

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02814133.4

[45] 授权公告日 2007 年 3 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1304596C

[22] 申请日 2002.5.24 [21] 申请号 02814133.4

[30] 优先权

[32] 2001. 5. 25 [33] GB [31] 0112868.5

[86] 国际申请 PCT/GB2002/002443 2002.5.24

[87] 国际公布 WO2002/097132 英 2002.12.5

[85] 进入国家阶段日期 2004.1.13

[73] 专利权人 英国国防部

地址 英国威尔特郡

[72] 发明人 M·A·李

[56] 参考文献

WO9942611A 1999.8.26

WO9928500A 1999.6.10

WO9966071A 1999.12.23

EP0512334A 1992.11.11

WO0111078A1 2001.2.15

审查员 温庭江

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 孟凡宏

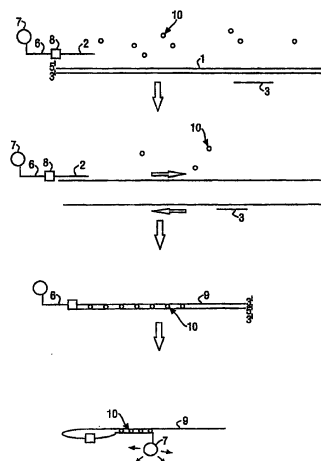
权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 11 页

[54] 发明名称

检测系统

[57] 摘要

一种用于检测样品中的靶核酸序列存在的方法，该方法包括：在存在以下成分的条件下对所述样品进行核酸扩增：(a) DNA 双链体结合试剂，(b) 核酸聚合酶，和(c) 含有扩增引物的试剂，该引物能与单链形式的所述靶序列杂交，并且，它的 5' 末端通过化学连接基团与具有标记的探针连接，所述标记过的探针是与所述靶核酸序列相似的序列，以便它能够与扩增产物上的互补区杂交，并且，其中，所述标记能够吸收来自所述 DNA 双链体结合试剂的荧光能量或为所述 DNA 双链体结合试剂提供荧光能量；以及监测所述样品的荧光。



1. 一种用于检测靶核酸序列在样品中的存在的方法，该方法包括：

在存在以下成分的条件下对所述样品进行核酸扩增：（a）DNA 双链体结合试剂，（b）核酸聚合酶，和（c）含有扩增引物的试剂，该引物能与单链形式的所述靶序列杂交，并且，它的 5'末端通过化学连接基团与具有标记的探针连接，所述标记过的探针是与所述靶核酸序列相似的序列，以便它能够与扩增产物上的互补区杂交，并且，其中，所述标记能够吸收来自所述 DNA 双链体结合试剂的荧光能量或为所述 DNA 双链体结合试剂提供荧光能量；以及监测所述样品的荧光。

2. 如权利要求 1 的方法，其中，所述方法包括：

（a）向被怀疑含有靶核酸序列的样品中添加 DNA 双链体结合试剂，核酸聚合酶和试剂；

（b）使所述样品处于引物与靶核酸序列杂交，并且形成包括所述探针的扩增产物的条件；

（c）使所述样品处于标记过的探针与所述扩增产物上的互补区杂交的条件；和

（d）在步骤（b）和（c）中的至少一个中监测所述样品的荧光。

3. 如权利要求 1 的方法，其中，所述扩增产物包括所述探针。

4. 如权利要求 1-3 中任意一项的方法，其中，所述 DNA 双链体结合试剂是嵌入染料。

5. 如上述权利要求中任意一项的方法，其中，所述 DNA 双链体结合试剂包括一种供体标记，而所述探针包括受体标记。

6. 如权利要求 1-4 中任意一项的方法，其中，所述 DNA 双链体结合试剂包括一种受体标记，而所述探针包括供体标记。

7. 如上述权利要求中任意一项的方法，其中，所述受体标记是发射特征性波长的能量的荧光分子。

8. 如权利要求 7 的方法，其中，所述受体标记是罗丹明染料或 Cy5。

9. 如权利要求 1-6 中任意一项的方法，其中，所述受体标记是暗受体。

10. 如权利要求 9 的方法，其中，所述暗受体选自下列任意一种：

DABCYL, 甲基红, QSY-7 二芳基罗丹明染料和 6-(二甲基氨基)-2-[4-[4-(二甲基氨基)苯基]-1, 3-丁间二烯基-1-乙基喹啉鎓高氯酸盐 (CAS 号 181885-68-7)。

11. 如上述权利要求中任意一项的方法, 其中, 所述扩增反应包括聚合酶链式反应 (PCR)。

12. 如权利要求 1-8 和 11 中任意一项的方法, 其中, 所述受体分子是荧光分子, 并且, 其中, 监测供体和受体分子的荧光, 并且计算这两种发射之间的关系。

13. 如上述权利要求中任意一项的方法, 其中, 在扩增反应过程中监测来自所述样品的荧光信号, 并且将结果用于对存在于所述样品中的靶序列的数量进行定量。

14. 如上述权利要求中任意一项的方法, 其中, 在扩增反应是在存在不与标记探针结合的其他相应的扩增引物的条件下进行的。

15. 一种用于检测核酸扩增的方法, 包括: 在存在以下成分的条件下对靶多核苷酸进行核酸扩增: (a) 核酸聚合酶, (b) DNA 双链体结合试剂, 和 (c) 含有扩增引物的试剂, 该引物能与单链形式的所述靶序列杂交, 并且, 它的 5'末端通过化学连接基团与具有第二种标记的探针连接, 所述标记过的探针是与所述靶核酸序列相似的序列, 以便它能够与扩增产物上的互补区杂交, 并且, 其中, 所述 DNA 双链体结合试剂或第二种标记中的一个包括一种供体标记, 该标记能够给所述 DNA 双链体结合试剂或第二种标记中的另一个提供荧光能量, 所述 DNA 双链体结合试剂或第二种标记中的另一个包括一种能吸收来自所述供体分子的荧光能量的受体标记, 所述引物能够与所述靶多核苷酸杂交; 并且在扩增过程中监测荧光的变化。

16. 如权利要求 15 的方法, 其中, 所述扩增是用一对引物进行的, 所述引物是设计过的, 以便只有 DNA 链上的靶核苷酸序列被扩增。

17. 如上述权利要求中任意一项的方法, 其中, 所述探针对于 RNA 的剪接区或 DNA 中的内含子是特异的, 这样, 只检测和/或定量扩增的 RNA 或扩增的 DNA 中的一种。

18. 一种用于确定靶核酸序列特征的方法, 该方法包括 (a) 在存在 DNA 双链体结合试剂和一种包括扩增引物的试剂的条件下扩增所述序列, 所述引物的 5'末端通过化学键与一种探针连接, 所述探针包

括相似于所述靶序列的一个区域的序列，并且它还包括一种标记，当所述 DNA 双链体结合试剂和所述标记中的一个供体标记，而其中的另一个是受体标记时，所述供体标记能够向所述受体标记提供荧光能量；以便形成掺入了探针区的扩增产物，(b) 让扩增产物处于使它的探针区与扩增产物的互补区杂交的条件，和 (c) 监测所述样品的荧光，并且确定特定的反应条件，所述序列的特征，在所述条件下，由于探针区与样品的杂交或在探针区和靶核酸序列之间形成的双链体的脱稳定化而导致荧光变化。

19. 一种用于检测多态性和/或等位变异的方法，所述方法包括用权利要求 1-16 中任意一项的方法扩增被怀疑含有所述多态性或变异的序列，用所产生的荧光信号测定探针区从扩增产物中的互补序列上解链的温度，并且将这种信号与多态性或等位变异的存在相联系。

20. 一种用于上述权利要求中任意一项的方法中的试剂盒，该试剂盒包括一种含有扩增引物的试剂，引物的 5' 末端通过化学键与对靶核苷酸序列特异的探针连接，其中，所述探针包括第一种标记，它可以起着供体或受体标记的作用；以及包括第二种标记的 DNA 嵌入试剂，所述第二种标记起着供体或受体标记的作用，其中，所述第一和第二种标记构成了供体-受体对。

检测系统

本发明提供了一种用于检测样品中的靶多核苷酸的方法，例如，通过监测扩增反应，优选以定量方式监测，还涉及用于所述方法的试剂盒。所述方法还适用于检测序列特征，如多态性或等位变异，因此可用于诊断方法。

已知的荧光聚合酶链式反应（PCR）监测技术包括链特异性和一般性 DNA 嵌入技术，所述技术可用在少数几种第二代 PCR 热循环装置上。

一般性荧光 PCR 方法使用 DNA 嵌入染料，所述染料在与双链 DNA 结合时具有增强了的荧光。在扩增期间，由于 DNA 的总浓度提高而导致的荧光的增强，可用于衡量反应的进展，并用于确定起始靶分子拷贝数。另外，通过监测荧光随着温度的受控制的改变而发生的变化，可以制备 DNA 解链曲线，例如，在 PCR 热循环结束时进行。

所述一般性荧光 PCR 方法能监测核酸总浓度的提高，而没有任何时间补偿。可以在每一次反应的相同的时间点上采集一个荧光读数。终点解链曲线分析可用于从扩增子中辨别伪迹，并且用于辨别扩增子。可以在不能通过琼脂糖凝胶电泳观察到的浓度下看到产物的峰。

业已发现，DNA 解链曲线分析一般来说是优化 PCR 热循环的有效工具。通过确定扩增子的解链温度，可以在随后的 PCR 循环中将变性温度降低到所确定的解链温度。优化来自第一代反应产物而不是基因组 DNA 的扩增，减少了在随后循环中出现的伪迹的形成。引物寡核苷酸及其互补体的解链温度可用于确定它们的退火温度，减少对经验优化的需要。

不过，所述一般性嵌入方法只是准链特异性的，因此，不太适用于需要链特异性检测的场合。

荧光 PCR 链特异性方法使用其他核酸反应成分监测扩增反应的进程。所述方法可以使用荧光能量转移（FET）作为检测的基础。通过荧光分子标记一种或多种核酸探针，所述探针之一能够起着能量供体的作用，而另一个是能量受体分子。有时候，上述分子分别被称为报导分子和淬灭分子。所述供体分子用特殊波长的光线激发，在这种波

长下，它通常会表现出荧光发射波长。所述受体分子是在所述发射波长下激发的，以便它能够通过多种距离依赖性能量转移机制接收所述供体分子的发射能量。可以发生荧光能量转移的一种具体例子是荧光共振能量转移或“FRET”。一般，当受体分子靠近供体分子（例如，在相同或相邻分子上）时，受体分子接收供体分子的发射能量。FET或FRET检测的基础，是监测在供体反射波长下的变化。当所述受体同样是荧光分子时，还可以监测受体发射波长。

存在两种常用类型的FET或FRET探针，利用核酸探针的水解分离供体和受体的类型，以及利用杂交改变供体和受体分子的空间关系的类型。

水解探针是作为TaqMan™探针出售的。它包括DNA寡核苷酸，它是用供体和受体分子标记过的。将所述探针设计成与PCR产物的一条链上的特定区域结合。在PCR产物与该链退火之后，Taq酶通过5'→3'聚合酶活性延伸所述DNA。Taq酶还具有5'→3'外切核酸酶活性。TaqMan™探针的3'末端是通过磷酸化进行保护的，以防止它们启动Taq延伸。如果TaqMan™探针与所述产物链杂交的话，延伸的Taq分子也能够水解所述探针，从受体释放所述供体，作为检测的基础。这种例子中的信号是累积性的，游离供体和受体分子的浓度随着扩增反应的每一次循环而提高。

信号的产生取决于探针水解反应的出现这一事实，意味着存在与该方法相关的时间补偿。另外，探针的存在可能打断PCR过程的顺利进行。

另外，业已发现，水解可能是非特异性的，特别是在需要大量的扩增循环，例如超过50次循环的场合更是如此。在这种情况下，探针的非特异性水解会导致过分加强的信号。

这意味着所述技术与快速PCR方法不是非常兼容，随着快速热空气热循环仪，如由Idaho Technologies Inc.所提供的RapidCycler™和LightCycler™的开发，这一问题变得更为突出。例如，其他快速PCR装置用于共同未决的英国专利号2334904中。与常规热循环相比，快速循环的优点业已在其他文献中报导过。例如，所述技术特别适用于用于生物学竞争的检测系统，其中，如果要避免生命损失或严重损伤的话，获得结果的速度是重要的。

另外，水解探针不能提供有关解链滞后现象的大量信息，因为信号产生是通过，并且在很大程度上取决于探针的水解，而不是扩增子或探针的解链温度。

杂交探针是以多种形式提供的。分子信号是具有互补的 5'和 3'序列的寡核苷酸，以便它们形成发卡环。在形成发卡结构时，末端荧光标记是非常接近的，以便发生 FRET。在分子信号与互补序列杂交之后，分离荧光标记，以便不发生 FRET，并且它构成了检测的基础。

还可以使用成对的标记寡核苷酸。它们在 PCR 产物链上的非常接近的部位杂交，将供体和受体分子聚在一起，以便可以发生 FRET。增强的 FRET 是检测的基础。这种类型的变化形式包括使用具有单一相邻探针的标记过的扩增引物。

两种探针或包括两种标记分子的分子信号类型的探针的使用，提高了相关方法的成本。另外，正如所公知的，该方法需要存在合理长度的已知序列，以便足够长的两个探针在非常接近的部位彼此特异性结合。这可能是某些诊断用途的问题，其中，一种生物体中的可用于设计有效探针的保守序列的长度可能相对短，如 HIV 病毒。

另外，成对的探针的使用涉及更复杂的实验设计。例如，由探针解链所提供的信号受两种探针解链的影响。小的错配的研究或需要探针之一以跨剪接区结合的场所（例如，检测样品中与 DNA 相比的 RNA，其中，位于内含子任一侧的序列可以用作检测位点），如果另一个探针首先解链的话，可能产生不正确的结果。

共同未决的国际申请号 W099/28500 披露了一种用于检测特定靶核酸序列存在的方法，该方法包括 a) 将一种对所述序列特异的探针添加到所述样品中，所述探针具有能够给 DNA 双链体结合试剂提供荧光或吸收来自它的荧光能量的部分，b) 使所述混合物进行扩增反应，c) 让所述探针与所述靶序列杂交，并且检测来自所述样品的荧光。然后通过检测所述样品荧光的改变监测所述反应，因为在所述反应过程中荧光会发生改变，因为产生了更多的产物，所述产物能够与所述探针杂交，并且产生 DNA 双链体结合试剂和探针上的荧光部分之间 FET 或 FRET 相互作用。

共同未决的国际专利申请号 PCT GB99/00504 披露了一种用于检测特定核酸序列存在的类似分析方法，该方法适用于对样品中的靶序

列的数量进行定量。在该分析中，扩增反应是使用一套核苷酸实现的，其中的至少一种核苷酸是荧光标记的。因此，在所述扩增产物中掺入了荧光标记。所述反应是在存在一种探针的条件下进行的，所述探针能与扩增产物杂交，并且，它包括能够吸收来自所述荧光标记过的核苷酸的荧光或向所述核苷酸提供荧光能量的反应性分子。然后通过检测所述样品的荧光监测该反应，因为在反应过程中，随着更多产物的形成，荧光会发生改变，所述产物能与所述探针杂交，并且在它们之间产生 FET 或 FRET 相互作用。

国际专利申请号 W001/11078 披露了用于检测样品中靶核酸序列存在的另一种相关的方法。在本方法中，在第一阶段，使所述靶序列成为单链形式，以便试剂的引物区能与它杂交。因此，它能启动所述链的延伸，以便制备互补链，该互补链包括标记过的核苷酸，并且还具有它的 5'末端上游的标记过的探针区，它与产物的下游区互补。所述延伸阶段一旦结束，在解链阶段，所述产物与它的模板链分离，以便成为单链形式。在这种形式下，标记过的探针区能够缠绕在产物链的互补区上，并且与它杂交，以便所述标记能够通过 FET 或 FRET 向另一标记提供荧光能量（供体），因此改变了来自所述样品的荧光。在所述反应过程中监测这种信号的改变，以便监测扩增反应的进程。

包括使用 Scorpion 探针系统的分析方法披露于以下文献中：GB2338301，和 Nucleic Acids Research, 2000, vol.28, no. 19, 3752-3761。所述 Scorpion 探针系统包括一个通过连接部分连接在探针部分上的引物部分。所述探针系统包括供体和受体部分。在该分析方法中，在第一阶段，使靶序列成为单链形式，以便所述引物部分能够与所述靶序列杂交。因此，可由此启动所述链的延伸，以便产生一个互补链，该互补链具有它的 5'末端上游的探针部分，该部分与产物的下游区互补。所述延伸阶段一旦结束，在解链阶段，所述产物与它的模板链分离，并因此成为单链形式。在这种形式下，所述标记过的探针区能够缠绕在所述产物链的互补区上并且与它杂交。所述探针部分与所述产物的互补区的杂交，改变了供体和受体部分之间的空间关系，并因此改变了来自所述样品的荧光信号。

本申请人业已发现了另一个改进的测定方法。

本发明提供了一种用于检测靶核酸序列在样品中的存在的方法，

该方法包括:

在存在以下成分的条件下对所述样品进行核酸扩增: (a) DNA 双链体结合试剂, (b) 核酸聚合酶, 和 (c) 含有扩增引物的试剂, 该引物能与单链形式的所述靶序列杂交, 并且, 它的 5'末端通过化学连接基团与具有标记的探针连接, 所述标记过的探针是与所述靶核酸序列相似的序列, 以便它能够与扩增产物上的互补区杂交, 并且, 其中, 所述标记能够吸收来自所述 DNA 双链体结合试剂的荧光能量或为所述 DNA 双链体结合试剂提供荧光能量; 以及监测所述样品的荧光。

与 W001/11078 中的现有测定方法相比, 本发明更便宜和简单, 而且效果出奇的好。在本发明中, 以非结合状态将 DNA 双链体结合试剂添加到反应混合物中, 没有必要结合在 W001/11078 中的核苷酸上, 或结合在 GB2338301 中的探针系统上。

在本发明的测定方法中, 在第一阶段, 使靶序列成为单链形式, 以便所述试剂的引物部分能够与它杂交。这样能够启动所述链的延伸, 以便产生一条互补链。所述引物链也将具有在它的 5'末端的上游的标记过的探针区, 该探针区与所述产物的下游区互补。DNA 双链体结合材料(优选嵌入染料)将会夹带在由此形成的双链中。一旦延伸阶段结束, 所述产物就在解链阶段与它的模板链分离, 并因此形成单链形式。在这种形式下, 标记过的探针区能够缠绕在产物链的互补区, 并且与它杂交, 因此将 DNA 双链体结合试剂夹杂在产物链的探针区和互补区之间。由于 DNA 双链体结合试剂和探针标记相互靠近, 所述荧光部分能够通过 FET 或 FRET 向受体部分提供荧光能量(供体), 因此改变来自所述样品的荧光信号。可以在反应过程中监测到这种信号变化, 以便监测扩增反应的进程。

在扩增的第二和随后阶段, 所述产物链本身起着用于延伸的模板链的作用。不过, 探针和引物之间的化学键能在与所述探针互补的序列产生之前终止延伸反应。因此, 所述探针区保持单链形式。

本发明的方法优选包括:

(a) 向被怀疑含有靶核酸序列的样品中添加 DNA 双链体结合试剂, 核酸聚合酶和试剂;

(b) 使所述样品处于引物与靶核酸序列杂交, 并且形成包括所述探针的扩增产物的条件;

(c)使所述样品处于标记过的探针与所述扩增产物上的互补区杂交的条件；和

(d)在步骤(b)和(c)中的至少一个中监测所述样品的荧光。

如果需要，在扩增反应期间还可以存在没有与标记过的探针区结合的相应的扩增引物。该引物会导致常规未标记过的扩增产物的产生，该产物可用于介导信号进入所使用的检测器装置的动态范围。它还可以改善有可能因为复合的探针/引物结构的存在而受到不利影响的反应效率。

当能够从供体标记中吸收荧光的受体标记发挥这种作用时，来自所述供体的荧光减弱。可以检测这种减弱，并且它表明了所述探针区的结合。

最优选所述能吸收荧光的标记（受体）本身是荧光分子，它能在特征性波长下发射荧光。所述探针包括罗丹明染料或 Cy5。在这种情况下，来自受体分子的荧光（它的波长与供体标记的波长不同）的增强，也表明了探针的结合。另外，所述受体不能发出荧光（暗受体）。这样的受体包括 DABCYL，甲基红，QSY-7 二芳基罗丹明染料和 6-（二甲基氨基）-2-[4-[4-（二甲基氨基）苯基]-1，3-丁间二烯基-1-乙基喹啉鎓高氯酸盐（CAS 号 181885-68-7）。

所述 DNA 双链体结合试剂优选包括一种供体标记，并且所述受体标记提供在所述探针上。在这种情况下，并且如果受体发出荧光的话，所述标记过的扩增产物的存在就可以通过监测由探针上的受体分子发出的荧光而进行检测，所述探针主要结合在相同产物链的下游区。在这种情况下，可以分辨来自扩增产物的信号和荧光标记的本底信号，以及来自任何非特异性扩增产物的信号。另外，所述 DNA 双链体结合试剂可以包括一种受体标记，而所述探针包括所述供体标记。

在本发明的系统中，可以区别总体嵌入剂信号（如在扩增 DNA 时）和序列特异性信号的增强，所述信号特异性信号仅在两种荧光部分紧密靠近时（即当探针与扩增产物杂交时）产生。所述序列特异性信号只能通过标记过的扩增产物产生这一事实表明，该系统在检测含有大量本底 DNA 的反应混合物中的特异性靶序列方面是高度特异的。这是因为非特异性扩增产物不能与探针区杂交，并因此不能产生所述检测信号。除了所述序列特异性信号之外，一般的嵌入剂信号的测定可以

是有利的。一般的嵌入剂信号与反应混合物中的扩增程度成正比，因此可用于表明扩增的效力或阻断。

可以用廉价试剂进行这种性质的测定。单一的标记探针比包括受体和供体分子的探针更经济。

扩增优选是用已知扩增反应进行的，如聚合酶链式反应（PCR）或连接酶链式反应（LCR），链置换测定（SDA）或 NASBA，不过优选 PCR。

监测供体和受体部分的荧光，并且计算它们的发射之间的关系。

所述标记在探针上的位置是不重要的，不过它通常位于探针的末端区。在所述试剂中可以使用一种以上标记，不过优选一种标记，因为更经济一些。

为了进行 FET，如 FRET，所述供体部分的荧光发射的波长必须短于受体部分的波长。

因此，在下面的表 1 中列举了合适的组合：

供体	受体
SYBRGold	罗丹明
SYBRGreen I	罗丹明
荧光素	罗丹明
SYBRGold	Cy5
SYBRGreen I	Cy5
荧光素	Cy5
荧光素	溴化乙锭
荧光素	Dabcyl
荧光素	甲基红
荧光素	QSY-7 二芳基罗丹明染料*
SYBRGold	Cy5.5

* 由 Molecular Probes, UK 提供。

本领域技术人员可以理解的是，很多其他类似的组合是可能的。

被用作供体和/或受体的分子，优选能产生尖锐的发射峰，并且在发射的波长上少有或没有重叠。在这种条件下，可能不需要从通过扩增产物产生的信号中分辨“链特异性峰”。只是简单地测定链特异

性信号（即由受体部分提供的信号），就能够提供有关通过所述靶反应导致的 FET 或 FRET 的程度的信息。

不过，来自供体和受体部分的荧光信号存在光谱的重叠，在所述结果中证明了这一点，例如，通过凭经验确定所述光谱之间的关系，并且利用这种关系对来自两种信号的信号进行标准化。

将所述标记过的探针与引物分开的化学键优选是任何能连接核苷酸序列的分子，不过所述核苷酸序列不能被 DNA 聚合酶识别。可以获得多种能满足这种要求的化学接头。

例如，在 WO 95/08642 中披露了可用于形成接头的化合物和反应的类型的例子。具体地讲，所述化学接头包括将两个多核苷酸序列、引物和探针连接在一起的一组原子。所述接头可以通过任何常规方法连接相应的多核苷酸序列。

一般来说，所述接头来自具有第一和第二官能团的有机化学物质，通过这种方式，它可以分别结合于探针和引物序列，或结合于各个核苷酸，然后再从核苷酸产生所述探针和引物序列。所述接头通常被设计成不能结合核苷酸。

例如，接头的合成详细披露于以下文献中：S. Agrawal 等, *Nucleic Acids Research*, 1986, 14, 6227 和 W088/02004 (*Applied Biosystems*); J. L. Ruth 和 D. E. Bergstrom, *J. Org. Chem.*, 1978, 43, 2870; D. E. Bergstrom 和 M. K. Ogawa, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1978, 100, 8106; 和 C. F. Bigge, P. Kalaritis, J. R. Deck 和 M. P. Mertes, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1980, 102, 2033; 和欧洲专利申请号 063, 879。有关具有连接探针和引物的化学连接基团的试剂的结构和合成的更详细的说明，读者还可以参见国际专利申请号 W001/11078。

具体地讲，所述接头包括多种形式的乙二醇，例如六乙二醇 (HEG)。所述接头可以具有以下结构 $-(\text{CHOH}-\text{CHOH})_n-$ ，其中， n 是大于 1 的整数，例如 1-10，并且优选 6。

所述包括连接探针和引物的接头基团的试剂可以从 Oswel Research Products Ltd, UK 获得。

本发明方法的用途是多种多样的。正如在下文将要更详细地讨论的，所述方法可用于产生有关所述样品中的靶核酸序列的定量和定性

结果。更具体地讲，本发明不仅提供了定量扩增，而且，作为补充或替代，它还可用于获得特征性数据，如双链脱稳定化温度或解链温度。

在本发明的方法中，所述标记过的探针与扩增引物整合，并且在扩增反应过程中一直存在。所述方法使得检测能够以均一的方式进行，就是说，扩增和监测可以在一个容器中进行，所有试剂都是最初添加的。不需要随后的添加试剂的步骤。还可将本发明的方法用于某些非均一系统中。应当指出的是，没有必要在存在固体支持物的情况下实施所述方法（尽管这也是选择方案之一，正如下面将要进一步讨论的）。

由于在整个扩增反应中都存在探针，所述荧光信号使得可以监测扩增反应的进程。这可以提供对存在于样品中的靶序列进行定量的手段。

如果使用荧光受体部分的话，在扩增反应的每一次循环期间，含有靶序列和探针区的扩增子链能产生受体信号。随着样品中所述扩增子数量的增加，受体的信号也会增强。通过将增强速度随循环进行作图，可以确定所述增强的起始点。

所述标记过的探针可以包括核酸分子，如 DNA 或 RNA，它能够与单链形式的靶核酸序列杂交。在这种情况下，将使用的条件使得靶核酸序列成为单链形式。另外，所述探针可以包括诸如肽核酸或其他核酸类似物的分子，它还能结合双链形式的靶序列。

具体地讲，所使用的扩增反应包括让所述样品处于使样品中所存在的所有靶核酸序列成为单链形式的条件，如 PCR 或 LCR 的步骤。如果满足合适的杂交条件，在扩增反应过程中，所述探针区就能够与含有它的扩增子链的下游区杂交。

在一种优选实施方案中，可以设计所述探针，以便在扩增反应的每一次循环期间满足所述条件。因此，在扩增反应的每一次循环的某个时间点上，所述探针能与靶序列杂交，并且由于 FET 或 FRET 而产生信号。随着扩增的进行，所述探针区将会分离或者从所述下游区解链，因此，由所述受体标记发生的信号，将会根据它是含有供体还是受体分子而减弱或增强。例如，当它是受体时，在扩增的每一次循环中，都产生了来自受体标记的荧光峰。随着扩增的进行，所述峰的程度会增强，因为有更多的包括探针的扩增子链可以利用。

通过在每一次循环期间监测来自样品的受体标记的荧光，可以用多种方式监测扩增反应的进程。例如，通过计算解链峰下面的面积，并且将该数据对循环次数作图，可以分析由解链峰提供的数据。

荧光优选是用已知荧光计监测的。来自它的信号，例如，光学放大器电压形式的信号，被传送给数据处理器板，并且转化成与每一个样品试管相关的光谱。可以同时评估多个试管，例如 96 个试管。在反应过程中，能够以频繁的间隔，例如每 10 毫秒 1 次地收集数据。

例如，以这种方式产生的光谱可以使用预先选择的诸如染料的荧光部分的"fits"进行分辨，以便形成代表每一种发出信号的部分的峰（即 DNA 双链体结合试剂和/或探针标记）。可以确定所述峰下面的面积，该面积表示每一种信号的强度值，并且，如果必要的话，作为彼此的商数形式表示。信号强度和/或比例的差别，使得 FET 或 FRET 的变化可以通过反应或不同的反应条件，如温度而记录。上文所述的变化与探针和靶序列之间的结合现象相关。不同的峰下面的面积的积分，可以计算出 FET 或 FRET 作用的强度值。

以上数据提供了一种对存在于样品中的靶核酸的量进行定量的方法。

引物/标记过的探针试剂在溶液中可以是游离的或者固定在固体支持物上，例如固定在用于分离产品的磁珠的珠表面上，或者固定在检测器装置的表面上，如表面等离子共振检测器的波导管，和例如，DNA 阵列。其选择取决于要检验的特定阵列的性质和所采用的特定检测方法。

可以对探针进行设计，以便它能被用于扩增反应中的 DNA 聚合酶水解，以便释放受体分子。由此提供了一种累计性信号，存在于该系统中的游离探针标记的量随着每一次循环而加强。不过，在本测定方法中，所述探针没有必要以这种方式使用，因为所述信号不取决于所述探针的水解。

优选对所述探针进行设计，以便它能从靶序列上完整地释放下来，并且，在扩增反应期间，如果满足了合适的杂交条件，它能够再次结合。例如，这可能发生在扩增反应的延伸阶段。不过，由于所述信号不依赖于探针水解，可以将所述探针设计成能在扩增循环的任何阶段与靶序列杂交并且从靶序列上解链。具体地讲，优选将所述探针

设计成在低于该反应的延伸温度的温度下杂交，因为这样能确保对扩增反应的干扰最小。

这样提供了一种完全可逆的信号，该信号直接与在所述反应的每一阶段存在的扩增产物的数量相关。另外，当反应速度是最重要的时候是有利的，例如，在快速 PCR 中，因为要检测的与扩增子链整合在一起的探针能够与它快速杂交。

以这种方式产生的数据能够以各种方式解读。在它的最简单的形式下，在扩增反应过程中或在扩增反应结束时受体分子荧光的增强是存在的靶序列数量增加的指标，表明扩增反应业已进行的事实，因此，所述靶序列确实存在于所述样品中。不过，正如上文所述，还可以通过监测扩增反应的进程进行定量。最后，可以获得表征数据，并且，特别是在解链温度分析中，作为终点测定或进程测定，以便获得有关所述序列的信号，正如下面将要进一步讨论的。

因此，本发明的一种优选实施方案包括一种用于检测核酸扩增的方法，包括：在存在以下成分的条件下对靶多核苷酸进行核酸扩增：(a) 核酸聚合酶，(b) DNA 双链体结合试剂，和 (c) 含有扩增引物的试剂，该引物能与单链形式的所述靶序列杂交，并且，它的 5' 末端通过化学连接基团与具有第二种标记的探针连接，所述标记过的探针是与所述靶核酸序列相似的序列，以便它能够与扩增产物上的互补区杂交，并且，其中，所述 DNA 双链体结合试剂或第二种标记中的一个包括一种供体标记，该标记能够给所述 DNA 双链体结合试剂或第二种标记中的另一个提供荧光能量，所述 DNA 双链体结合试剂或第二种标记中的另一个包括一种能吸收来自所述供体分子的荧光能量的受体标记，所述引物能够与所述靶多核苷酸杂交；并且在扩增过程中监测荧光的变化。

所述受体标记本身优选是荧光标记，并且能在特征性波长下发射荧光能量。所述扩增优选是用一对引物进行的，所述引物是设计过的，以便只有 DNA 链上的靶核苷酸序列被扩增，正如本领域技术人员所公知的。所述核酸聚合酶优选是热稳定性聚合酶，如 Taq 聚合酶。

实施扩增反应的合适条件为本领域所熟知。在每一种情况下，最佳条件可以根据涉及到的特定扩增子、所使用的引物的性质和所使用的酶而改变。在每一种情况下，最佳条件可以由本领域技术人员来确

定。典型的变性温度为 95℃的数量级，典型的退火温度为 55℃的数量级，而延伸温度为 72℃的数量级。

在本发明的一种优选实施方案中，可以用标记过的探针定量 RNA 转录物，例如，在表达实验中，可将其用于药物发现。具体地讲，本实施方案适合在来自真核生物的组织中进行表达研究。真核细胞中编码蛋白的 DNA 可以包括内含子，DNA 序列的非编码区，以及编码蛋白序列的外显子。在细胞“剪接”过程中，将非编码内含子序列从源于 DNA 序列的 RNA 序列上去掉。PCR 引物通常靶定编码区，并且，在将逆转录酶 PCR 用于总核酸提取物时，产物将来自 DNA 依赖型扩增和 RNA 依赖型扩增。因此，在用于表达研究时，PCR 本身包括来自基因组 DNA 和表达的 RNA 的扩增。

被设计用于跨编码外显子的相邻末端区上的内显子结合的标记过的探针因为所述内含子而具有有限的相互作用。剪接过的 RNA 业已除去了所述区，因为编码外显子的相邻的末端区构成了一个连续序列，使得它能够有效结合所述所述探针区。

相反，如果被设计成能结合内含子区，所述探针区只能检测基因组 DNA 的扩增产物。由这样的探针发生的信号，只与 DNA 浓度相关，而与样品的 RNA 浓度无关。还可以使用两种试剂，每一种试剂具有不同的探针和引物，一种试剂适用于 RNA 的剪接区，而另一种试剂适用于 DNA 中的内含子。

因此，在另一种实施方案中，所述探针区对于 RNA 的剪接区或 DNA 中的内含子是特异的，这样，只检测和/或定量扩增的 RNA 或扩增的 DNA 中的一种。

作为替代或补充，本发明的方法可用于确定序列特征的杂交测定。因此，在另一方面，本发明提供了一种用于确定靶核酸序列特征的方法，该方法包括 (a) 在存在 DNA 双链体结合试剂和一种包括扩增引物的试剂的条件下扩增所述序列，所述引物的 5' 末端通过化学键与一种探针连接，所述探针包括相似于所述靶序列的一个区域的序列，并且它还包括一种标记，当所述 DNA 双链体结合试剂和所述标记中的一个供体标记，而其中的另一个受体标记时，所述供体标记能够向所述受体标记提供荧光能量；以便形成掺入了探针区的扩增产物，(b) 让扩增产物处于使它的探针区与扩增产物的互补区杂交的

条件, 和(c)监测所述样品的荧光, 并且确定特定的反应条件, 所述序列的特征, 在所述条件下, 由于探针区与样品的杂交或在探针区和靶核酸序列之间形成的双链体的脱稳定化而导致荧光变化。

合适的反应条件包括温度, 电化学条件, 或对特定酶或化学物质的存在的反应。通过监测当所述特性改变时荧光的变化, 可以获得所述序列精确性质的特有信息。例如, 对于温度来说, 可以确定由于加热而导致的样品中的探针与所述序列分发生分离的温度。例如, 在检测以及在遗传诊断中需要定量多态性和/或等位变异时是极其有用的。“多态性”包括转换, 颠换, 插入, 缺失或倒位, 这种现象可能发生在序列上, 特别是自然出现的。

如果靶序列仅有一个碱基对的差别的话, 解链的滞后将是不同的。因此, 举例来说, 当一种样品只包括一种等位变体时, 所述探针区的解链温度是特别有价值的, 这一温度不同于在仅含有另一种等位变体的样品中的温度。含有两种等位变体的样品具有相当于每一种等位变体的两个解链点。

因此, 在本发明的其他实施方案中, 提供了一种用于检测多态性和/或等位变异的方法, 所述方法包括用本发明的方法扩增被怀疑含有所述多态性或变异的序列, 用所产生的荧光信号测定探针区从扩增产物中的互补序列上解链的温度, 并且将这种信号与多态性或等位变异的存在相联系。

类似的考虑适用于相应的电化学特征, 或用于某些酶或化学物质的存在。可以将标记过的探针固定在固体表面上, 在该表面上可以施加电化学电位。根据序列的确切性质, 在特定电化学值下, 下游靶序列能够结合在所述探针上或者从所述探针排斥。

另外, 探针杂交的动力学能够以绝对值形式确定靶序列浓度。根据来自所述样品的荧光变化, 可以计算探针区与样品的杂交速度。杂交速度的增加与样品中所存在的靶序列的数量相关。随着靶序列的浓度因为扩增反应的进行而提高, 探针区的杂交将更快地进行。因此, 该参数还可被用作定量的基础。这种数据处理方式是有用的, 因为它不直接依赖于信号强度而提供信息。

在本发明的另一种实施方案中, 提供了一种用于本发明方法中的试剂盒, 该试剂盒包括一种含有扩增引物的试剂, 引物的 5'末端通过

化学键与对靶核苷酸序列特异的探针连接, 其中, 所述探针包括第一种标记, 它可以起着供体或受体标记的作用; 以及包括第二种标记的 DNA 嵌入试剂, 所述第二种标记起着供体或受体标记的作用, 其中, 所述第一和第二种标记构成了供体-受体对。

如果必要的话, 可以将所述探针固定在诸如磁珠的支持物上, 或用于检测器的支持物上, 如消散性波检测器装置的波导管。所述试剂盒的其他可能在的成分, 包括用于扩增反应的试剂, 如 DNA 聚合酶。

非荧光受体分子的使用, 还可用于披露于共同未决的国际专利申请号 PCT/GB99/09054 中的测定方法中。

下面将结合附图, 以举例形式对本发明作具体说明, 其中:

图 1 示意性地表示在本发明方法中发生的分子相互作用。

图 2 表示用本发明的方法通过 F3 检测器测定的荧光, 它是各种浓度的人 DNA 的 β -肌动蛋白系统的循环次数的函数。

图 3 表示用比较性现有技术的方法通过 F3 检测器测定的荧光, 它是各种浓度的人 DNA 的 β -肌动蛋白系统的循环次数的函数。

图 4 表示用现有技术的 Taqman™方法通过 F1 检测器测定的荧光, 它是各种浓度的人 DNA 的 β -肌动蛋白系统的循环次数的函数。

图 5 表示用本发明的方法通过 F3 检测器测定的荧光, 它是各种浓度的脑膜炎基因的脑膜炎系统的循环次数的函数。

图 6 表示用比较性现有技术方法通过 F3 检测器测定的荧光, 它是各种浓度的脑膜炎基因的脑膜炎系统的循环次数的函数。

图 7 表示用现有技术的 Taqman™方法通过 F1 检测器测定的荧光, 它是各种浓度的脑膜炎基因的脑膜炎系统的循环次数的函数。

图 8 表示用本发明的方法通过 F3 检测器测定的荧光, 它是各种浓度衣原体基因的衣原体系统的循环次数的函数。

图 9 表示用现有技术的 Taqman™方法通过 F1 检测器测定的荧光, 它是各种浓度的衣原体基因的衣原体系统的循环次数的函数。

图 10 表示用本发明的方法通过 F3 检测器测定的荧光, 它是各种浓度的修饰基因的遗传修饰过的大豆系统的循环次数的函数。和

图 11 表示用现有技术的 Taqman™方法通过 F1 检测器测定的荧光, 它是各种浓度的修饰基因的 GM 大豆系统的循环次数的函数。

图 1 示意性地表示在本发明方法中发生的分子相互作用。在所示

出的扩增反应中，制备了 DNA 分子（1），以便通过让它与成对的扩增引物（2），（3）接触进行扩增。通过化学键（8）将引物之一（2）与包括受体标记（7）的探针（6）连接。在反应混合物中提供荧光供体成分（10）。

使 DNA 分子（1）成为单链形式（图 1B），以便在扩增反应中，引物（2，3）分别作为正向和反向引物结合，正如众所周知的。

在随后的扩增反应过程中，积累了扩增子产物（9）（图 1C）。

在随后的扩增阶段，当该产物解链时，探针区（6）包括一个结合扩增子链中的互补区的受体标记（7）。嵌入剂部分（10）被夹杂在探针和所述产物之间。荧光嵌入剂部分（10）和受体标记（7）之间的 FRET 相互作用，在所述受体的特有波长下产生了一种信号。

然后可以用常规荧光检测装置监测来自受体分子（7）的信号。

本领域技术人员可以理解的是，对于本发明来说，使用第二种引物（3）不是必要的。另外，本领域技术人员可以理解的是，所述探针上的标记可以是供体标记，而所述嵌入剂部分可以是受体标记。

PCR 扩增反应

制备了含有具有工作浓度的以下试剂的 PCR 反应混合物。

其组成是：

50mM Trizma pH 8.8, 25℃，3mM 氯化镁，8% w/Vol. 甘油，250ng/μl 非乙酰化牛血清白蛋白，200 μM dNTP's PCR 核苷酸，0.01 单位/μl 尿嘧啶-n-糖基化酶，0.04 单位/μl Taq（外切 5'-3' 缺陷型）DNA 聚合酶和 0.03 μM 抗 TaqStart 抗-Taq 抗体。

在添加到所述混合物中之前，将 Taq DNA 聚合酶和 TaqStart 抗-Taq 抗体一起温育 10 分钟。

作为荧光供体标记，将 SYBRGold 添加到反应混合物中，最终浓度为参考溶液的 1: 20,000 - 1: 200,000 的稀释度。

使用 Taq DNA 聚合酶以便确保所述试剂在反应过程中不会被水解。发现这种聚合酶的使用不是必须的，因为在本发明的方法中使用了非常短的保持时间。

靶模板

研究了若干种靶模板和相关的基因。下面列举了这些靶模板的基

因。

靶模板	基因
人胎盘 DNA	ABI 人 β -肌动蛋白扩增子
大豆	Le1 凝集素
遗传修饰过的大豆	CP4 EPSPS
脑膜炎奈瑟氏菌	PorA
沙眼衣原体	Ct 质粒

为每一种靶基因制备了包括探针和引物的常规新型寡核苷酸试剂。每一种试剂具有以下一般性结构：FL-PROBE-HEG-PRIMER，其中，FL 是荧光部分，PROBE 是探针序列，HEG 是 HEG（六乙二醇），而 PRIMER 是引物序列，它能与合适的靶序列杂交。所述试剂可以从 Oswel Research Products Ltd., UK 获得。用于本发明方法中具有相同的一般性结构的试剂可以按照 W001/11078 中披露的方法制备。

下面列举了相应于每一种基因的试剂的结构：

基因试剂结构

肌动蛋白 \$atgccctcccccatgccatcctgcgt*cagcggaaccgctcattgccaatgg (Seq No.1)
 凝集素 \$tgcccttctttctcgcaccaattgaca*cctgcattgtgtttgtggctt (Seq. No.2)
 CP4 \$cccttcattgttcggcggtctcgc*atgcgcgtttcaccgct (Seq. No.3)
 PorA \$tcagcggcagcgctccaattcg*acttgctgttttgggccc (Seq. No.4)
 PorA \$ccaaacgcacttccgccatcg*tcagccaagcggccagac (Seq. No.5)
 Ct \$tatgcttacacattttatcgactgggtgattacagc*ttttcgtctcttttttcgcagc (Seq.No.6)

\$-5' Cy5 标记

*-HEG 连接基团

根据需要，改变要检测的基因序列的浓度。所述试剂的最终浓度为 0.2 μ M。

通过使用类似的 Taqman™测定方法和 W099/28500 的方法重复所述实验，比较本发明方法和现有方法的性能。

热循环实时 PCR 容器和消耗品是从 Roche 公司获得的。用常规技术对该仪器进行校正。发现用特定产品和 SYBRGold 运行颜色校正程

序是非常有利的。还发现用 Cy5 运行颜色校正程序是有利的。

热循环方案如下:

对于本发明的方法和 W099/28500 的方法来说:

50℃, 保持 1 分钟, 以便进行抑制

95℃, 保持 1 分钟, 以便开始变性

50 轮 (95℃, 5 秒; 60℃, 5 秒; 74℃ 5 秒, 5 秒延伸, 收集荧光)

对于 Taqman™来说:

50℃, 保持 1 分钟, 以便进行抑制

95℃, 保持 1 分钟, 以便开始变性

50 轮 (95℃, 5 秒; 60℃, 20-120 秒; 在步骤结束时收集荧光)

以上结果表明, 本发明的方法明显快于使用现有 Taqman™分析的方法。

所述热循环 PCR 仪使用 3 个检测器, 它们是 F1, F2 和 F3。F1 在 520nm 波长下工作, 优化而检测 SYBRGold 和荧光素的发射。F2 在 640nm 波长下工作, 优化而检测 LC640 产生的信号。F3 在 705nm 波长下工作, 优化而与 LC705 一起使用。

F1 (520nm/荧光素) 光学检测器, 被用于检测由 SYBRGold 嵌入染料所产生的非链特异性扩增信号。F3 (705nm/LC705 染料) 光学检测器被用于使用由探针的 Cy5 部分产生的信号检测特异产物的扩增。所述探针系统使用 Cy5, 而不是 LC705, 因为这样在寡核苷酸合成期间能产生更好的结合染料。

实施例 1-β-激动蛋白基因的检测和定量

图 2 表示通过 F3 检测器测定的荧光, 它是用本发明的方法作为各种浓度的人 DNA 的 β-肌动蛋白系统的循环次数的函数形式测定的。每一组数据表示特定循环次数的低水平的本底反应, 它取决于所述样品内的 DNA 浓度。在每一组数据内, 所观察到的荧光在某些循环次数下显著增强, 这取决于样品中人 DNA 的浓度。荧光是通过结合于引物下游的扩增产物的所述试剂的探针部分产生的。这一结合过程使 Cy5 部分靠近了 SYBRGold。SYBRGold 发出荧光, 所发射的光线被 Cy5 部分吸收。然后, Cy5 本身发射光线, 由 F3 检测器检测所发出的光线。

随着循环次数的进一步增加，荧光达到最大值，然后缓慢减弱。这种现象被认为是由于所述探针部分被扩增产物所取代（通常称之为“钩子效应”，这种现象还出现在双杂交探针报导化学中）而导致的。

对图 2A 的数据组进行分析，产生了图 2B 所示的定量曲线。所述曲线的相关系数接近 1.0，这表明本发明的方法在核酸序列的定量和鉴定方面是很出色的。

图 3 表示用 W099/28500 的测定方法获得的 β -肌动蛋白基因的比较数据。图 3A 表示以循环次数的函数形式测定的荧光。对于 β -肌动蛋白系统来说，是作为 DNA 浓度的函数形式测定的。通过现有系统获得的数据的噪音，比通过本发明方法获得的数据的噪音更高。另外，使用本发明的方法，反应梯度更陡，并且使用本发明的方法，循环阈值同样略低一些。通过比较图 2B 和 3B 证实了这一发现。

图 4 表示用现有方法通过 Taqman™测定获得的比较数据。与本发明的曲线相比，其反应曲线相对矮一些。此外，与本发明的方法相比，Taqman™方法非常慢。

实施例 2- porA 基因的鉴定和定量

图 5 表示用本发明的方法通过 F3 检测器测定的作为各种浓度的人 DNA 的脑膜炎系统的循环次数的函数的荧光。所示出的数据使用了具有 Seq. No.5 的结构试剂。每一组数据表示特定循环次数的低水平的本底反应，取决于样品内 DNA 的浓度。在每一组数据中，观察到的荧光在特定循环次数下急剧增强，这取决于样品中人 DNA 的浓度。

图 6 表示用 W099/28500 的测定方法获得的 porA 基因的比较数据。

图 7 表示用现有技术的 Taqman™方法获得的比较数据。同样，与本发明的曲线相比，所述反应曲线较矮。另外，与本发明的方法相比，Taqman™方法非常缓慢。与本发明的方法相比，Taqman™反应曲线的噪音较大，并且由所述数据产生的定量曲线产生了更低的相关系数。

实施例 3-Ct 质粒 DNA 的鉴定和定量

图 8 表示用本发明的方法通过 F3 检测器测定的作为各种浓度的人 DNA 的衣原体系统的循环次数的函数的荧光。每一组数据表示特定循环次数的低水平本底反应，取决于样品内 DNA 的浓度。在每一组数

据中，观察到的荧光在特定循环次数下急剧增强，这取决于样品中DNA的浓度。

图9表示用现有技术的Taqman™方法获得的数据。同样，与本发明的方法相比，Taqman™方法非常缓慢。

实施例4-CP4 EPSPS基因的鉴定和定量

图10表示用本发明的方法通过F3检测器测定的作为各种浓度修饰基因的遗传修饰过的大豆系统的循环次数的函数的荧光。该图还示出了由lect系统产生的荧光。它是各种浓度的所述修饰基因的循环次数的函数。在每一组数据中，所观察到的荧光在特定循环次数下急剧增强，这取决于样品中相关基因的浓度。所述lect系统可有效用作对照，正如所预料的，荧光和循环次数的反应曲线实际上不取决于所述修饰基因的浓度。对于修饰基因系统来说，可以看出的是，修饰基因浓度的提高导致了荧光急剧增强所需要的循环次数的减少。

图11表示用现有技术的Taqman™方法获得的比较数据。同样，与本发明的曲线相比，所述反应曲线较矮。另外，与本发明的方法相比，Taqman™方法非常缓慢。

应当指出的是，实际上在所有场合下，用现有技术的Taqman™方法获得的数据的噪音都比用本发明方法获得的数据的噪音高。另外，反应曲线也比本发明的反应矮，并且用本发明方法获得的数据所产生的定量曲线与Taqman™方法获得的曲线相比，具有更高的相关系数。

本发明还提供了一种有可能非常快速的方法。本文所提供的本发明方法的数据，是使用设备在最快的可能工作模式下获得的。人们认为，较短的探针长度有助于产生快速反应。因此，预计本发明方法的速度受实施该方法的仪器的现有参数的制约。

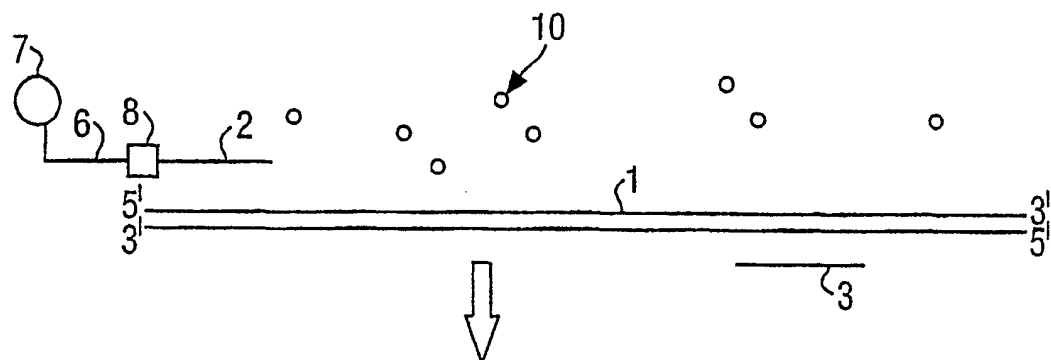


图 1A

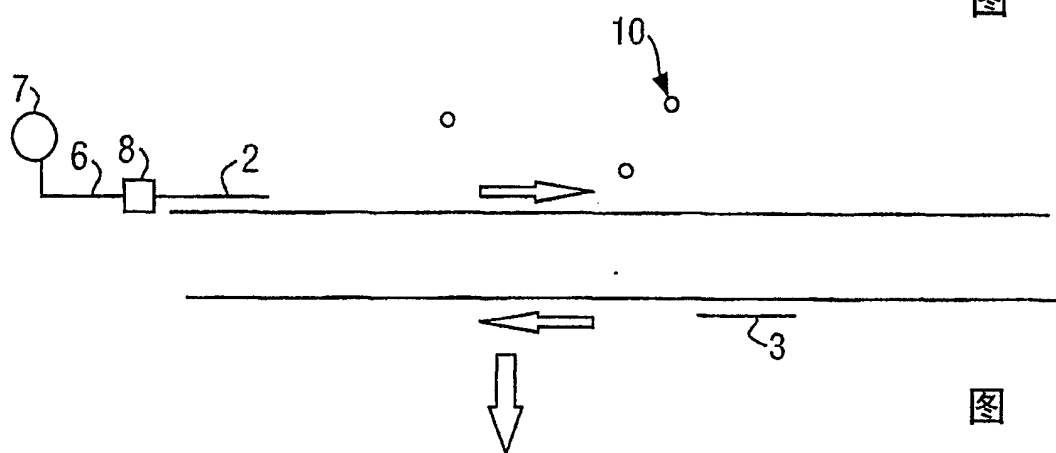


图 1B

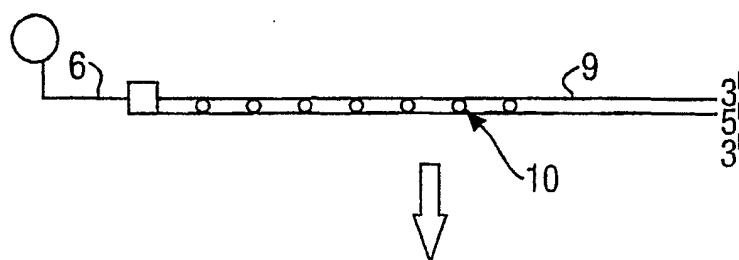


图 1C

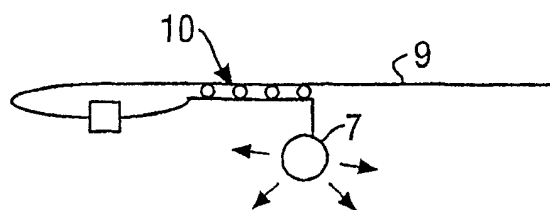
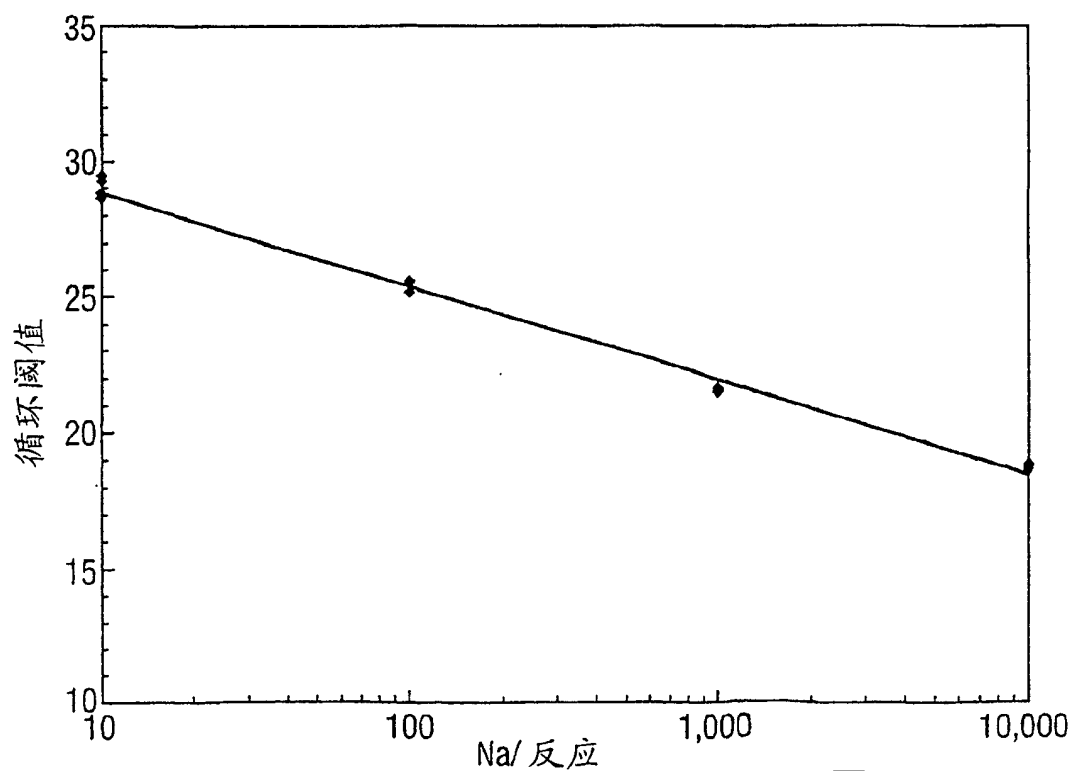
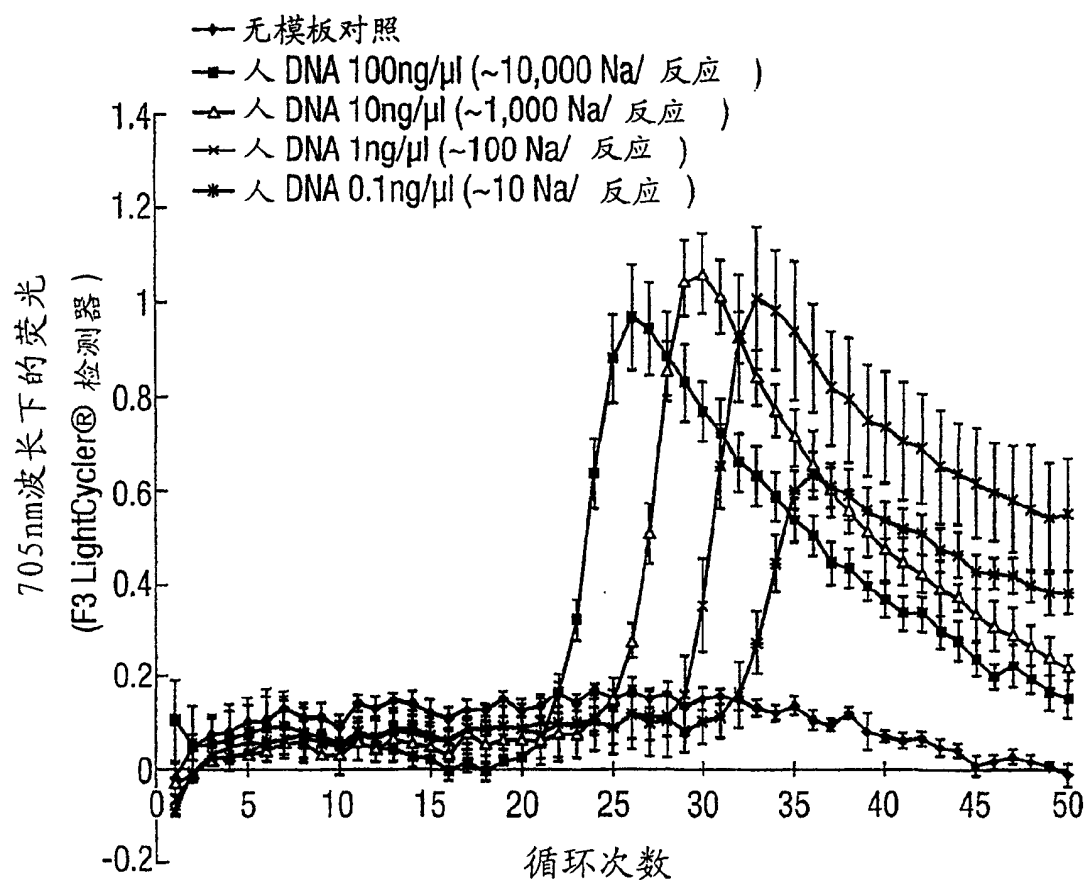
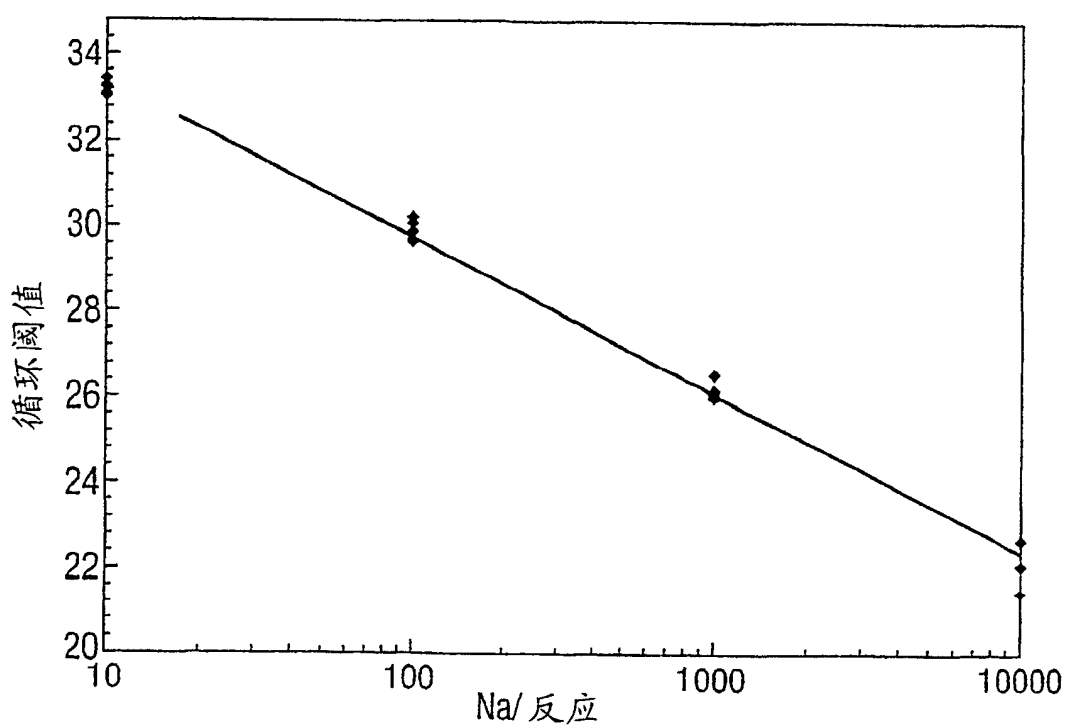
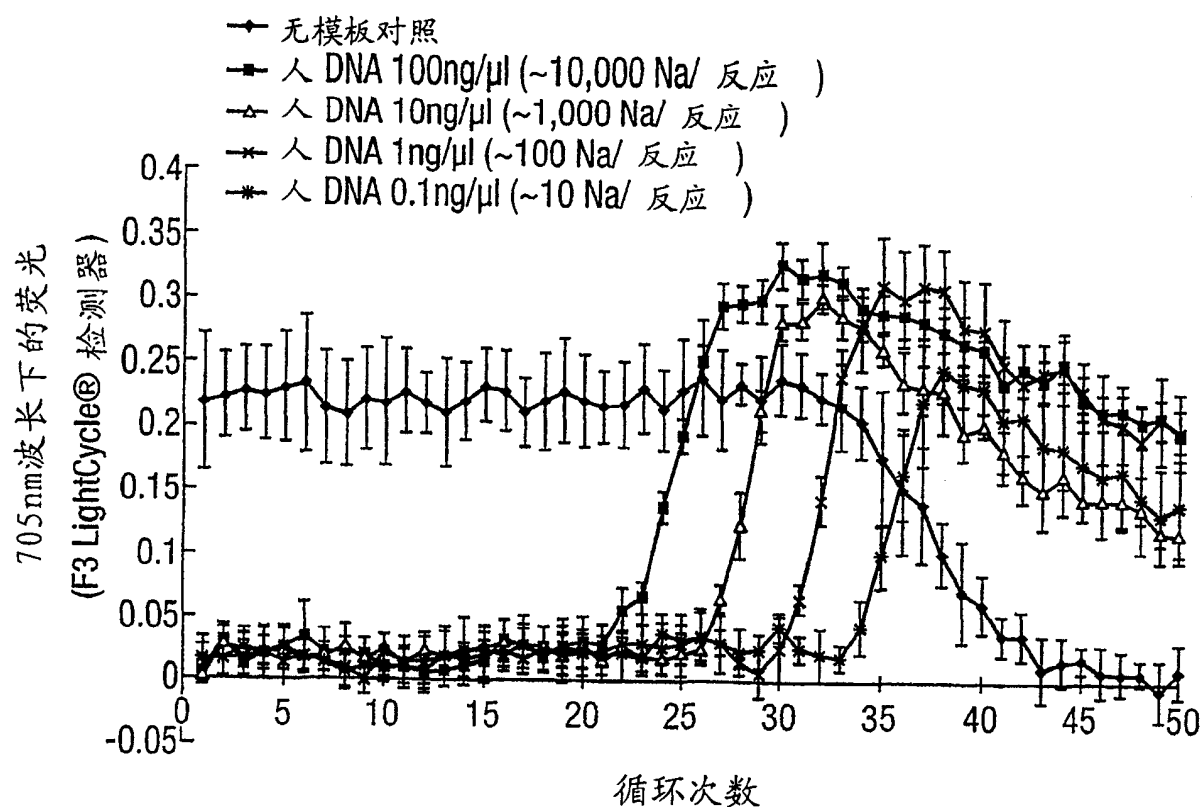


图 1D





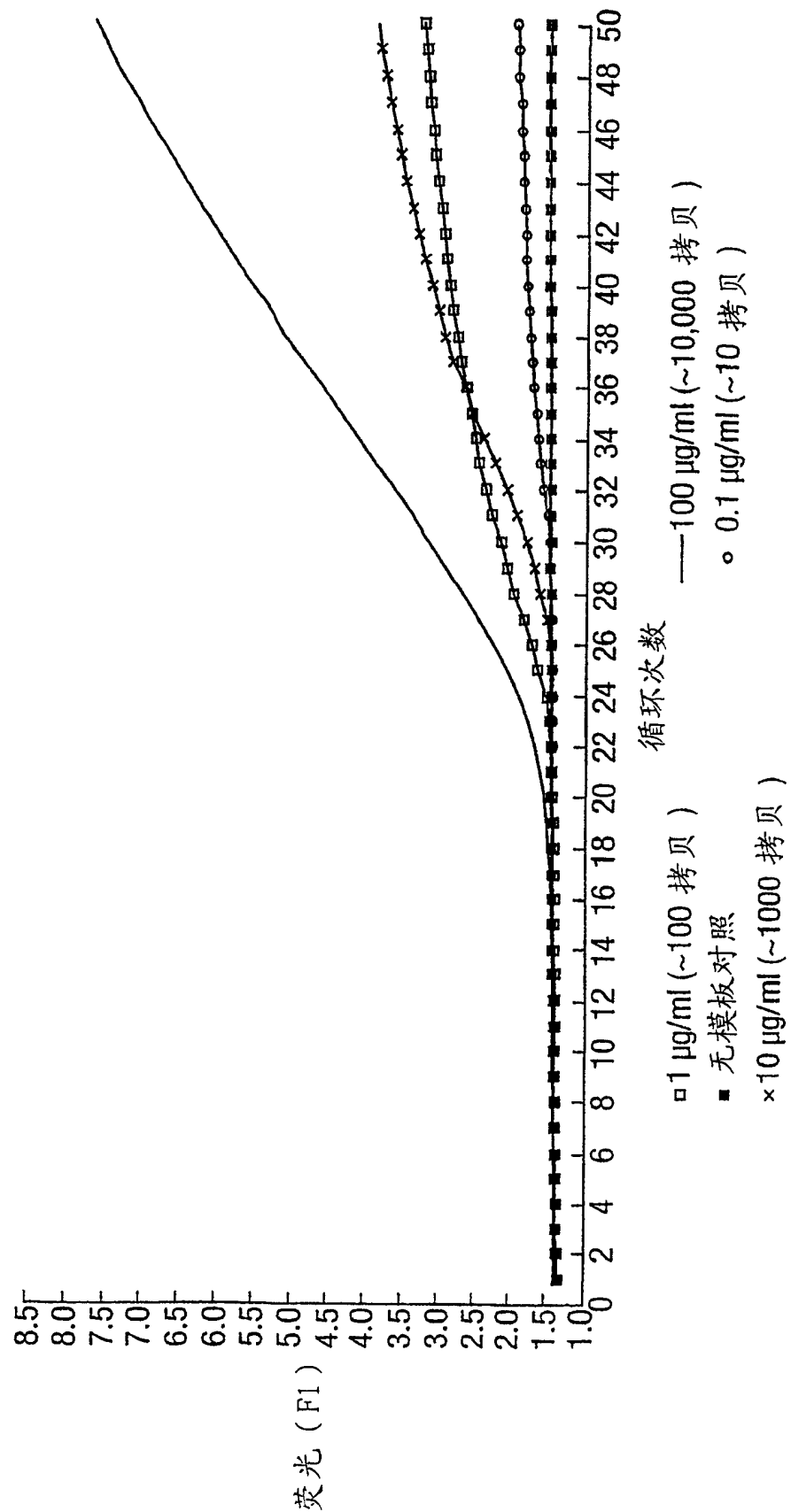


图 4

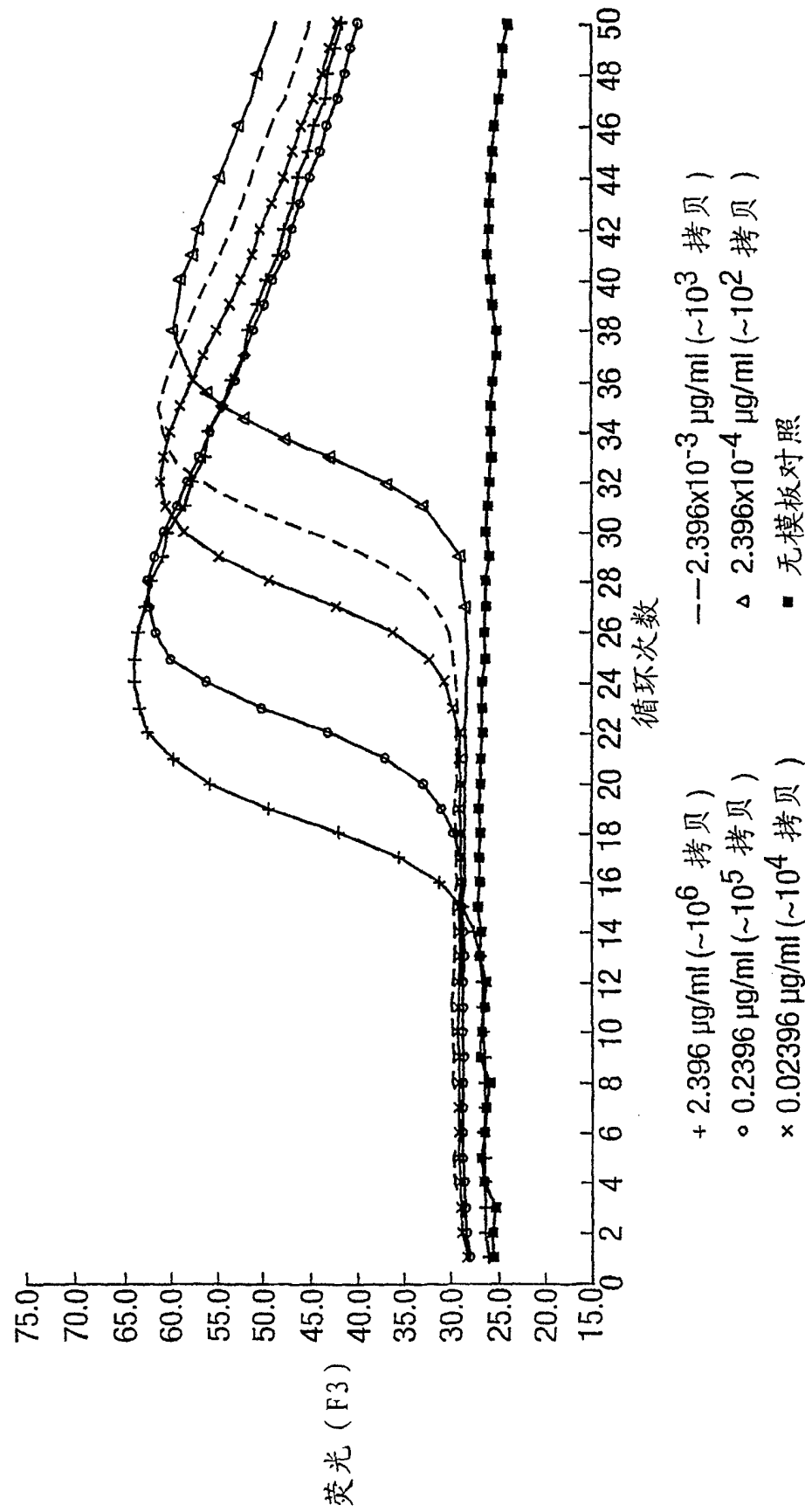


图 5

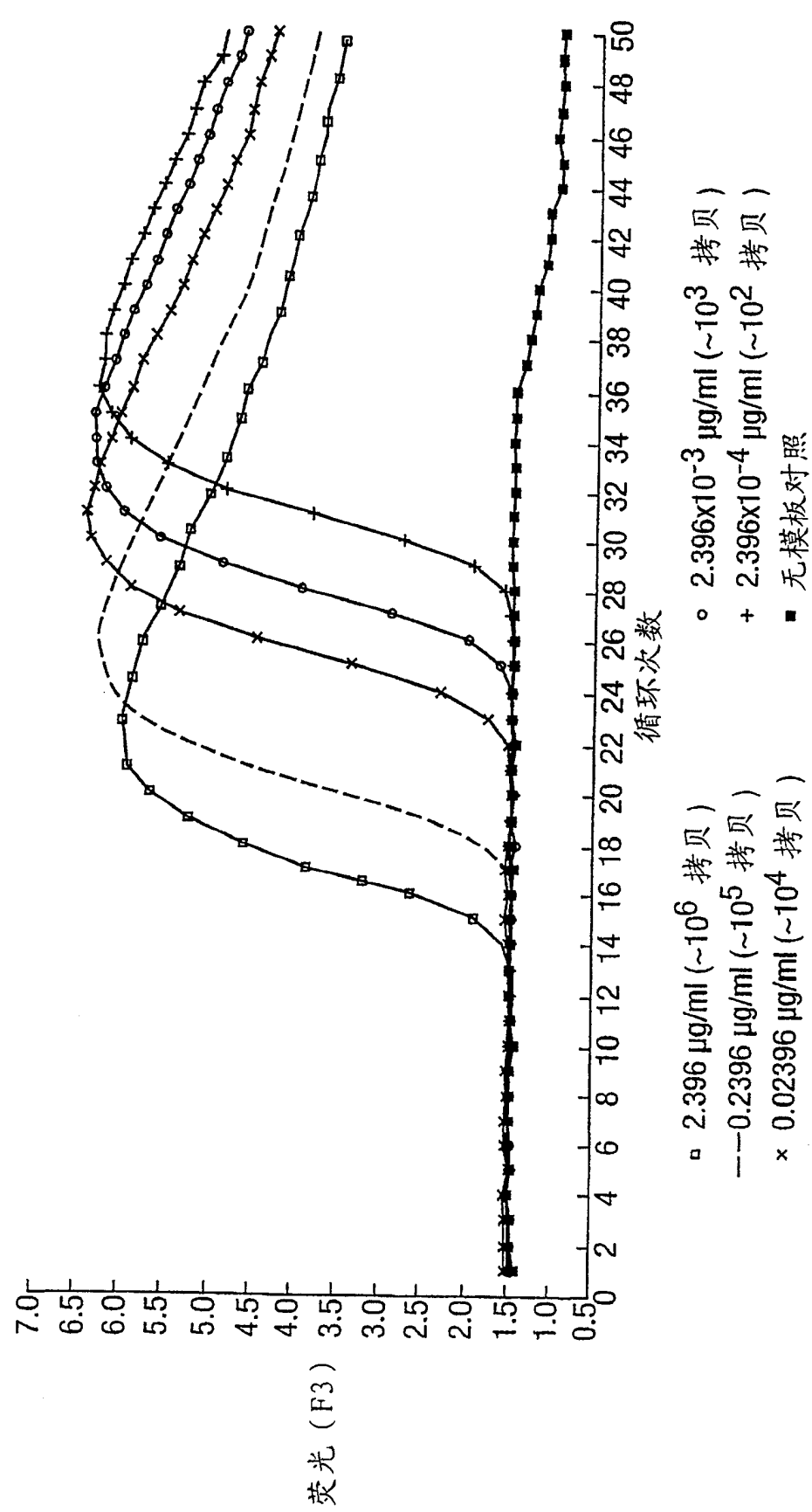


图 6

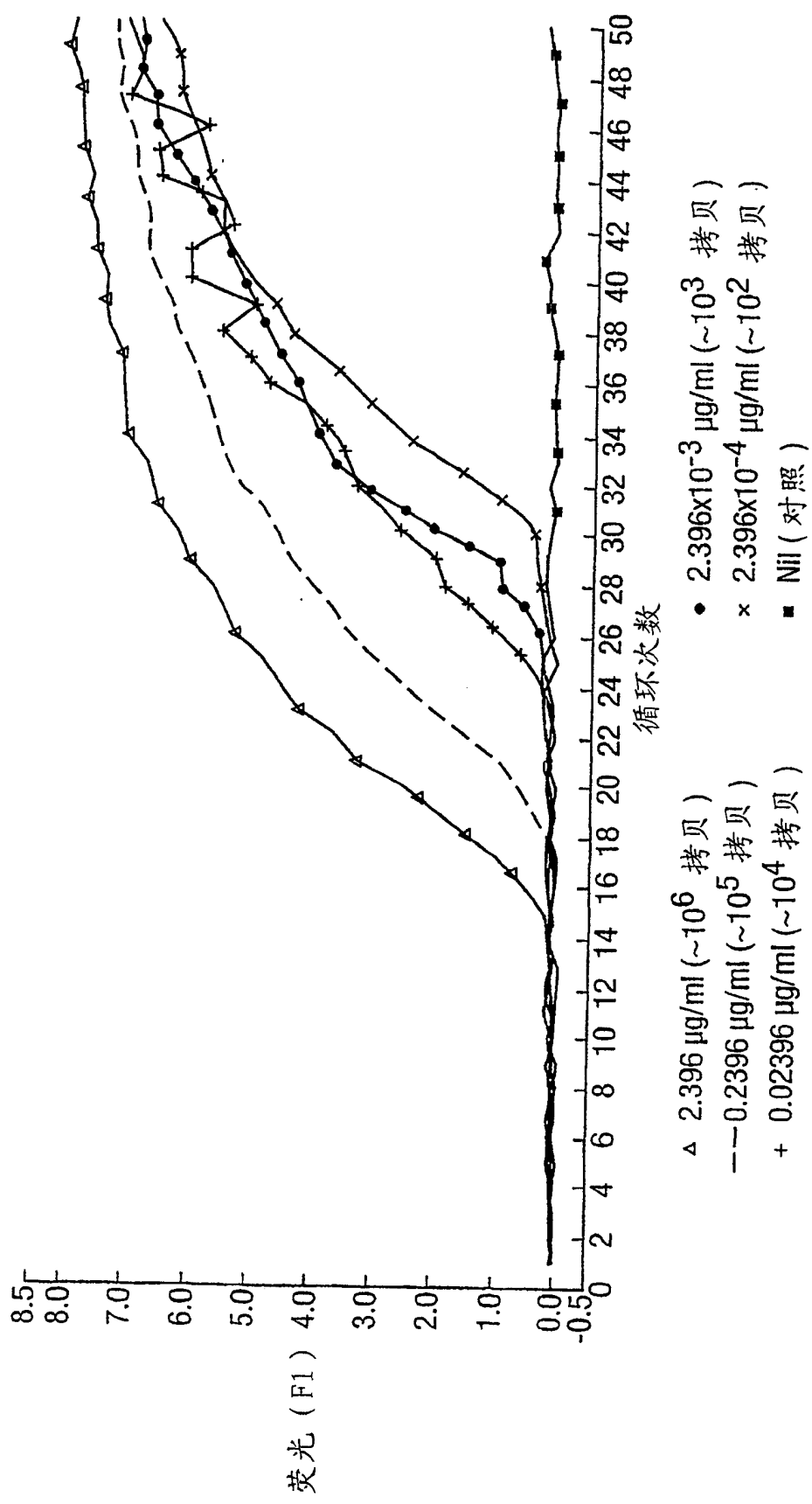


图 7

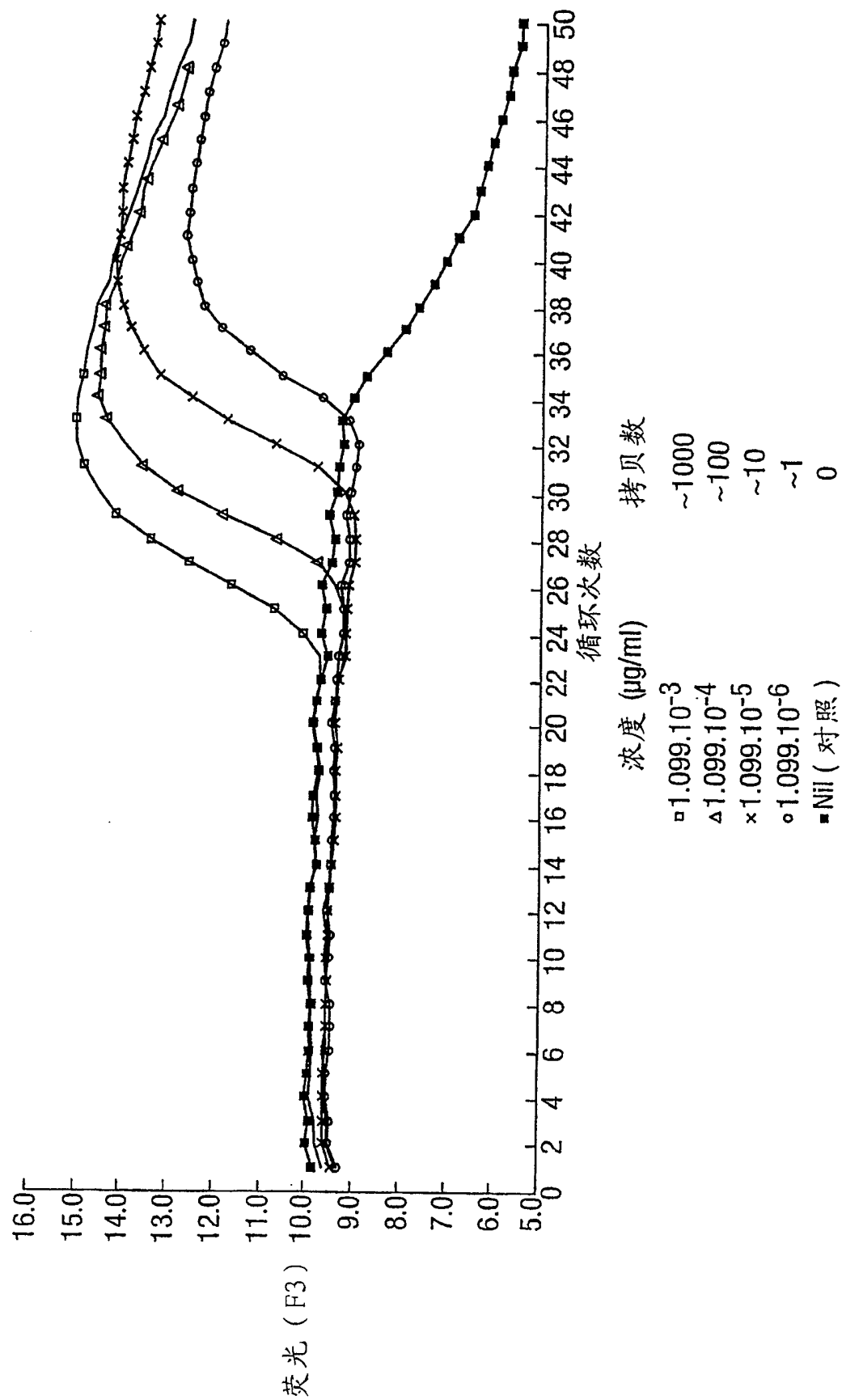


图 8

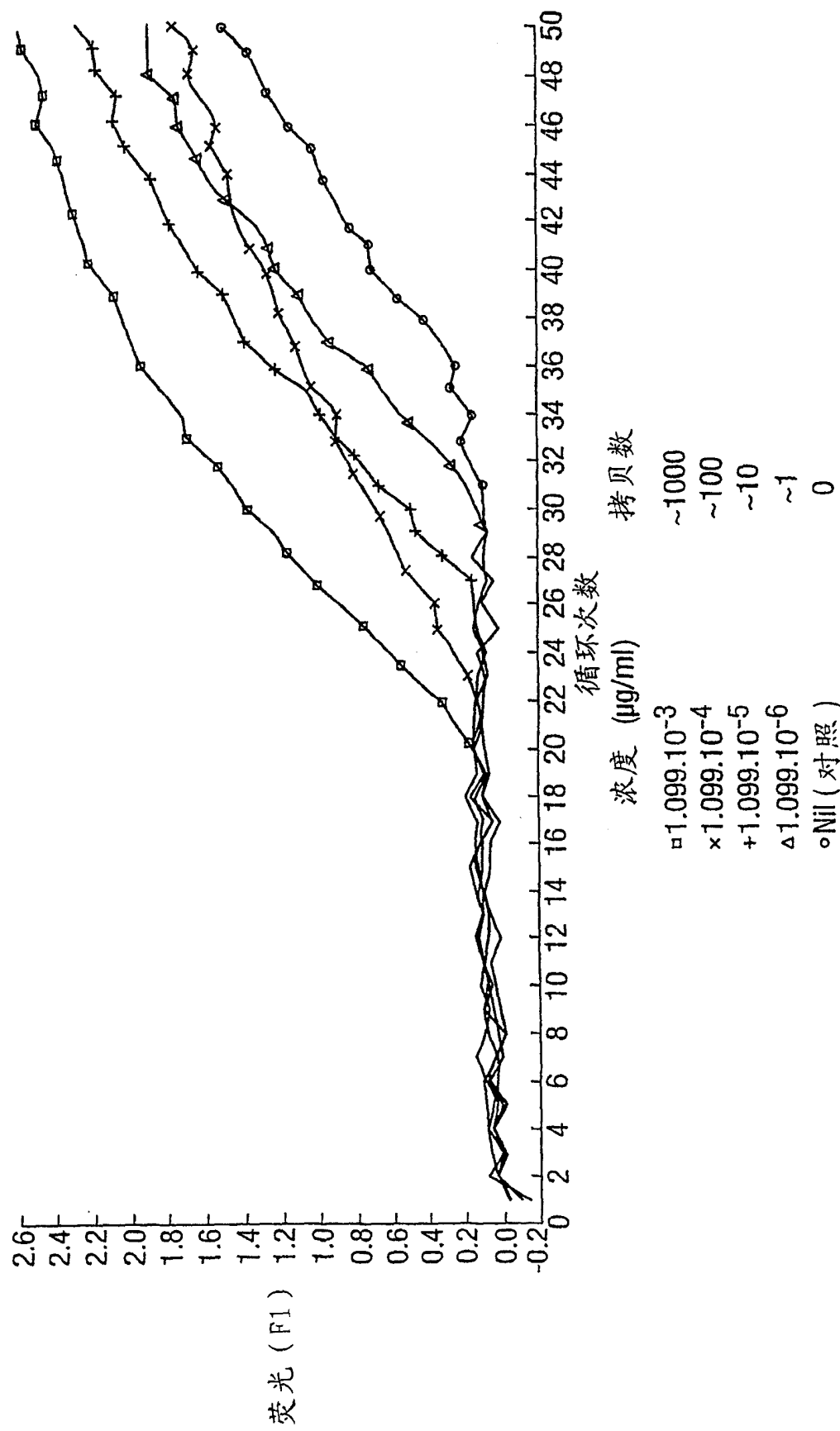


图 9

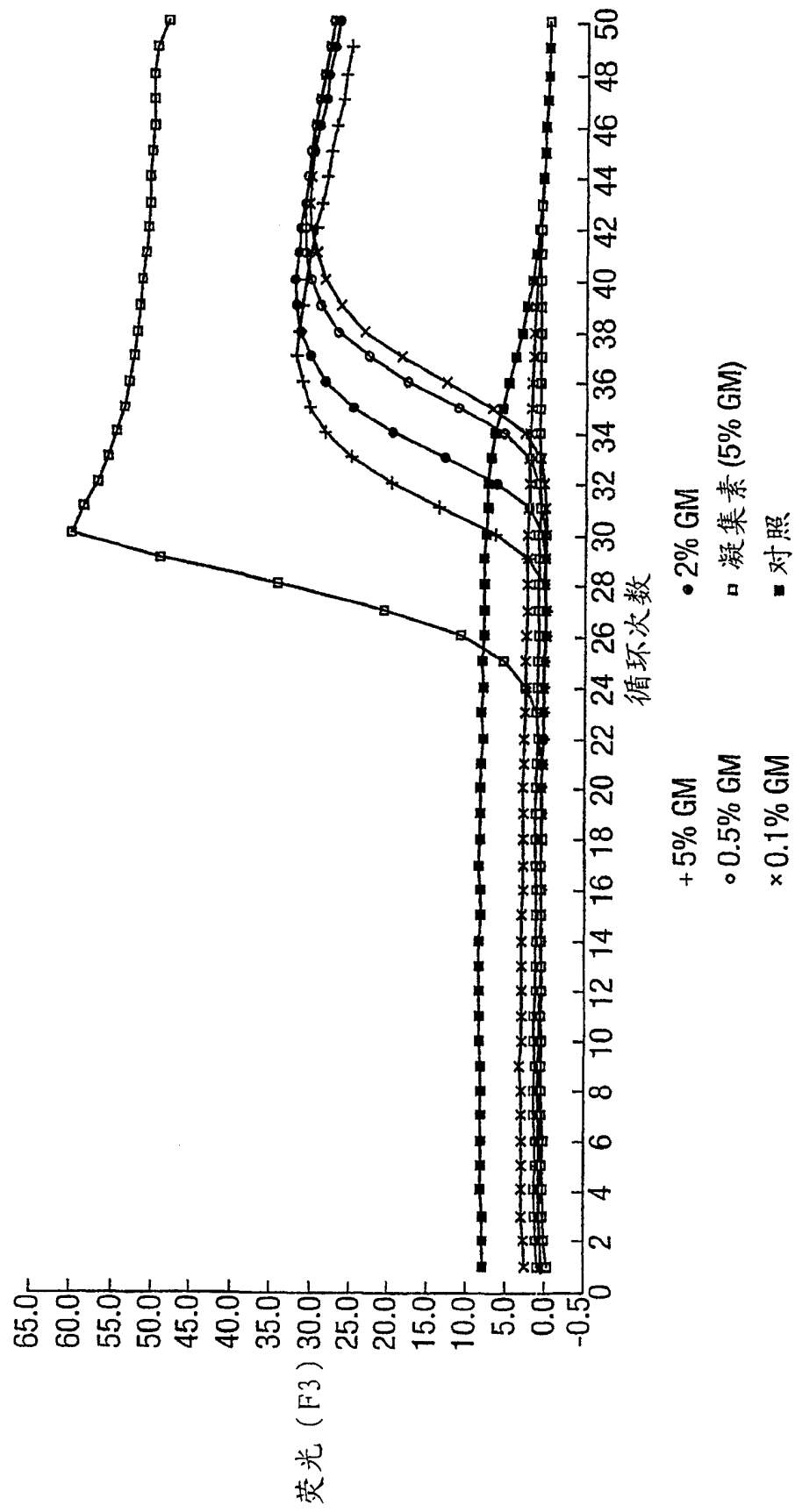


图 10

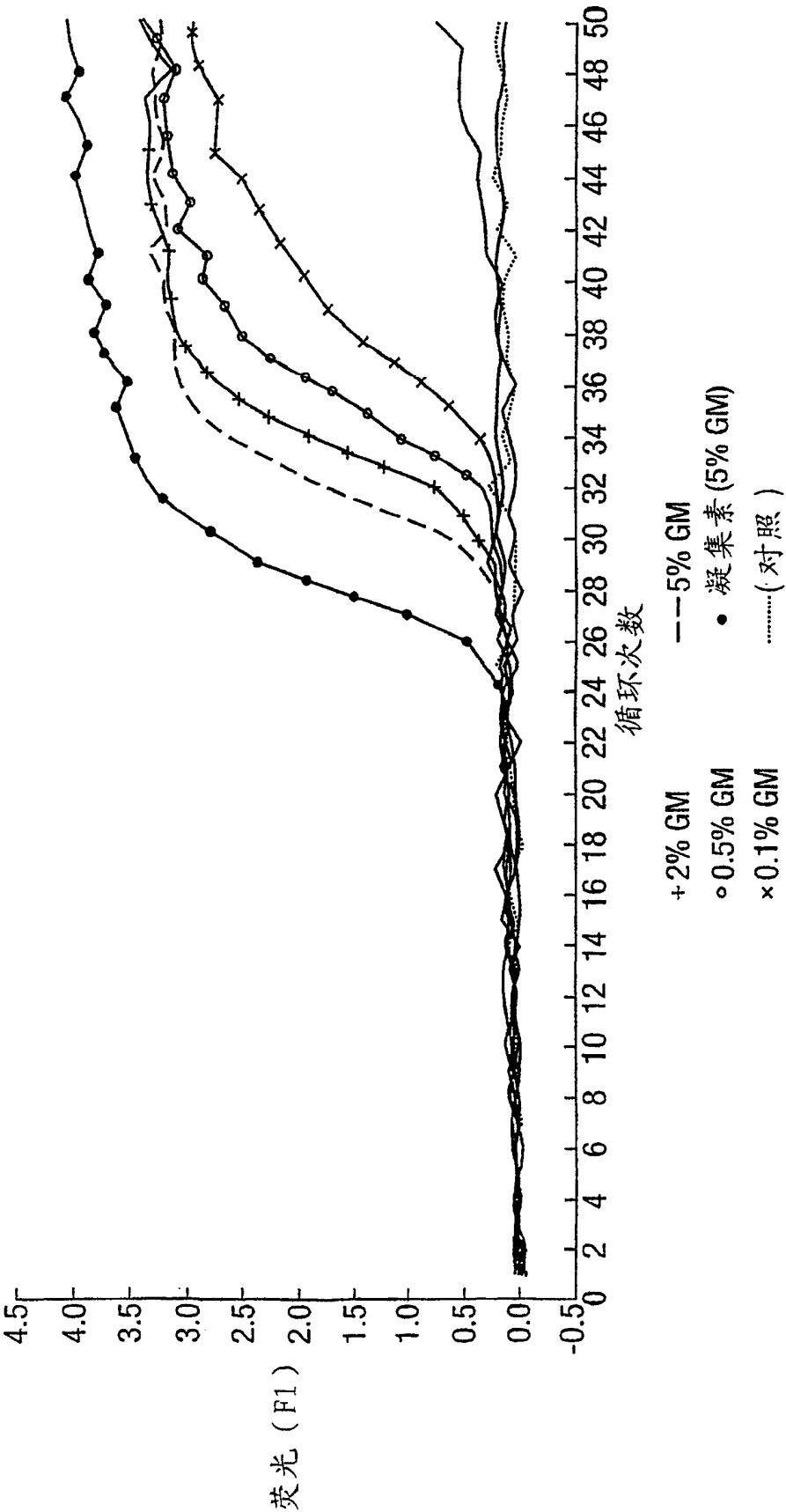


图 11