)、沙眼披衣菌(CT)、陰道毛滴蟲、金黃色葡萄球菌、結核病、SARS相關的冠狀病毒或流行性感冒。再者，可使用描述在2009年5月1日所提出的美國臨時專利申請案案號61/174,848中之高生產量裝置來偵測及分析與下列相結合的核酸分子：HPV、HPV的基因變異株、高風險HPV型式的HPV DNA、高風險HPV型式的HPV RNA或高風險HPV型式16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68及82之任何一

種或低風險HPV型式6、11、40、43、53、61、67、69、70、71、72、81及83之任何一種。

額外的是，描述在2009年10月9日所提出、具有代理人備忘錄案號74704.000401之美國申請案，發表名稱"自動化分析及系統"；及2009年10月9日所提出、具有代理人備忘錄案號74704.001001之美國申請案，發表名稱"開放式平台自動化樣品處理系統"二者中的系統，於此其全文亦以參考方式併入本文。亦可使用上述參照的二申請案來偵測及分析與任何上述樣品相結合的核酸分子。

實施例

實施例1：使用子宮頸樣品及HPV探針分析

將總共324個內科醫生收集的子宮頸樣品收集在以清潔劑為基礎的收集媒質中，及測試高風險HPV之存在。

渦旋1毫升的樣品以均質化該樣品，及移出50微升液份且在分析微板中與25微升變性試劑(1.75 N的NaOH)結合。搖晃其混合及在70°C下培養30分鐘，以產生單股DNA。在其中加入40微升包含用於16種HPV型式的RNA探針之中和緩衝液(探針稀釋劑，2.2 M的BES、2.6%的PAA、0.7 N的NaOH及0.09%的疊氮化鈉)，以產生中性的pH及在68.5°C下培養10分鐘。

接著此，將10微升結合順磁性小珠(來自熱費希爾(Thermo Fisher)，大約1微米經羧酸化的西拉丁(Seradyn)小珠)之抗體加入至該反應，及在68.5°C下培養額外30分鐘。結合彼此互補的RNA探針與DNA標的分子及產生

RNA-DNA雜交物。然後，藉由已塗佈在順磁性西拉丁小珠上之RNA-DNA雜交物特定的抗體來捕捉該雜交物。

在培養後，藉由曝露至磁場，將該順磁性小珠與該液相/上層液分離。藉由傾出移除上層液廢棄物，及加入35微升的偵測試劑1(結合酵素的二級抗體，其包含與鹼性磷酸酶結合之單株抗RNA-DNA雜交物抗體)，及在45°C下培養30分鐘。該二級抗體結合該RNA-DNA雜交物-抗體-結合的順磁性小珠複體。使用以清潔劑為基礎的清洗緩衝液(40 mM的Tris，pH 8.2，100 mM的NaCl，0.1%的崔通-X100及0.09%的疊氮化鈉)沖走未結合的二級抗體。

將一基質(來自ABI之以二氧咀為基礎的基質(稱為DCP星(DCP Star))與愛墨瑞得(Emerald)II促進劑)加入至該經清洗的小珠，及包含高風險HPV DNA的井產生光，其可藉由冷光儀偵測及以RLU(相對光單位)測量。使用包含1皮克/毫升的HPV DNA之分析正標準品來建立該正截斷。將全部的樣品RLU值除以正標準品的RLU值，產生RLU/CO(RLU對截斷值)。結果以RLU/CO報導，及大於或等於1.0的任何東西視為正型。

實施例2：安定性測試

在初始測試後，將樣品貯存在室溫及33°C下以觀察樣品安定性。進行測試遠到收集後21天。第3及4圖闡明每個樣品的RLU/CO值不會隨著時間改變最高21天。比較基線結果對在儲存21天後之結果的2x2分析及散佈圖分析闡明該RLU/CO值隨著時間的線性關係。根據這些資料可推斷，經

收集及貯存在室溫或33°C下長至21天的樣品提供可比較的RLU/CO值，如在基線處測試般。使用線性混合模型，比較RLU/CO值對著儲存溫度，P值對室溫來說為0.8803及對貯存在33°C下的樣品為0.9517，此指示出該等值相等。

實施例3

此實施例描述使用再操縱雜交捕捉化學(re-engineered HYBRID CAPTURE)及高風險(HR)及低風險(LR)HPV質體DNA構成體之偵測極限(LOD)、C₉₅濃度及交叉反應性實驗。LOD定義為鑑別出是否偵測到病毒所需要的複製品數目。C₉₅濃度定義為鑑別出樣本的信號是否大於該次之推定的臨床截斷95%所需要之複製品數目。

使用雜交至HPV 16或HPV 18及HPV 45 DNA的全長互補RNA探針進行二次各自獨立的分析。使用一系列的HPV 16、HPV 18及HPV 45基因組DNA稀釋液來測量LOD及C₉₅濃度，且以互補的RNA探針測試。使用已稀釋至每次反應大約 1×10^7 個複製品之來自LR及HR HPV型式的基因組DNA來測量交叉反應性，且以HPV 16、HPV 18及HPV 45 RNA探針測試。

表I：偵測極限及C₉₅濃度

	探針	HPV 16	HPV 18/45	HPV 18/45
	標的	16	18	45
複製品數目	LOD	564	604	533
	C ₉₅	8,464	8,464	7,444

表II：高風險型式交叉反應性

HR標的型式	信號對截斷比	
	HPV 16	HPV 18/45
→HPV 16	172.47*	0.13
→HPV 18	0.22	93.87*
HPV 26	0.14	0.16
HPV 31	0.19	0.19
HPV 33	0.15	0.21
HPV 35	0.23	0.20
HPV 39	0.15	0.19
→HPV 45	0.19	146.92*
HPV 51	0.15	0.24
HPV 52	0.15	0.20
HPV 56	0.15	0.20
HPV 58	0.15	0.19
HPV 59	0.15	0.20
HPV 66	0.15	0.20
HPV 68	0.15	0.27
HPV 73	0.20	0.15
HPV 82	0.14	0.15

*其中RLU/CO>1=正

表III：低風險型式交叉反應性

HR標的型式	信號對截斷比	
	HPV 16	HPV 18/45
HPV 1	0.32	0.34
HPV 2	0.34	0.37
HPV 3	0.39	0.39
HPV 4	0.27	0.26
HPV 5-9	0.28	0.34
HPV 5-48	0.20	0.23
HPV 8	0.27	0.33
HPV 30	0.26	0.27
HPV 34	0.17	0.20
HPV 40	0.35	0.34
HPV 42	0.15	0.15
HPV 44	0.21	0.33
HPV 53	0.28	0.35
HPV 61	0.42	0.48
HPV 62-116	0.58	0.15
HPV 62-177	0.24	0.14
HPV 67	0.23	0.29
HPV 69	0.46	0.41
HPV 70	0.14	0.15
HPV 81	0.55	0.51

每個例行的臨床程序為在外部臨床地點處收集子宮頸樣品及將其放入狄金(Digene)收集媒質(DCM)中。使用雜交捕捉HR HPV DNA篩選分析來測試樣品，及使用雜交捕捉HPV 16及HPV 18/45基因型分析來分析反應性樣本及非反應性樣本子組。亦使用HPV基因型，藉由GP5+/6+PCR接著魯米內斯(Luminex)偵測來評估該反應性樣本的子組。可使用任何描述於本文之以清潔劑為基礎的收集媒質，例如，該媒質可包含1.0%的NP-40、0.25%的去氧膽酸鈉、50 mM的Tris-HCl、25 mM的EDTA、150 mM的NaCl及0.09%的疊氮化鈉。

表IV：典型的臨床樣品資料

ID	HR篩選 RLU/CO	HPV 16 RLU/CO	HPV 18/45 RLU/CO	高風險基因型			低風險基因型						
3350	366.8*	156.7*	0.28	16				Neg					
3696	283.9*	0.50	0.20	35				Neg					
3631	278.0*	328.2*	0.20	16				40					
3419	211.2*	0.12	0.15	52				Neg					
3711	205.2*	0.13	0.22	56				Neg					
3355	158.2*	0.16	0.15	51				74	83	91			
3718	154.8*	0.19	117.0*	18				Neg					
3463	141.8*	0.13	0.15	66				Neg					
3514	124.8*	106.8*	0.17	16				Neg					
3637	65.8*	0.17	0.16	68				Neg					
3576	50.6*	0.13	0.13	52				32	42	62	67	90	
3656	47.3*	0.14	0.22	31				54	72				
3415	10.2*	0.13	0.15	82				28	85	86			
3366	9.6*	0.11	5.4*	18	35	45		42	86	87			
3434	8.6*	0.14	5.2*	33	45			72	87				
3229	8.4*	15.7*	0.14	16				Neg					
3705	0.25	0.27	0.10	Neg				Neg					
3239	0.25	0.13	0.12	Neg				69					
3717	0.23	0.17	0.17	Neg				Neg					
3719	0.22	0.10	0.13	Neg				32					

實施例4：蘇雷佩斯丸粒轉變及核酸之回收

在此實施例中，描述蘇雷佩斯丸粒轉變及核酸回收的

典型工作流程。蘇雷佩斯媒質的工作流程包括初始收集一級樣品，其可為使用來在過渡區域或樣品收集點處收集子宮頸上皮細胞之細胞刷。每個刷子收集平均 2×10^8 個子宮頸細胞，其可保存在收集小玻瓶的10毫升蘇雷佩斯媒質中。小玻瓶可被密封，及在室溫或 4°C 下於固定劑媒質中培養細胞，直到進行進一步處理。然後，該細胞懸浮液可接受自動化密度梯度的純化方案，及所產生的細胞丸粒(具有平均總細胞數 1.6×10^8 個細胞)可懸浮在最後體積1毫升的水中。此水丸粒可指為"軟丸粒"或"未稀釋的軟丸粒"。

可在用於細胞學的自動化載片製備方法中，使用200微升之軟丸粒，在800微升體積中留下平均 1.3×10^8 個總細胞。在移出200液份用於載片製備後，在必需再製得載片的實例中，可將1-2毫升之新鮮蘇雷佩斯媒質加入至剩餘的800微升軟丸粒，以安定化及保存軟丸粒。在大部分實例中，此剩餘的2-3毫升樣品在報導細胞學結果後被破壞。

可將描述於本文之以清潔劑為基礎的媒質加入至剩餘的800微升軟丸粒。可將任何描述於本文之以清潔劑為基礎的收集媒質加入至剩餘的800微升軟丸粒。在一個觀點中，該媒質可包含1.0%的NP-40、0.25%的去氧膽酸鈉、50 mM的Tris-HCl、25 mM的EDTA、150 mM的NaCl及0.09%的疊氮化鈉。該已懸浮在以清潔劑為基礎的收集媒質中且貯存在室溫下之軟丸粒可安定至少11天(第6圖)。在加入該以清潔劑為基礎的收集媒質後，該軟丸粒樣品可以相關連描述於本文的任何方法或分析來分析。

【圖式簡單說明】

第1圖顯示出該以清潔劑為基礎的收集媒質在微滴板井中抓住磁性小珠比已知的收集或樣品運送媒質(STM)(以非清潔劑為基礎的媒質)好。

第2圖顯示出每毫升的樣品僅具有0.2皮克標的核酸(DNA)之樣品，使用本發明之方法能提供可讀取的信號。

第3圖顯示出臨床樣品在室溫下21天的安定性。

第4圖顯示出臨床樣品在33°C下21天的安定性。

第5圖顯示出測試結果闡明0.2皮克/毫升的HPV 16質體(其等於1000個HPV 16 DNA複製品)之S/N>2.0。

第6圖顯示出懸浮在以清潔劑為基礎的收集媒質中及貯存在室溫下11天的軟丸粒之安定性資料。

【主要元件符號說明】

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 98136144

C12Q 1/68 (2006.01)

※申請日： 98.10.26

※IPC 分類：

G01N 33/553 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

C12M 1/40. (2006.01)

於自動平台上之快速結果雜交捕捉法

FAST RESULTS HYBRID CAPTURE ASSAY ON AN AUTOMATED PLATFORM

二、中文發明摘要：

本發明包含一種能提供快速及可信賴的結果、用來偵測存在於樣品中的標的核酸分子之方法。

三、英文發明摘要：

The present invention comprises a method that provides fast and reliable results for detecting the presence of a target nucleic acid molecule in a sample.

七、申請專利範圍：

1. 一種用來測量於樣品中標的核酸分子之存在的方法，該方法包括：
 - a)將該樣品懸浮在一包含清潔劑的收集媒質中；
 - b)變性在該樣品中的標的核酸分子；
 - c)藉由讓至少一種多核苷酸探針與該標的核酸分子接觸，以形成一雙股核酸雜交物；
 - d)藉由將該雙股核酸雜交物捕捉在載體上形成一雙股核酸雜交物-載體複體，其中該載體包含一第一抗體；
 - e)藉由讓該雙股核酸雜交物-載體複體與一第二抗體接觸以形成一雙股核酸雜交物-載體-第二抗體複體，其中該第二抗體經可偵測的標誌標記；
 - f)以一清洗緩衝液清洗該雙股核酸雜交物-載體-第二抗體複體；及
 - g)偵測該在第二抗體上的標誌，其中該偵測指示出該標的核酸分子之存在。
2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中在形成該雙股核酸雜交物-載體-第二抗體複體前，由未被捕捉在載體上之核酸分子分離該雙股核酸雜交物-載體複體與。
3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該收集媒質包含至少二種清潔劑、緩衝劑、螯合劑及防腐劑。
4. 如申請專利範圍第3項之方法，其中該二種清潔劑為NP-40及去氧膽酸鈉，該螯合劑為EDTA及該防腐劑為疊

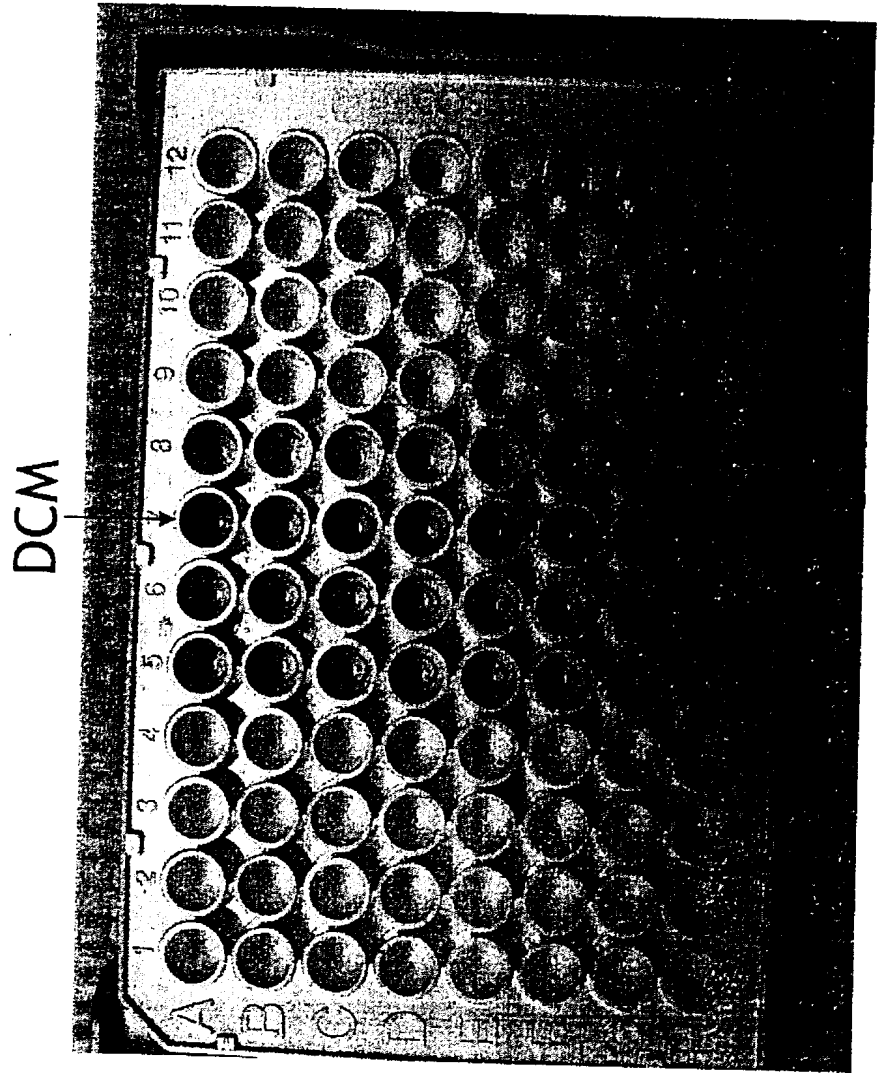
氫化鈉。

5. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該在清洗緩衝液中的清潔劑包含崔通X-100。
6. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該清洗緩衝液包含40 mM的Tris pH 8.2、100 mM的NaCl、0.1%至0.5%的崔通X-100及0.09%的疊氫化鈉。
7. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該樣品為子宮頸細胞樣品。
8. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該鹼性溶液的pH在約pH 12至約pH 14間。
9. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該至少一種多核苷酸探針選自於用於HPV高風險型式16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68及82的探針。
10. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該多核苷酸探針包含RNA。
11. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該至少一種多核苷酸探針存在於一包含緩衝劑、聚丙烯酸、鹼及防腐劑的溶液中。
12. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該第一抗體、或第二抗體、或第一與第二抗體二者為單株抗體。
13. 如申請專利範圍第1項之方法，其中在溫度從約67°C至約70°C下形成該雙股核酸雜交物。
14. 如申請專利範圍第13項之方法，其中該溫度為約68.5°。
15. 如申請專利範圍第14項之方法，更包括以速度約300

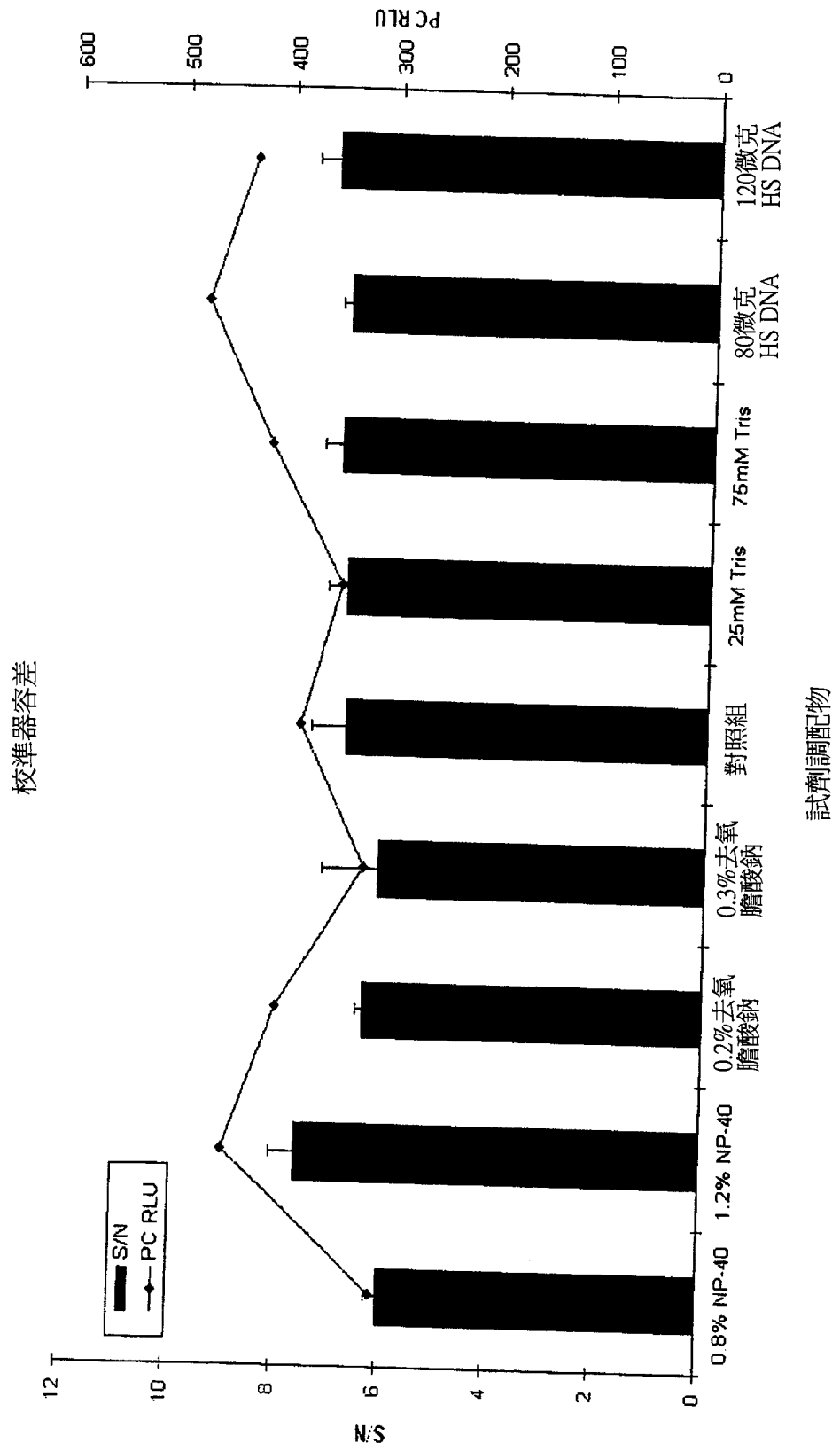
rpm搖晃該樣品。

16. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該載體包含磁珠。
17. 如申請專利範圍第1項之方法，其中在4小時或較短內測量該標的核酸分子之存在。
18. 一種用來測量於樣品中標的核酸分子之存在的裝置，該裝置包括：
 - a) 一容器，其安裝以包含該樣品與一或多種媒質；
 - b) 一吸量器，其安裝以將該一或多種媒質加入至該容器；
 - c) 一混合器，其安裝以在該容器中混合該樣品與該一或多種媒質；
 - d) 一加熱器，其安裝以在該容器中加熱該樣品與該一或多種媒質；
 - e) 一磁鐵，其安裝以分離該標的核酸分子；及
 - f) 一偵測器，其安裝以偵測該標的核酸分子之存在。

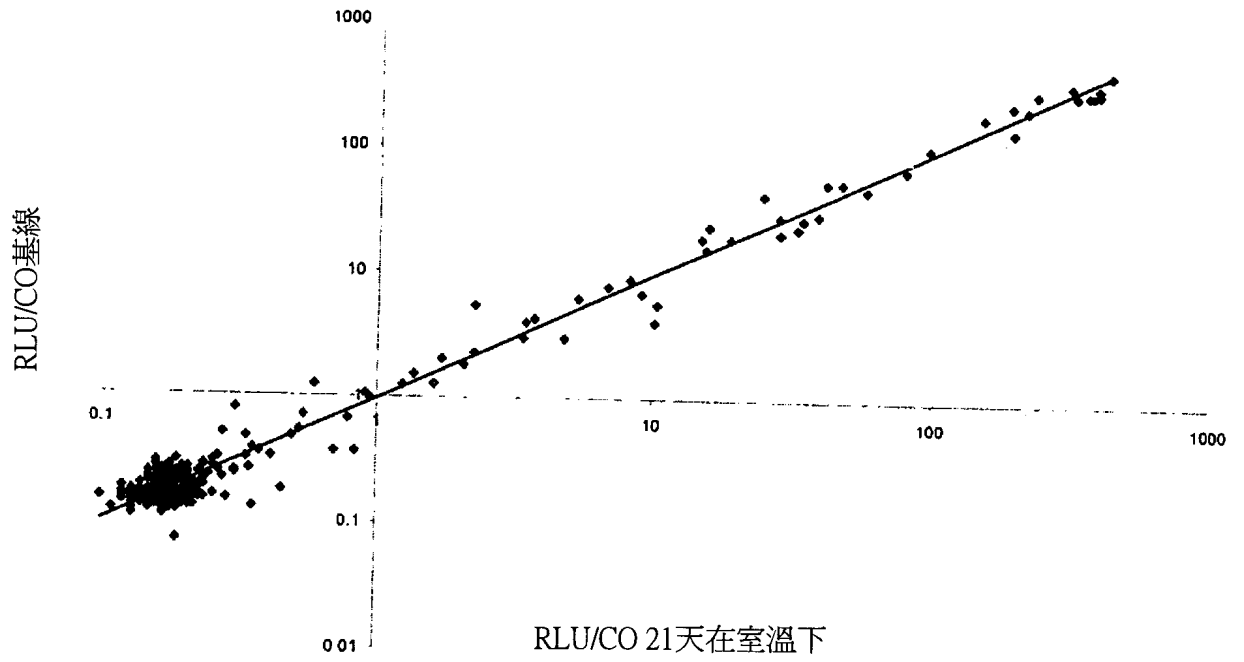
第 1 圖



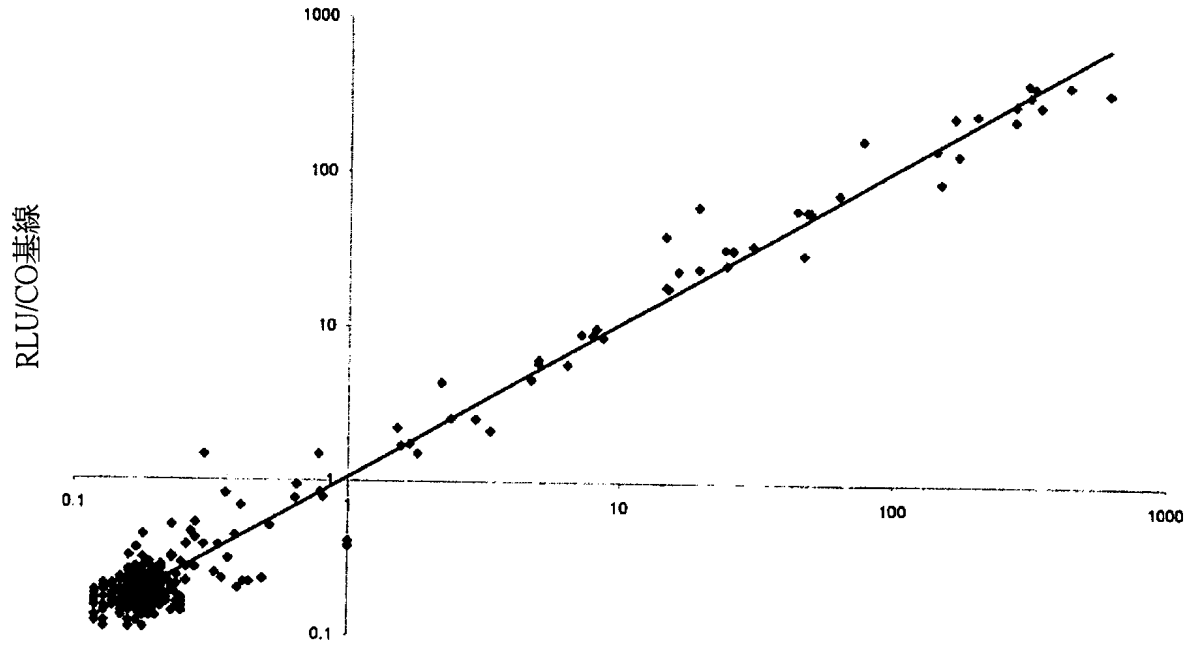
第 2 圖



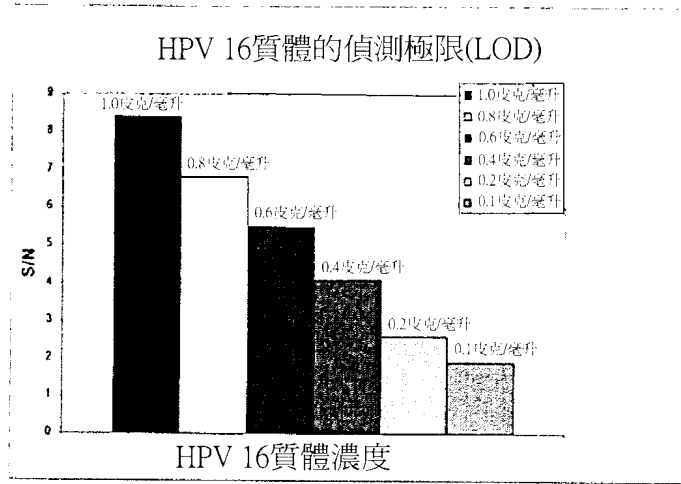
第 3 圖



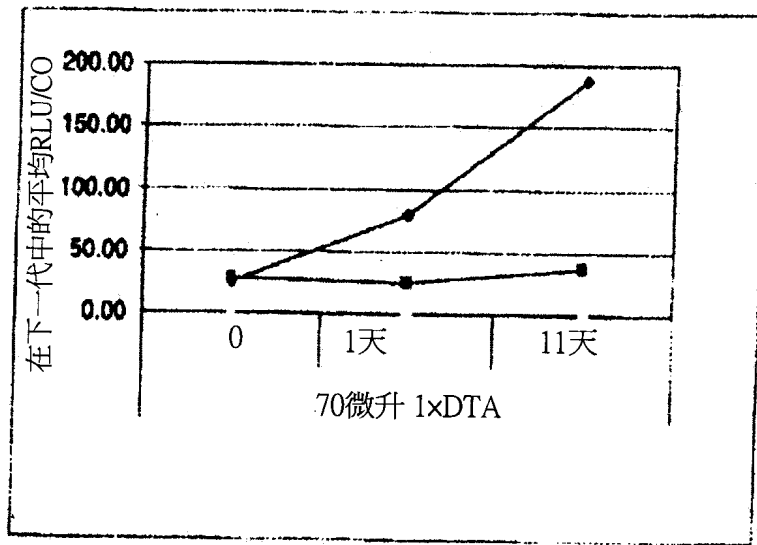
第 4 圖



RLU/CO 21天在33°C下



第 5 圖



第 6 圖

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (4) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：