[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C12Q 1/68
G01N 21/64

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94115790.3

[45]授权公告日 2002 年 9 月 11 日

[11]授权公告号 CN 1090679C

[22]申请日 1994.8.26
[21]申请号 94115790.3
[30]优先权
[32]1993.8.27 [33]US [31]113168
[32]1994.7.5 [33]US [31]266061
[73]专利权人 PE 公司(NY)
地址 美国康涅狄格州
[72]发明人 R·G·樋口 R·M·沃特森
[56]参考文献
EP0512334 1992. 1. 1
WO92/05278 1992. 1. 1
审查员 孙广秀

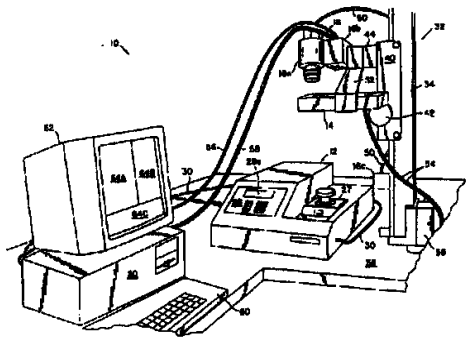
[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 程天正 叶恺东

权利要求书 4 页 说明书 38 页 附图页数 18 页

[54]发明名称 同时监测多个扩增反应并对其进行分析

[57]摘要

本发明涉及同时监测多个核酸扩增反应的装置。为了提供对多个 核酸扩增反应的扩增产物的同时的实时监测。本发明装置的特征在于 它包括在其中形成了多个凹陷的导热构件的热循环仪(12)和用于同时检测由所说凹陷发出的光的传感器(16a)。



ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1.一种用于同时监测多个核酸扩增反应的装置，其特征在于包括:

(a)一个包括在其中形成了多个凹陷的导热构件的热循环仪;

(b)一个光源，该光源在光学上与所说的热循环仪相联，并且被安排使光分布到导热构件的多个凹陷上;

(c)一个用于同时检测由所说多个凹陷发射出的光的传感器。

2.根据权利要求 1 的装置，其特征在于，它还包括用于产生由所说传感器检测到的与每一光发射凹陷有关的光的平均值的装置。

3.根据权利要求 1 的装置，其特征在于，还包括:

(a)根据预选的温度对时间的曲线而使所说导热构件进行温度循环的装置;

(b)多个核酸扩增反应混合物，每一个所说的混合物含有一种荧光结合剂，并被置于一个不同的所说凹陷中；并且

所说的光源向多个所说的反应混合物提供了基本均匀的光通量；和

所说的传感器在光学上与所说的多个反应混合物相联，以同时检测来自被所说各个反应混合物发出的荧光。

4.根据权利要求 3 的装置，其特征在于，它还包括用于在被检测荧光的基础上产生每一被激发的反应混合物的平均荧光强度值的装置。

5.根据权利要求 4 的装置，其特征在于，它还包括由所说的平均荧光强度值产生规范化的荧光强度值的装置。

6.根据权利要求 1 的装置，其特征在于，

所说的热循环仪导热构件的凹陷是通过其一个表面而形成的，用于接纳有核酸扩增反应混合物的反应管；

所说的传感器是一个在光学上与所说导热构件相联的成像装置，用于在所说反应管置于所说导热构件的凹陷中时产生所说表面和反应管的图像。

7.根据权利要求 6 的装置，其特征在于，包括一个在所说导热构件表面上方提供光的光源。

8.根据权利要求 7 的装置，其特征在于，其中所说的光源被安排成使光沿着所说导热构件表面基本均匀地分布。

9.根据权利要求 7 的装置，其特征在于，其中所说的光源包括 UV 灯。

10.根据权利要求 6 的装置，其特征在于，其中所说的成像装置包括 CCD 成像阵列。

11.根据权利要求 1 的装置，其特征在于，所说的热循环仪的导热构件中形成了多个凹陷，这些凹陷适宜接纳核酸扩增反应混合物；并且

所说装置还包括:

位于所说导热构件上方并与所说热循环仪相联的套壳；

被安排成用于在所说套壳中朝向所说多个凹陷发光的光源；

置于所说套壳中并光学上与光源和多个凹陷相联的双色镜，所说的双色镜透射具有预定第一波长的光并反射具有不同于第一预定波长的第二预定波长的光；和

所说的传感器与所述双色镜光学上相关并被安排成用于接收由所说双色镜的所说第二表面反射的光。

12.根据权利要求 11 的装置，其特征在于，其中所说的第一预定波长相应于由光源产生的光的波长，而第二预定波长相应于由当混合

物置于其中一个凹陷并暴露在来自光源的光时由核酸扩增反应发射的光波长，镜透射具有相当于激发光源产生的光波波长的光，并在核酸扩增反应混合物被置于其中一个所说凹陷中且暴露在光源发射的光中时反射具有相当于从所说混合物发射的荧光波长的光。

13.根据权利要求 11 的装置，其特征在于，其中所说的第一预定波长约是 220-550nm 。

14.根据权利要求 11 的装置，其特征在于，其中所说的套壳包括不透明的材料，并被构造成为一个在其中安放所说双色镜和传感器的不透光室。

15.根据权利要求 11 的装置，其特征在于，其中所说的导热构件具有一个上表面，而所说的双色镜与所说的上表面形成约 45° 角。

16.根据权利要求 11 的装置，其特征在于，其中所说的传感器包括一个电荷耦合器件(CCD).

17.根据权利要求 11 的装置，其特征在于，还包括用来在预选时间间隔调节凹陷对光源曝光的快门.

18.根据权利要求 11 的装置，其特征在于，还包括具有透明材料和与其相联接的加热元件的窗，所说的窗置于凹陷和双色镜之间。

19.根据权利要求 11 的装置，其特征在于，还包括一个位于所说双色镜和所说传感器之间的向场镜。

20.根据权利要求 11 的装置，其特征在于，还包括与所说传感器相联的滤光器轮.

21.根据权利要求 1 的装置，其特征在于，所说的热循环仪的导热构件中形成了多个凹陷，这些凹陷适于接纳包括核酸序列和荧光结合剂的核酸扩增反应混合物；以及

所说装置还包括:

位于所说导热构件上方并与所说热循环仪相联的套壳;

被安排成用于在所说套壳中发光的光源;

被安排在所说的套壳中的传感器;和

置于所说套壳中所说凹陷上的双色镜,所说双色镜透射具有相当于激发光源产生的光波波长的光,并在包括荧光结合剂的核酸扩增反应混合物被置于导热构件中形成的凹陷之一且暴露于从激发光源发出的光中时,反射具有相当于从所说混合物发出的荧光波长的光,所说的双色镜的取向是使得在所说凹陷和所说传感器之间形成光路。

22.根据权利要求21的装置,其特征在于,其中所说的双色镜包括第一表面和第二表面,所说的第一表面在总体上面对所说的光源,所说的第二表面在总体上面对所说的凹陷和传感器。

说　明　书

同时监测多个扩增反应并对其进行分析

本发明涉及核酸（ＤＮＡ或ＲＮＡ）扩增反应的检测，更确切地说，是涉及同时实时监测多个核酸扩增反应。本发明还涉及利用累积的数据测定一种或多种混合物中的靶核酸序列起始浓度数量并在反应动力学基础上监测多种扩增反应条件下的效果的方法。

人们已知各种检测核酸扩增反应的方法。例如，已知的大量检定法是测定聚合酶链反应（ＰＣＲ）中起始ＤＮＡ模板的数量。一些方法涉及在温度热循环之末检测ＰＣＲ产物，并使该检测水平与起始ＤＮＡ浓度相联系。这种利用ＰＣＲ典型地进行的“终点”分析反映了靶ＤＮＡ的存在与否，但一般不能提供一种检测ＤＮＡ靶起始数量的适用方法。

其它的测定法包括应用一种竞争性扩增反应产物，其模板以已知浓度在热循环前加至反应混合物中。在竞争性产物方案中，利用凝胶电泳检测扩增反应的等份试样。检测靶特异性的和竞争性的ＰＣＲ产物的相对含量，再用该比值计算靶模板的起始数量。靶特异性产物与竞争特异性产物的比值越大，则起始ＤＮＡ的浓度越高。

除了需要诸如杂交或凝胶电泳这类“下游”加工处理外，这些其它的测定法更多地局限于动力学范围(即对靶核酸浓度范围的灵敏度)。在竞争物测定中，当靶ＤＮＡ或加入的竞争物ＤＮＡ的量远远超过对方时，对模板浓度差别的灵敏度将受到损害。检测终产物含量的测定

法之动力学范围也可能被限定在一个选定的循环数，这时一些反应可以达到产物产生的“平台”水平。因而这些反应中起始模板水平的差别不能很好地被反映出来。而且，在检测到的产物含量间的微小差别会对起始模板浓度的估计产生很大的改变，导致因可变的反应条件、供样的变化或抑制剂的存在而产生极不精确的结果。

ＰＣＲ反应条件的最优化典型地是通过检测不同条件对终产率的影响及ＰＣＲ产物特异性来完成的。为了获取整个扩增反应过程中的信息，将许多复制样品置于热循环仪中，以使在不同的温度循环时可从热循环仪中取出各个样品 。被取出的试管然后经凝胶电泳进行分析以了解循环数的作用。正如从本文的描述中显而易见的，这种优化既复杂又耗时，因为它需要大量的样品操作步骤及后续的电泳分析。

任何企图大规模（如临床上）应用的测定不仅应该可行，而且应该尽可能地简化以便于其自动化。因此，需要有一种收集指示核酸扩增反应数据的装置和方法，例如能用于定量测定样品的起始浓度和优化反应的条件，并能提供可靠的结果及适于自动化。

本发明的目的是提供一种核酸扩增反应检测方法和装置，它能够同时实时地监测多个扩增反应混合物的扩增反应，并因此克服现有技术中存在的问题和不足。

根据本发明，上述目的是借助一个其特征在于包括下列组成部分的装置来实现的：

一个具有其中形成了多个凹陷的导热构件的热循环仪；

一个用于同时检测由所说凹陷发射出的光的传感器。

在优选的实施方案中，本发明的装置还进一步包括一个光源，它在光学上与所说的热循环仪相连，并将光线分散到具有所说凹陷的导

热构件的一部分上。

在另一个本发明装置的优选方案中，所说的热循环仪的导热构件上的凹陷是通过其表面形成的，用于接纳含有核酸扩增反应混合物的反应管；所说的传感器是与上述导热构件在光学上相联的成像装置，用于将该反应管置于所说导热构件的凹陷中时形成上述表面和反应管的像。

在本发明装置更进一步优选的实施方案中，所说的热循环仪导热构件中形成有多个凹陷，适于接纳核酸扩增反应混合物，该装置进一步包括：

位于所说导热构件上方并与所说热循环仪相联的套壳；

用于在所说套壳中朝所说凹陷发光的光源；

位于套壳中所说凹陷上方的双色镜，它透射第一波长的光而反射不同于第一波长的第二波长的光；并且

所说的传感器用于接受由所说双色镜的第二表面反射的光。

在本发明装置的进一步优选的实施方案中，所说的热循环仪导热构件形成了多个凹陷，并适于接纳包括核酸序列和荧光结合剂的核酸扩增反应混合物，该装置进一步包括：

位于所说导热构件上方并与所说热循环仪相联的套壳；

在所说套壳中发光的光源；

位于所说套壳中的传感器；

位于所说套壳中所说凹陷上方的双色镜，当将含有荧光结合剂的核酸扩增反应混合物置于导热构件上形成的一个凹陷中并使之暴露于激发光源的光线下时，双色镜将透射相当于激发光源产生的光波的波长的光，并反射相当于由所说混合物发射的荧光波长的光，所说的双

色镜的取向是能在所说凹陷和所说传感器之间 形成光路。

在本发明装置的一个实施方案中，利用最初导入每一扩增反应混合物中可检测荧光染料荧光的增加，ＣＣＤ摄像机可同时检测 进行的多个聚合酶链反应中每一反应的双链ＤＮＡ（dsDNA） 的积累。所说的荧光由结合双螺旋ＤＮＡ的荧光染料产生。该实施方案有利于消除对光纤管的需要以及与将光纤和各个反应混合物相耦合所带来的问题。

根据本发明的另一方面，光学系统将光源的激发光移至作为本装置一部分的热循环仪中被扩增的多个反应混合物中，该光学系统要这样构造使它以均匀的方式给反应混合物提供激发光。这就是说，该光学系统允许激发光被基本均匀地分散在热循环仪的热交换器上，以使每一种扩增反应混合物都接受基本相同量的激发光。

利用本发明的装置能够收集荧光数据，并用于定量测定靶核酸序列的起始含量。在进行定量测定的优选方法中提供了多个扩增反应混合物。一种扩增反应混合物具有未知浓度的特异性核酸序列。另外的反应混合物包括具有不同的但却是已知浓度的相同特异性核酸序列。已知和未知核酸浓度的扩增反应混合物并行地进行多次循环的热循环。实时地监测由反应混合物发出的荧光，并确定每一反应混合物发出某一强度值的荧光所需的循环数。将能达到某强度值的未知核酸浓度混合物所需的循环数与能达到某强度值的已知核酸浓度混合物所需的循环数相比较，得到未知浓度的混合物中所说特异性核酸序列的起始含量。

已经发现，因为扩增反应是被实时地监测的，所以灵敏度范围达到至少 6 个数量级的靶核酸浓度是可能的。另外，可以获得对在40,000个细胞等同物的复合基因组ＤＮＡ背景中少至100 ssDNA 模板

的灵敏度。

本发明进一步还有利于提供处理荧光数据以可靠地分析不同反应条件对扩增反应动力学影响的方法。因为多个扩增反应同时被监测，所以可以迅速地确定许多不同反应变量的影响。这对于优化扩增反应条件以得到最佳产率和效率是有用的。

实时监测还产生能检测ＰＣＲ的部分抑制的情况的优点，这种部分抑制能极大地影响精确定量测定的能力。如图１０Ｄ所示，这些抑制情况可由其反应过程检测，使得这些样品可被重新纯化并再次测试。另外，有可能导致样本中不存在靶核酸这一错误结论的完全性抑制也能被检测出，因为存在这样的可能性，甚至连不含靶ＤＮＡ的ＰＣＲ也将由于非特异性扩增反应产物而在给定足够的循环下产生荧光。如果由预定的循环不能看见荧光，则可推断存在抑制剂。

本发明进一步的优点在于免除了在扩增反应结束时进行额外耗时的操作以确定多个反应的产率的需要。因此，例如可以避免需要后续的杂交或凝胶电泳。

尽管在图 2 和图 3 中说明的本发明的非光纤实施方案具有如上所述的许多优点，但传感器（作为该传感器最好是视频摄像机）应定位在与导热构件中的反应混合物相距相当远之处，以最大程度地减少视差。因此，为了提供均匀的光照和避免传感器视觉上的干扰，光源也应与导热构件中的反应混合物相距较远。这种安排一般需要一个相当大小的空间，从而又需要使本发明装置配有一个完整的暗室。然而，许多临床实验室没有暗室，或者没有额外的空间用于构建暗室。尽管在临床实验室容易见到的Ｘ光室能够给激发光和荧光发射的光路提供一个适宜的环境，但这些Ｘ光室内的空间基本上完全由Ｘ光设备占据。

根据本发明进一步的实施方案，将激发光和荧光感受结构合并入本发明的装置中以致于激发光和荧光发射的光路能够折转，从而使装置更紧凑并使得被包围在不透光环境中的光路简化。利用这种方式，本发明装置易于在工作台上使用而无需暗室。

根据上述实施方案，用于同时监测多个核酸扩增反应的装置包括一个具有导热构件的热循环仪，所说的导热构件包括所形成的用于接纳核酸扩增反应混合物多个凹陷。在导热构件上有一个套壳以形成一个不透光室。光源用于在套壳室内发光以激发置于其中的扩增反应混合物，双色镜置于套壳内的凹陷的上方。双色镜透射具有第一波长的光而反射具有不同于第一波长的第二波长的光。在优选实施方案中，所说的镜子是低通双色镜（low pass dichroic mirror）。所说的双色镜的构造是这样的，对相当于光源产生的光波波长而言它是透明的或能透射的，并且 在暴露于激发光时它反射具有相当于由扩增反应混合物发出的荧光波长的光。另外，也可以选择使用高通双色镜（high pass dichroic mirror）。在这种情况下，双色镜反射相当于光源产生的光波波长的光，并且在暴露于激发光时是透明的或透射相当于由扩增反应混合物发出的荧光波长的光。传感器也用于在套壳中感受扩增反应混合物发出的荧光。在用低通双色镜的情况下，传感器用于接受双色镜反射的荧光。然而，在用高通双色镜的情况下，传感器与光源的设置位置相反。

以这种安排，激发光源和传感器可与导热构件较近地放置，例如相距 6 － 1 2 英寸，以使激发光源与荧光发射的光路占有较小的空间。这种安排的紧凑性便于在套壳中封闭住光路，该套壳与热循环仪相联以有效地形成一个对于激发光和扩增反应混合物发射光的不透光室或

暗室。利用这种方式，本发明的装置几乎随处可用，无需给装置配备暗室。套壳进一步还有利于防止外来光传至传感器，所说的外来光来自例如由装置所用双色镜发出的光和与热循环仪及计算机设备相关的ＬＥＤ（发光二极管）。

将传感器与放置核酸扩增反应混合物的导热构件靠近放置的进一步优点在于能够降低对传感器灵敏度的要求。因为将传感器移至距导热构件更近，由反应混合物发出的光和到达传感器的光的强度则增加。据此，当如优选实施方案中利用ＣＣＤ摄像机型传感器时，可用具有可接受的低光响应和低热噪音的廉价ＣＣＤ摄像机以代替在灵敏度要求更高时通常需要的较昂贵的冷却型ＣＣＤ摄像机。

使光源与反应混合物凹陷靠得很近也具有优点。通过将光源移至更靠近反应混合物凹陷，到达置于凹陷中反应混合物的激发光的强度增加，由此提高了荧光发射的强度。利用这种方式，较小浓度的靶序列可在热循环的较早期被检测出。此外，通过荧光强度的某种加强就可以利用具有更窄通频带的滤光器而换取更好的波长分辨率。利用这种方式，可检测更宽范围的波长，并能区分具有非常相近波长的各个标记。

根据上述实施方案的另一方面，把一个快门与光源相联，间歇地使反应混合物在激发光下曝光。最好是将快门定时，使它在通常显示最强荧光的退火／延伸阶段使混合物在激发光下曝光。这种构组方式减少了混合物或样本在激发光下的曝光，所说的激发光因非常靠近导热构件而可能非常强。通过最大程度地减少样品在一般为紫外光组也可为其它波长的光的激发光下的曝光，提高了样品的稳定性，因而使快门改善了系统性能。另外，强烈的激发光能引起样品的光失敏

(photo - deactivation)， 这一现象通常被称为“漂白”。

根据上述实施方案的另一方面，把一向场透镜置于双色镜和传感器之间，以便最大程度地减小穿过其间的视场的视差。

本发明进一步的有利特征是包括一个加热窗，它紧靠导热构件上方，实际上能够置于装有扩增反应混合物的试管上。加热窗允许光从中透过，又能防止反应管散热，这有助于维持混合物所需的热循环温度分布并最大地减少回流。根据优选实施方案。加热窗维持在变性温度上，一般约为９５－１０５℃。

滤光器或滤光器轮最好与传感器相联，以使传感器能选择性地检测不同波长的光。滤光器也能阻止激发光到达传感器上。通过应用多个滤光器（它们可设在一个滤光器轮上），滤光器在特定的退火／延伸阶段中易于变换，以使得能监测例如不同的均质核酸酶探针（如下所述）发射的不同波长。因此，可以监测指定样品中发射的不同波长和核酸序列，并确定靶序列的存在。

另外，系统的高灵敏度允许对所产生的荧光进行非常精确的检测，这种检测是应用例如Gelfand 等人的美国专利US 5,210,015中所述的均匀测定系统进行的，所引专利文献并入本文作为参考。所说的测定系统利用核酸聚合酶5′→3′核酸酶活性裂解由被杂交探针的靶双链退火的和带标记的寡核苷酸，并释放出带标记的寡核苷酸片段以用于检测。该测定特别适用于在相同的扩增反应混合物中检测多个靶核酸。在有非特异性扩增反应产物时这类探针也用于证实靶核酸的存在。

均匀性测定应用这类探针，其荧光通常由荧光能量转移(或FET)至第二标记而淬灭。ＤＮＡ聚合酶的5′核酸酶活性使荧光团与探针和淬灭剂分隔开，破坏ＦＥＴ并恢复荧光。检测这种变化不需处理，它

可以用包含了双色镜的本发明监测装置观察到。这些探针如果用不同的荧光团标记的话，可用于检测多个靶核酸。

以下是用于本说明书中的术语。所附的定义是有助于公开而非限制本发明。

术语“靶核酸序列”是指纯化或部分纯化的待扩增核酸。

术语“扩增反应混合物”是指含有用于扩增靶核酸的各种试剂的水溶液，包括酶、缓冲水溶液、盐、扩增反应引物、靶核酸和三磷酸核苷。根据上下文，混合物可以是完全的或不完全的扩增反应混合物。

术语“引物”是指在一定条件下与核酸模板一起退火时能作为ＤＮＡ合成起点的寡核苷酸，在所说的条件，即存在4种不同的三磷酸核苷酸和溶于适宜缓冲液（ｐＨ、离子强度、辅因子等）中的ＤＮＡ聚合酶及适当的温度下，启动了引物延伸产物的合成。

术语“模板”是指与引物退火的靶核酸序列的一部分。

以上是对现有技术中的一些缺点和本发明优点进行的简单描述。

从下文的描述、附图及所附权利要求中本领域的技术人员将明显地看到本发明的其它特征、优点和实施方案。

图1图示说明对ＰＣＲ进行连续和实时监测；

图1Ａ是图1中线1Ａ内区域的放大图；

图2是与本发明原理一致的扩增反应装置的透视图；

图3是图1中热循环仪的部分放大，用以说明热循环仪的热交换器板和它的盖板；

图4是图2所示装置的方块图；

图5表示多个反应混合物的数字化图像的例子；

图6说明进行取平均的被选择像素阵列，它用以获得单个荧光值；

图 7 表示循环至循环荧光读数的漂移；

图 8 A 表示多个荧光图；

图 8 B 表示规范化后图 8 A 的荧光值；

图 8 C 表示图 8 A 和图 8 B 中荧光图所代表的扩增反应产物的凝胶电泳；

图 9 表示起始模板拷贝数的对数与达到某选定荧光值所需循环数之间的线性关系；

图 1 0 A － D 代表反应条件改变的影响；

图 1 1 － 1 3 是获得荧光值步骤的简化流程图；

图 1 4 是本发明扩增反应装置的透视图，以局部剖视说明激发光和发射光／荧光检测器装置的又一实施方案；

图 1 5 是局部剖视的图 1 4 中激发光和发射光／荧光检测器装置的放大图；

图 1 6 表示反映按照本发明原理构造的双色镜的透射率对波长的代表性曲线；

图 1 7 是本发明含有反应混合物的反应管上部加热窗顶视图。

本发明涉及核酸的扩增反应和扩增反应产物的检测、监测及定量测定。为了便于理解本发明的扩增反应数据的收集和处理系统，首先将讨论特别适于与本发明联用的核酸扩增反应方法的概况。

熟练的技术人员们将认识到，本发明需要核酸双链形式的扩增反应。现已存在多种用于扩增核酸的熟知方法。用于扩增反应的方法并非关键，本发明将与任何能产生核酸双链的方法一起得以实施。各种方法已有综述(见Bio／Technology 8 : 290 - 293, April 1990)，所引文献并入本文作为参考。这些方法包括但不限于 P C R 、 L C R 、

Qβ和3SR。尽管3SR和Qβ不涉及热循环，但其扩增反应的结果可用下文讨论的荧光检测装置监测，并依据本发明的原理进行分析。所说的每种方法简述如下。

DNA的PCR扩增反应包括热变性DNA，两个寡核苷酸引物与侧接待扩增DNA片段的序列退火以及用DNA聚合酶延伸退火的引物这三个阶段的重复循环。引物与靶序列的相反链杂交，并以能使得用聚合酶进行的DNA合成跨越引物间的区域来取向，每一连续的循环基本上能使前一循环中合成的DNA量倍增。这将导致特异性靶片段以约2n／循环的速度（n为循环数）指数式积累。PCR技术的完整综述可见于：PCR Technology: Principles and Applications, Ed. Erlich H. A., Stockton Press, New York 1989。

当PCR与本发明结合应用时要优选使用Taq DNA聚合酶，尽管这并非本发明的必要方面。Taq 聚合酶是一种热稳定性聚合酶，在高温下保持活性。US 4,889,818公开了制备Taq 的方法，该文献并入本文作为参考。然而，由其它的栖热菌种或非栖热菌种(例如Thermus thermophilus 或 Thermotoga maritima）分离出的其它热稳定聚合酶以及非热稳定聚合酶如T4 DNA聚合酶、T7 DNA聚合酶、E. coli DNA 聚合酶或 E. coli 的 Klenow 片段也可用于PCR中。国际专利申请WO－A－91／09950和WO－A－92／03556 中提供了获得热稳定聚合酶的方法，所引这些文献并入本文作为参考。

国际专利申请WO 89／09835 描述了连接酶链反应，该文献并入本文作为参考。该方法涉及应用连接酶以便连接与靶核酸退火的寡核苷酸片段。连接酶链反应（LCR）导致原始靶分子的扩增，并提

供数百万个拷贝的产物ＤＮＡ。因此，ＬＣＲ引起双链ＤＮＡ的净增。本发明检测法可用于ＬＣＲ，也可用于ＰＣＲ。ＬＣＲ一般需要检测产物ＤＮＡ的某些手段，如一个寡核苷酸探针。当与公开的检测扩增反应产物的方法结合应用时，不需要这类手段，ＬＣＲ结果立即可测。

另一种扩增方案，即Ｑβ复制酶，开发了ＲＮＡ噬菌体Ｑβ的复制酶的应用。在这一扩增方案中，最初将经修饰具有针对靶序列特异性的序列的重组噬菌体基因组与待测试的核酸相连。待噬菌体探针与样品中核酸间形成的双链富集后，加入Ｑβ复制酶，依照对被保留重组基因组的识别，开始制备大量的拷贝。

Ｑβ系统不需要引物序列，也不象用ＰＣＲ和ＬＣＲ扩增系统存在热变性步骤。反应一般发生在一个温度，如３７℃。优选的模板是Ｑβ复制酶的底物midvariant - 1 RNA。通过应用Ｑβ系统可使模板量极大地增加。有关该扩增系统的综述可见于国际专利申请ＷＯ 87/06270 和 Lizardi等人，1988, Bio / Technology 6: 1197 - 1202。

３ＳＲ系统是以体外转录为基础的扩增系统的一种变化形式。以转录为基础的扩增系统（ＴＡＳ）包括应用引物来对启动子序列以及与靶链互补的序列进行编码，以产生靶链的ＤＮＡ拷贝，并用ＲＮＡ聚合酶由所说的ＤＮＡ拷贝生产ＲＮＡ拷贝。参见US 4,683,202的实施例９Ｂ和ＥＰ－Ａ－ 0,310,229。３ＳＲ系统是一个利用三种酶进行靶核酸的等热复制的系统。

该系统以与Ｔ７ RNA DNA 引物相连的单链ＲＮＡ靶开始。通过用逆转录酶延伸引物，形成cDNA，而RNAseH处理使cDNA从异源双链中游离出来。第二引物与cDNA相连，双链cDNA由逆转录酶处理而形成。一种或两种引物编码启动子（例如Ｔ７ＲＮＡ聚合酶的启动子），以

致于双链cDNA成为ＲＮＡ聚合酶的转录模板。

转录感受态cDNA产生原始靶的反义ＲＮＡ拷贝。转录物然后由逆转录酶转化为含双链启动子的双链cDNA，所说的启动子可以以反向重复方向随意位于两端。这些ＤＮＡ可以产生能重新进入循环的ＲＮＡ。有关３ＳＲ系统更完整的描述可参见下列文献：Guatelli等，1990，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :1874 - 1878 ;EP－A－0,329,822，这两篇文献均引入本文作为参考。ＴＳＡ系统也有描述，如Gingeras等，Innis 等．eds，1990，PCR Protocols，Academic Press，San Diego,该文也引入本文作为参考。

根据本发明，当反应混合物中提供的荧光染料（如插入的荧光染料）在每一退火／延伸阶段过程混合物在两个温度间循环（热循环）而与双链核酸结合时，通过检测所发出的荧光可监测核酸扩增反应。

荧光的增加表明靶核酸的正向扩增。适宜的插入剂或染料包括但不限于溴化－３，８－ 二氨基－５－乙基－６－苯基菲啶鎓（EtBr）、溴化丙锭、二氨基吖啶、吖啶橙、吖啶黄素、fluorcoumanin、ellipticine、 道诺霉素、氯喹、偏端霉素Ｄ、色霉素、homidium、光神霉素、ruthenium polypyridyls、氨茴霉素、溴化甲锭、２－［２－（４－羟苯基）－６－苯并咪唑－６－（１－甲基－４－piperazye）苯并咪唑三盐酸化物等等。

本领域中所述的荧光团和ＤＮＡ结合发色团适用于US 5,210,015中公开的5′→3′核酸酶测定，也适用于本发明。选择了适合的供体荧光团和淬灭剂以使供体荧光团的发射光谱与淬灭剂的吸收光谱重叠。理想的情况是，荧光团应具有高Stokes漂移（在最大的吸收波长与最大的发射波长间有很大的差别）以最大程度地减小由散射的激发光产

生的干扰。

本领域中熟知的适宜标记包括（但不限于）荧光素及衍生物如FAM、HEX、TET 和 JOE；若丹明及衍生物如Texas Red、ROX 和TAMRA；荧光素黄（Lucifer Yellow）和香豆素衍生物如 7 －Me_2 N －香豆素－ 4 －乙酸盐、 7 －O H－ 4 －CH_3 －香豆素－ 3 －乙酸盐和 7 － NH_2 － 4 －CH_3 －香豆素－ 3 －乙酸盐（AMCA）。FAM、 HEX、TET、JOE、 ROX 和TAMRA 由Perkin Elmer, Applied Biosystems Division （Foster City, CA） 推入市场。Texas Red 和许多其它的合适化合物由 Molecular Probe （Eugene, OR）推入市场。适合作为能源供体的化学发光化合物和生物发光化合物的例子包括鲁米诺（氨基苯二酰－肼）及其衍生物，以及荧光素酶。

参照图 1，显示了指示单一聚合酶链反应（ＰＣＲ）的ＤＮＡ扩增反应的荧光迹线，所说ＰＣＲ包括将反应混合物的温度在两个温度（如９４℃和５０℃）之间循环。反应混合物包括加入的荧光ＤＮＡ结合染料EtBr，它能够插入或结合已成双链的ＰＣＲ产物并在反应的每个退火／延伸期发出荧光。其结果是，随双链ＤＮＡ数量的增加，所产生的荧光也增加。如图 1 中说明的，荧光强度的升降和温度升降正好相反。荧光强度在变性温度（９４℃）时最小，在退火／延伸温度（５０℃）时最大。因此，５０℃时的荧光强度显示出与循环有关的增加，它表示反应双链ＤＮＡ数量增加。当在３０个循环完成后热循环仪回到２５℃时，荧光值最终增加到比２５℃初始荧光值大三倍。另一方面，在变性温度处的最小荧光值没有显著增加，推想是因为在此温度时不存在dsDNA 与EtBr的结合。

如申请号为０７／695,201 的美国专利所公开的，该数据用光纤

导管和光谱－荧光计收集。光纤导管用于将激发光直接输入至含有反应混合物的反应管，而该反应管位于热循环仪的加热／冷却板中。同一根光纤导管也用于将荧光发射光传回光谱荧光计，在那里读出相应于发射的荧光的数值。按照这种安排，如图1中数据显示的，在反应正在进行时就可以监测扩增产物的产生。由于由结合试剂产生的信号可在不必打开反应管的情况下检测，所以可以在扩增反应过程之前、之中、和之后全程监测该信号。

用于检测单一ＰＣＲ和提供图1中数据的装置是按下列方式建立的：安装带有光纤附件的Spex - Fluorolog－2荧光计（Spex Catalog No. 1950）以在５００nm发射激发光，光的频带宽约为３.４nm。用GG 435nm 截止滤光镜排除第二次光（购自Melles Grist Inc）。在频带宽约为１３.６nm的５７０nm处检测发射光。用OG530滤光镜（５３０nm 截止）去掉激发光。

反应管是含有６０ng 人类男性ＤＮＡ的０.５ml聚丙烯管。该管的上端被切除以接入光纤导管。光纤导管用环氧剂粘贴在反应管顶部。透过管中油性覆盖层收集发射光。在管周围建起黑色护罩并将反应管置于热循环仪中。设定热循环仪的程序为：于９４℃和５０℃之间循环，每一温度为1分钟，进行３０个循环，然后于２５℃持续温育。同时启动荧光计和热循环仪。荧光计的参数为：用带5秒积分时间的时基的扫描；将发射光信号与激发光信号的比值来控制光源强度的变化。

按照本发明，提供了一种同时进行实时检测的多个扩增反应混合物的扩增反应的装置。每个反应混合物含有一种靶核酸序列。因此，例如使用能够容纳多至４８个反应管的加热和冷却板的热循环仪（如

由Perkin Elmer Cetus Instruments 商售得到的热循环仪），可以进行48个扩增反应并且同时检测所有48个样本中PCR扩增反应产物而不需拿起样本、打开反应管或中断循环反应。同时监测的反应数仅由加热和冷却板的容量所限制。因此，用96孔加热和冷却板，可以同时监测96个扩增反应并检测其扩增产物。如在上文例子中所描述的，应该理解，尽管下文讨论的实施方案是用PCRs和由指示某些样本中靶DNA序列扩增的特异性荧光结合试剂产生的信号一起加以描述的，但这些实施方案可以与其它的扩增过程或结合试剂一起应用，如在上文所总结的以及在授权给Gelfand 等人的US 5,210,015中所公开的那样，所说的专利已引入本文作为参考。

在多个扩增反应混合物检测装置的第一个实施方案中，一个适宜的光学系统将激发光从光源送至位于热循环仪中的多个反应管处并测量各反应管的发射光。这种光学系统可以包括能同时读取所有进行热循环的PCR管的多根光纤导管。由于可以很快地一次读取一根光纤（例如在PCR温度持续的时间范围内，即退火／延伸间隔期，如图1A所说明的a－c之间的间隔期），所以为了读取反应管的荧光只需要一台荧光计即可。对本领域专业人员显而易见的是这种检测系统不必限定于具体的热循环仪或反应管。

扩增反应检测装置包含了传输激发光和荧光发射光的光纤导管。只要反应孔或管为密闭防光的以便防止外部光源影响荧光检测，任何含有或可附于光纤管的位于上方的平板、管盖或孔盖装置均是适合的。在本发明的一个实施方案中，可以去掉反应管盖以容纳光纤部件。然而，使用具有透明或半透明盖的反应管可消除将光缆插入反应管的必要。很明显，能够容纳光缆但光缆与扩增反应成分并没有物理上的接

触的反应管是更为理想的。

参照图2，它显示了同时进行实时检测多个靶核酸序列扩增的装置的另一个实施方案，该装置参考编号为10。该实施方案有利地消除了需要上文描述的光输入和荧光输出光纤导管以及与将光纤和反应管相连接所带来的问题。如上文所讨论的，为了简化起见，装置10将与应用了荧光结合试剂信号发生器的DNA靶序列PCR扩增反应一起进行描述，但并不意味着限制于使用这样的扩增过程、核酸或扩增信号发生器。

装置10一般包括用于加热和冷却反应室管26（预先装有进行扩增的核酸）的热循环仪12、位于侧面的激发光源或灯14、成像装置16（包括CCD摄像机16a、摄像机控制器16b和冷却器16c）以及影像处理器20，所说的影像处理器可以是一台PC机，它带有市场提供的帧接收器卡（frame grabber card）如由ITEX Inc.提供的PC VISION PIUS，还带有IEEE 488接口卡。这些元件示于图4的方框图中。尽管热循环仪12是根据优选的实施方案按常规制造的，但下面仍给出了热循环仪12某些特征概要以帮助理解本发明所公开的内容。

热循环仪12包括用于加热和冷却反应管26的热交换器22。热交换器22为一最好用铝制的导热板，它具有形成于其中的多个凹陷24，凹陷的大小允许一定数目的反应管26（例如0.5ml Eppendorf 管）与之相配合。热交换器22的用途是支持反应管26并作为热交换器把热能导入和导出贮于管中的液体，从而使各反应成份于各种温度下按用户所定时间进行温育。因此，热循环仪12也包括用于加热和冷却热交换器的系统和装置，例如 ， 如本领域常规所

用的用于 控制加热和冷却系统 以便 加热和冷却热交换器和反应管的计算机系统。用户根据将热交换器和反应管加热和冷却至所需温度的方案（如图 1 所示的）通过显示／键盘用户接口 2 8 设定计算机或所用装置的程序。

可以根据本文中作为参考而引用的文献US 5，0 3 8，8 5 2来设立热交换器（导热板）、用于加热和冷却热交换器的装置和用于控制热交换器的加热和冷却的装置、以及整个热循环仪。市场上可得到的合适的热循环仪如示于图 2 的GeneAmp PCR System 9600热循环仪（Perkin－Elmer，Norwalk，CT）。

然而，应该理解，也可使用用于加热和冷却预先装有反应物的反应管的其它装置而不超出本发明的范围。唯一必要的是无论用何装置加热和冷却反应管，它都应能够达到和维持所涉及的温度并且取得所期望的温度－时间过程。因此，对于核酸扩增反应这一目的，这种装置应能够使扩增反应混合物的温度在变性温度 T_1（其范围可在约80－105℃，优选为90－100℃）和退火／延伸温度 T_2（其范围在约30－90℃，优选为50－70℃）之间循环，正如本领域专业人员所知，$T_1 > T_2$。

盖板 2 7（包括把手 2 7 a）按本领域常规方法可滑动地装在热交换器上，用于覆盖和敞开热交换器 2 2。在图 2 所体现的本发明的扩增／检测过程中，盖板 2 7 维持在图 3 所示的后面位置上。这使摄像机 1 6 a 能接受从扩增反应管内发射的荧光信号。

热循环仪 1 2 还带有用于经过导线 3 0 发送指示热交换器或扩增反应混合物温度情况（如循环数、温度和时间）的输出数据至影像处理器 2 0 的装置。用于传输这些数据的 R S 232总线与例如Gene Amp

PCR System 9600热循环仪一起提供。在操作期间LED显示板28a也给用户显示了这些输出数据。

CCD摄像机16a位于热交换器22和反应管之上以收集通过反应管上端由反应混合物发射的荧光信号，与此同时在扩增反应期间混合物的温度由装置12进行循环。重量的是，要将摄像机16a在可行的前提下置于离热交换器22尽可能远的位置以减少摄像机16a所捕获的荧光影像的视差效应的影响。然而，摄像机16a必须与热交换器和反应管足够近以最大限度减少由其它光源来的背景噪声，从而使由反应管26而来的足够的光能被摄像机捕获。已经发现，热交换器22与指向热交换器的摄像机镜头46间的最适距离d依所用镜头的不同而约在6英寸至5英尺的范围内。例如，如用70mm的镜头d的最佳距离约2英尺。由于所感兴趣的荧光波长为约600nm，将一通频带干涉滤光镜48（优选为600nm的滤光镜）置于镜头前以限定检测到所期望的波长。

参考图2，可见摄像机16a装置于常规摄影用拷贝支架32上以将摄像机置于热交换器22和反应管26之上。拷贝支架32包括一个支撑在托架36中的垂直支持构件34。托架36牢牢固定在支持装置10的安装表面38上。滑动构件40可滑动地连接到垂直构件34上以沿垂直方向活动，它带有旋钮42，该旋钮42转动时与滑动构件40相配合，使滑动构件40锁定在一固定位置，这是一般技术人员都熟悉的。摄像机托架44一端与滑动构件40牢牢固定，而另一端与摄像机16a固定。因此，摄像机16a的高度可通过滑动构件40调节至热交换器和反应管上面的所需高度位置上。摄像机16a最好是传统的计算机控制的、受冷却的ＣＣＤ－摄像机。冷却

液通过多导管线５０循环流过摄像机１６ａ。摄像机最好进行冷却以便提供低噪音的更高质量的影像。一种合适的摄像机是从Photometrics（Tucson，ＡＺ）商售可得到的、名为STAR 1的ＣＣＤ－摄像机。它使用每个像素１２位分辨率的热电冷却的ＣＣＤ阵列。它也允许变化曝光时间以改变对所测荧光的灵敏度。摄像机１６ａ与影像处理器２０之间连有IEEE 488总线（参考编号５８），从而使影像处理器２０能够控制反应管影像的曝光及采集影像的时间周期。

参考图４，两个ＵＶ灯１４于侧面置放在摄像机１６ａ与热交换器２２之间的光路周围。灯１４与摄像机镜头４６足够靠近以使它们的外壳不干扰所有反应管和摄像机镜头４６之间的光路,这一点是唯一重要的一点。为达到这一目标，可通过托架５２将灯１４悬吊于托架４４之上。灯１４也平行于热交换器以便激发光以均匀的方式提供给反应管。导线５４从灯１４延伸出来并适合插入标准的１１５伏墙壁插座以向灯提供所需的电源。根据核酸荧光结合试剂的要求选择ＵＶ灯１４的波长。例如，波长３０２ｎｍ为激发溴化３，８－二氨基－５－乙基－６－苯基菲啶鎓的所需波长。适宜的３０２ｎｍ中间范围ＵＶ灯可通过商售从U. V. Prodncts，Inc（San Gabriel，CA）处，其名为Chroma－Vue。

由摄像机１６ａ摄取的影像通过导线５６传输至影像处理器２０，如果使用如前所讨论的STAR 1系统，导线５６为ＲＳ１７０线。影像处理器２０包括用于将导线５６上的摄像机采集数据形成数字图像的帧接收器。尽管摄像机１６ａ包括１２位的数字输出，但在影像处理器２０为８位影像处理器时，使用摄像机的模拟输出信号。在这种情况下，影像处理器２０包括帧接收器以便从导线５８上的模拟信号产

生8位数字图像，从而使影像处理器20能够以数字数据处理收集的图像。

为给处理器提供扩增反应进行中的温度变化情况、时间以及周期，将热循环仪输出数据导线30也连至影像处理器20。用这种方法，可以设定处理器20的程序以在扩增反应过程中预定时间时通过导线58向摄像机控制器18发送启动信号，该控制器18控制摄像机16a快门的开启。影像处理器20包括用于与IEEE 488的联线58通讯以控制摄像机16a的IEEE 488总线卡。处理器20还带有常规键盘和／或鼠标用户接口60／64和显示器62。下面提供了装置10操作的一般描述。

将每个均含有反应混合物（如待扩增的核酸、催化聚合反应的对热稳定的酶、特异性寡核苷酸引物和四种不同的三磷酸核苷酸）的多个反应管26置于热交换器板22中（图3）。可用常规的盖子、蒸气屏障矿物油或Ampliwax™牌密封剂密封反应管。启动热循环仪，给对着反应管的激发光灯通电。摄像机16a在接到来自摄像机控制器16b的信号后，摄下所有反应管26的一幅图像，这幅图像反映出在一个循环的第一次退火／延伸期不同水平的荧光。这幅模拟图像传至影像处理器，在那里帧接收器将图像数字化，这是因为它带有模拟／数字转换器。

图5显示了在6个同时发生的扩增反应过程中摄制的三幅这种数字化图像的某些部份。处理器将在所提到的退火／延伸期中各反应管发射的光的强度加以平均，并将这些强度值规范化以确定每个反应管的单一荧光值。下面将与图8A－C相联系更详细地讨论规范化过程。对每个扩增反应过程的循环重复进行上述过程。将规范化的荧光值存

至计算机电子表格中以便随后进行分析和作图。对规范化荧光值作进一步处理以确定靶核酸序列的起始量（即扩增前靶核酸模板的起始数）或分析扩增反应条件对反应动力学的影响。下面对上文已简述过的荧光值采集和处理步骤进行更详细的讨论。

首先将讨论每次摄像机对发射的荧光曝光的时机。由于最大的荧光发生在进行热循环的扩增反应过程中的、各循环的退火／延伸期（例如，参见图1A中间隔a－c）并且这指示着核酸扩增反应的水平，所以当摄像机16a在一给定周期中只摄取一幅图像时，应该在该循环的这一阶段进行摄取，因为在这时可得到最强信号，而且这一间隔中的信号最好地代表了所产生物质的量。然后，由于整个反应期中的其它数据可用于分析扩增反应的整个过程，所以应该理解，对每个循环最好收集不止一个图像。例如，以图1A中字母b参考所指示的在退火／延伸温度达到之后的20秒，可摄取各图像。在该例子的情况下，如果退火温度为68℃，当热循环仪12通过RS 232的的引线30指示温度达到68℃后20秒时，处理器发送信号至摄像机控制器16a以启动摄像机快门（未显示）。本领域的一般技术人员都知道，曝光时间可以随不同的应用而不同。开启摄像机快门的启动过程很明显可以在操作者监测显示板28a上显示的温度和时间输出数据情况下手动进行。

CCD 摄像机将在曝光期间接收到的光相加并产生图象，该图象表明热交换器中在所定时间间隔中所有反应管的荧光。该图像通过导线56送至影像处理器20。与处理器20相连的显示器62可以显示在图5中标为64A－C的三个窗口。窗口64A可以监视摄像机的视野并在摄像机操作期间提供功能菜单，如摄像机曝光控制等。窗口

64B显示数字图像并便于手动选定待处理的部分图像（例如，如下讨论的进行平均）。窗口64C显示了计算机操作系统的命令行。处理器将图像数字化并在窗口64B中显示出来，这个窗口可用来使用户能够将一组像素指定至包含一个反应管的单一图像的图像区域。可以用鼠标在窗口64B中的一个反应管26的数字图像某些部分的周围画上方框而完成这一步骤，或者，如对计算机图形学领域中普通技术人员来讲是显而易见的那样，用一个查看各像素荧光的程序来确定哪个像素属于哪个反应管而完成该步骤。图6图解说明这一步骤，其中6×6像素阵列包括了单个反应管26的图像。应理解该阵列大小仅仅为举例的目的而选出，并且可采用其它阵列大小而不偏离本发明的范围。像素值“5”表示荧光不明显，它相应于热交换器上表面发射的荧光，而像素值“200”表示在6×6像素阵列中测得的最大荧光值并相应于从成像在像素上的反应管的中心发射的荧光。像素值“100”相于应由热交换器和反应管部分发射的荧光。当然，这些特殊的像素值并不必需代表实际值，而仅仅是举例说明。

然后影像处理器20将转至包含该反应管的区域阵列中的像素值加以平均以得到核酸扩增反应过程循环1的该反应管的单一荧光值。然而，可以以其它方式如将像素值相加而得到各反应管的单一荧光值。然后将绘出6×6阵列轮廓并包含第一反应管的方框移动以使之包含下一个反应管，重复像素值平均步骤并获得单一的荧光值直至循环1的各管均得到荧光值。另外的方法是，可将获得指定循环的各反应管26的荧光值的过程作为并行过程而进行。各反应管荧光值的计算过程在各循环重复进行直至完成扩增反应过程。

开始时，即当热交换板22装上反应管26时，也将一对照管

26c装入孔24之一。对照管的用途为针对各循环间测量的差异提供一个稳定的荧光源，例如可以检测出由于微小温度变化或激发光强度漂移引起的所说的测量差异。以这种方法可以校正所获得的各反应管的荧光值，以便根据下述方法对所说变异进行补偿。对照管26c预先只装有荧光染料，如溴化3，8－二氨基－5－乙基－6－苯基菲啶鎓（EtBr）。由于对照管不含核酸，所以在热循环期间没有荧光的扩增。因此，在扩增反应期间经受激发光作用时，对照管将发射基本恒量的荧光，并且对照管荧光强度在整个扩增反应过程期间可作为基线。这在图7中得到说明，其中 绘制了几个循环的对照管荧光强度。

图7中io为对照管的初始荧光并且它构成了基线。在循环2时，记录到的对照管26的光强度开始逐渐减小，这表示发生了荧光漂移。因此，循环4实线72相应于表观强度值。例如，在循环4中，当摄像机收集第4个循环的退火／延伸期的数据时，对照管荧光的表观值为iA4。然后确定该循环的校正系数io／iA4。各反应管获得的各荧光值乘以校正系数而得到实际荧光值。对每个循环重复进行前述过程。总之，校正系数一般描述为io／iAn，其中io 为对照管的初始荧光值，iAn为在循环数n期间采集的对照管表观荧光值。对例如用平均法（如前所述）所得到的各反应管的和荧光值与校正相乘。对各循环重复进行前述过程。

参考仅作为举例说明目的的特殊实施例中所得数据，下面将描述规范化和定量过程。数据示于图8A中，应该理解本发明不是意在仅限于PCR 或特殊的扩增反应混合物、扩增反应数、热循环仪、温度变化方案或在这些情况下对本领域普通技术人员来讲是显而易见的荧光

图像的摄取间隔时间。所需要的只是监测靶核酸序列起始浓度不同的扩增反应混合物，以便对其靶序列的起初浓度为未知的扩增反应混合物中的靶序列的起始浓度进行定量，下文将更详细地进行描述。

图8A显示在热循环55个循环中按上文描述的原理用CCD-摄像机获得的、同时监测的8个PCR扩增反应的荧光值。因此，这些荧光值代表了如上文所述对测量值变化（如漂移）的发生进行校正了的各反应管所获得荧光值（例如通过将各自像素阵列作平均）。在该例子情况中，7个反应混合物含有已知浓度的特异性DNA靶序列（即已知量的起始样本）以方便对样本未知起始量的定量，下文将更详细地描述。第8个混合物不含靶DNA，作为对照反应以提供背景信息。用单链HIV模板DNA的系列稀释物起动7个已知样本的扩增反应。

在制备稀释物前，配制PCR反应混合物于100μl容积中，它含有10mM Tris-HCl（pH8.3）；50mM KCl；3mM $MgCl_2$；2.5U的Taq DNA聚合酶（Perkin Elmer，Norwalk，CT）；100μM各dNTP（Promega Corp.，Madison，WI）;4 μg／ml的溴化3，8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶鎓（Bio Rad，Richmond，CA）；100pmole各HIV特异性（gag区）寡核苷酸引物SK 145和SK 431（Perkin Elmer，Norwalk，CT）和300ng人胎盘DNA（Sigma，St. Louis，MO）。用HIV gag区的M13亚克隆作为靶核酸模板。

以10^8模板起始，以10倍稀释为一级直至10^2模板并与HIV特异性引物一起使用以形成142 bp PCR产物，图8A中由这些初始浓度产生的荧光值图分别给予参考编号10^8、10^7……10^2。还对未加模板的对照扩增反应进行了监测。该混合物的荧光值图以参考编

号O的线条表示。为模拟以PCR 为基础的结合了HIV基因组的淋巴细胞DNA的筛选，所有反应含有300ng或等同于40,000个细胞的人基因组DNA。

在GeneAmp PCR System 9600热循环仪（Perkin-Elmer，Norwalk，CT）中以2个温度程序进行热循环55个循环，2个温度程序是：在94℃进行15秒的变性；在68℃进行30秒的退火／延伸。为了提供如本领域常规所用的“热启动”以改善反应中的特异性（如Chou，Q.，Russel，M.，Birch D.E.，Raymond，J.和Bloch，W.的“Prevention of Pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves Low - copy - number simplification” Nucleic Acids Research 20:1717 - 1723，1992中所描述的），起始温度维持在75℃，在此期间当样本达到此温度后加入$MgCl_2$（12μl）。各热循环的荧光图由CCD摄像机于维持的退火温度下在第20秒至第30秒时摄取，曝光时间约为1秒。如上文所述，不用加热盖板27并将其置于离开反应管处以允许进行成像。

如图8A所示，各反应的荧光在早期热循环中变化很小，然后当产生了可检测量的PCR 产物时荧光值升高。反应中起始模板拷贝数越多，荧光值升高就越早。例如可看到：标有10^8的曲线是相应于从含有最高浓度的起始模板（即10^8模板）起始的反应混合物发射的荧光的荧光曲线。如图8A所示，如预计的那样，10^8曲线首先升高。

然而，由不同扩增反应获得的起始荧光值存在着相当大的差异，尽管它们应该相同。因为单链DNA的量太小以致于反应管中不同量的单链DNA对单管所预期的总荧光值只有可以忽略不计的影响，所以各起始荧光应该相同。据信这种差异的来源为光照不均匀性或非一致

性、视差以及由于管盖造成的荧光可变的衰减。透过矿物油的蒸气屏障或Ampliwax™牌密封剂来监测扩增反应而不盖管盖，可减少但却不能消除这种差异。

为了补偿光照不均匀性、视差和可变的荧光衰减以及因此造成的示于图 8 A 中的差异，处理器给每个扩增反应确定了一个规范化系数。各系数是基于在循环 1 中收集的数据确定的，并且为所有反应的平均初始荧光与各反应观察到的初始荧光的比率。处理器将各扩增反应的所有荧光值与各自的规范化系数相乘。此规范化的结果示于图 8 B 中。因此，对于含有 10^8 起始模板拷贝的反应来讲，所说比率（规范化系数）为循环 1 中所有 8 个被 8 5 相除的荧光值的总和，8 5 为如图 8 A 中所示反应 10^8 的初始荧光值。标为 10^8 的反应的荧光值然后均被该系数相乘从而产生图 8 B 的规范化曲线。各反应曲线被相似地规范化。该规范化荧光是基于这样的假设基础上的：图像差异的来源在整个信号强度范围使荧光信号按比例减弱或增强。

参考图 8 B，所有反应基本上具有相同的初始荧光，并且大多数反应图具有与所有稀释系列相一致的均匀的间隙。这些图在形状上非常相似并且几乎平行。有效PCR的早期或对数期在每个循环都使DNA拷贝数加倍。可以预计每个起始模板 1 0 倍的稀释将需要额外的3.32个循环才能使PCR产物的产量达到指定的浓度。因此，规范化值对于荧光水平范围的多数值来讲是如所预期的，通过检查图 8 B 可以看到除了以 10^2 拷贝数和0拷贝数起始的稀释液以外，其它各稀释液之间都有约为 3 个循环的分隔。在PCRs的对数期过后这种循环数分隔仍然存在，这也是显而易见的。相反，将图 8 A 的非规范化数据中各稀释液分开的循环数却有很大的不同。

应用如图 8 B 中所示数据的规范化荧光数据可以对靶核酸的初始量定量，并且可以分析不同的反应条件对扩增反应的动力学的影响。首先要讨论靶核酸初始量的定量。图 9 显示模板拷贝起始数的对数与图 8 B 中为达到任意选择的荧光水平 1 9 0 而所进行的扩增反应的循环数之间的线性关系。图 9 中显示的线条为配合从 10^8 至 10^3 初始拷贝的数据点的回归线（$r^2 > .99$）。相应于 10^2 初始拷贝的数据点与所说的线条（零拷贝不能置于对数图上）具有统计学上显著偏离。除了 10^2 拷贝的数据点外，最大程度偏离回归线的数据点在 10^5，当应用已确定回归线的等式时，所说数据点显示其值低于已知初始拷贝数 1 3 %。如果图 8 B 中所选的荧光水平在125－225之间的任何一处时，可以获得相似结果。

在 10^2 拷贝处数据点偏离直线的原因借助于扩增反应产物的凝胶电泳分析示于图 8 C 中。扩增反应的特异性为：当以模板拷贝从 10^8 起始降至 15^5 时唯一可见的产物为具有所预计大小的产物；而在采用 10^4 个起始拷贝时，刚刚可以见到较小的、非特异性扩增产物。在用 10^3 个拷贝时，该产物更显著，且当用 10^2 个拷贝时，可产生与HIV 特异性产物等量的非特异性产物。在未加模板的对照中只有非特异性产物。由于特异性产物的荧光与非特异性产物的荧光不能被区分开来，该项测定的敏感性的“基线”位于某循环数处，通过所说循环数，合成了大量的非特异性产物以致任何特异性产物的额外的合成对反应几乎无影响。只要浓度确定是建立在由一组标准物（即含有已知浓度的起始靶核酸序列的反应管）内推的基础之上，则该基线将位于明显地多于偏离直线开始处的循环数的循环数处。实际操作中我们看见在少于 10^2 个模板的反应图的样本与样本的差异使低于

该水平的可重现的定量复杂化了（数据未显示）。

为了测定样本中靶核酸初始量，首先使用从标准物组得到的规范化的荧光数据以建立初始靶核酸量与达到在仪器检测范围内的任意选择的荧光水平的所需循环数（如图9中所示的）之间的关系。这种任意的荧光值（AFV）最好选在位于参考图8B所描述的、在不同标准物间为平行的反应图的区域。如果选择的AFV为借助采用最高初始已知靶核酸浓度的标准物获得的最大荧光值的0.1至0.5倍，则这一般将是正确的。

选择AFV之后，对各标准物扩增反应来讲，选择所得到的最接近该AFV的校正和标准化荧光值。利用该值和在该值产生的循环之前的4个循环以及后4个循环的荧光值，作出将循环数（可以是分数）与荧光值相联系的回归线。然后将该AFV置于回归线等式中，得到所需达到此AFV的循环数的该标准物样本的值。

在现在确定了每个标准物达到AFV所需的循环数后，得到了将初始靶核酸量与所需达到AFV的循环数相关联的数据的回归线。为了确定与标准物样本一起扩增的未知样本的初始靶核酸的量，按对标准物样本所做的方法确定达到该AFV所需的循环数。将该循环数（可以是分数）置入已确定的回归线等式中，该等式就给出未知样本中靶核酸的初始量。对各未知样本可以重复进行该过程。通过经适当设制了程序的微处理器可以容易地和很快地完成刚才所描述的数据处理。

核酸定量的这种方式不仅可以利用由染料的非序列特异性结合所导致的荧光，而且可利用寡核苷酸探针的序列特异性结合而产生的荧光（如在US 5，210，015中描述的在均匀扩增反应/检测系统中应用的那样的寡核苷酸探针）。如在

上文专利中所描述的，这些探针需要另外的光源和滤光镜。多个序列特异性探针（它们各自带有可区分的荧光）的应用应该能使多个核酸靶序列在单一的扩增反应中同时进行检测和定量。

参照图10A－D，将讨论对于不同反应条件对PCR的影响所作的分析。一般来讲，这些影响可以通过加、减或改变标准PCR的成分并且观察反应图中的变化而加以监测。图10A显示Taq DNA聚合酶的滴定。用如图中所示的Taq聚合酶的各水平启动9个同样的含10^8靶HIV模板的CPRs。对于酶量在1到10个单位之间的每个反应，经过大约相同的循环，在所有反应中可开始检测出荧光。这表明酶水平的这些差异在早期循环中对扩增反应的效率几乎没有什么影响。然而，在晚期循环中PCR产物水平的差异变得明显了，如在循环50时，用10个单位与用1个单位相比可以产生几乎为2倍的DNA。借助凝胶电泳（未示出），在这些反应中没有非特异性、非HIV PCR产物产生的迹象。仅用0.5单位Taq聚合酶，可检测的产物会突然消失。由于PCR是这样一种过程，其中DNA按指数而增加其浓度，之所以存在酶的阈值水平或许并不令人惊异，在此酶的阈值水平之下扩增反应显然是失败的。

也可以监测改变引物浓度对扩增反应动力学的影响。图10B表示出用从2μM（各引物）至0.05μM的引物水平检测HIV模板（10^8个初始ssDNA拷贝）的PCRs的图。每个PCR中用同样量的酶（2.5U）。应注意在引物浓度从0.05至0.4μM时，反应中DNA水平升高至一定水平并且保持稳定。如果用图4中的数据并设定142bp PCR产物为10.6pmole／μg来估计这些终产物的水平，我们可见对0.05、0.10和0.20μM引物分别产生了0.05、0.10和0.20μM的产物。在这些水平上，

引物浓度明显地成为产物DNA产量的限制因素。相反，在0.8μM引物浓度及其以上的浓度。如图6A所示，DNA水平随每一个热循环而持续升高，并且引物增加的量对图没有什么影响。通过比较图6A中的数据，人们可以得出这些反应是由酶而不是由引物限制的这一结论。

采用含1μM引物和每100μl 2.5U酶的同样HIV测试系统，不同的KCl浓度的结果示于图10C中。高浓度的KCl极大地抑制了Taq DNA聚合酶的活性。与此相一致，在KCl浓度为125mM或更高时，不存在可检测到的PCR产物。以鲑鱼精子DNA作模板，Taq DNA聚合酶的活性在50－90mM KCl时最优。该测定表明在50、75和100mM KCl时产物产量最高，而在0mM KCl仅有一半量的产物。这种差异可能是由于使引物退火不稳定的低离子张力所致，但与此不一致的是观察到：直到循环20为止用0mM KCl的扩增反应的效率显示几乎与用50－100mM KCl的扩增反应的效率相同。仅仅在较晚期循环时产物产量才下降，这与图6A中用较少聚合酶获得的结果相似，如果引物退火不稳定，人们可以预计所有各循环的扩增反应效率将降低。

最后，把PCR的一种已知抑制剂羟高铁血红素以不同浓度加至PCRs中。除了用0.2μM的引物浓度以外，将羟高铁血红素加至前面所用的同样的HIV测试系统中。如图10D所示，在羟高铁血红素浓度为0.2μM或更高时，未得到可检测到的DNA产物。在0.1μM时，产物的测出推迟了3－4个循环，这表明，与以0μM KCl或减少的酶所获结果相比，在早期以及晚期的扩增反应循环中扩增反应的效率受到了不利的影响。反应图中的差异表明，部分抑制的PCRs可与未抑制反应区分开。

图１１－１３显示了说明由本发明装置完成的步骤的简化流程图。图１１说明总的荧光值获取步骤，而图１２－１３显示了荧光的平均和规范化子程序。

参照图１１，整个过程开始，得到循环１荧光值。然后，处理器计算各样本的规范化系数。接着将各荧光值与其各自的规范化系数相乘使在该循环中各值的荧光值规范化。然后处理器输出已规范化的值，并得到下一个循环的荧光值。重复进行该过程直至所有的荧光图像被处理。参照图１２,它说明如何获得荧光值，启动热循环仪并且在摄像机控制器等待启动信号时给激发光源通电。当摄像机控制器接到来自处理器的启动信号时，它向摄像机发出信号以使摄像机开启快门ｎ秒，在快门关闭之前的这ｎ秒中摄像机将指示荧光的像素值相加。模拟图像传送至影像处理器，在那里影像处理器的帧接收器将图像数字化。此时可将数字化的图像贮存以便以后的处理或者也可以实时处理数字化的图像。在后一种情况下，影像处理器然后将一组像素分配至包含一个反应管的区域并且将该区域所有值平均以获得可供贮存的单一荧光值。处理器重复这些步骤直至该循环中所有反应管均获得了单一的荧光值。接着处理器输出该循环的已贮存的值。然后重复进行该循环的前述步骤。图１３为图１１说明的规范化系数获取步骤的子程序。首先，确定所有循环１基值的平均值。然后,该平均值被循环１中的各荧光值相除，以便得到将被继续用于剩余循环的各扩增反应混合物的规范化系数。尽管流程图不包括循环至循环的校正，但处理器也可以提供这种校正。

参照图１４和１５，它们显示了激发光和与装置１０联合使用的荧光发射感光装置的进一步的实施方案。该激发和荧光感光装置总体

上给予参考编号100，并且它总体上包括以不透光的方式覆盖凹陷24的外壳或套壳102、提供给位于凹陷中反应样本的灯或光源14′、检测或感受由反应样本发射的荧光的传感器或摄像机16a′、以及用于分离激发光和荧光发射以使基本上只有发射光可被摄像机16a′检测的二色镜104。按上文所述处理荧光或扩增反应数据。

套壳102显示出具有顶壁106、侧壁108和110、前壁112和后壁114。套壳102置于热循环仪12的上表面以使套壳包括热交换器22并因而包括凹陷24，凹陷24是在热交换器中形成的，其大小可接受多个反应管26，反应管26制成能容纳核酸扩增反应样本的形状。更确切地说，建造套壳102是为了给置于样本管26中的样本以及在光源与样本之间、样本与传感器之间的光路形成一个不透光的室。因此，套壳设置于热循环仪12上以在其间形成不透光的联接。另外，除了形成的供接受激发光源或灯14′的孔116和118以及摄像机16a′的镜片120外，外壳或套壳的壁上 无孔，并且它实质上由不透明材料构成。此外，壁最好由具有相对低的导热性的材料如塑料组成以阻止热量从导热构件22和管26中的样本中传递。适于做套壳壁的一种材料是聚碳酸酯。

提供了一种进入套壳或外壳102内部的办法并因此可接触到热交换器22中的样本。参照图14和15，为了能提供这种进入或接触，前壁112可通过合页122与顶壁106 以铰接方式联在一起。尽管对套壳已描述了特定的构型，但应该理解也可用其它的构型为激发光和荧光发射光路以及为包含元件的套壳102形成一不透光的室，套壳102中包含的元件在下文更详细地进行描述。

灯或光源14′在外形上基本上与灯14不同。灯14′包括聚

光挡板或护罩14a′以及用于发射光的灯泡或灯丝14b′，这与灯14的情况一样并在本领域为常规的设计。选择灯14′以提供具有这种波长的光，此波长相应于所需激发待测试样本中存在的荧光结合试剂的光的波长。例如，用溴化－3，8－二氨基－5－乙基－6－苯基菲啶鎓作为荧光结合试剂，光源14′最好能发射波长约为302nm的UV光，提供302nm（UV）光的适宜光源可从U．V．Products，Inc．（CA）通过商售得到，其型号为UVM－57（302nm）。然而，应该理解溴化－3，8－二氨基－5－乙基－6－苯基菲啶鎓可在约480nm以及约302nm的波长处激发。另外，其它的荧光团（如其它DNA结合染料或上文描述的5′核酸酶均匀测定探针）可被非UV波长激发。因此，可用另一种产生480nm光的光源。然而，产生480nm光的光源一般提供可见光范围的光。因此，当用这种光源时，要用滤光镜以获得所需480nm的光的输出。一般地讲，只要光源可以提供给反应混合物所需波长，可以使用任何光源装置。单色计和激光器是适宜光源的例子。

灯14′与套壳102相连接以使激发光穿过孔116并照向凹陷24中所含的任何样本，所说孔116位于凹陷24上方的中央从而最大限度地降低了在其上的非均匀性光分布。应该理解灯14′也可以位于其它位置。例如，灯14′可以完全位于套壳102中从而去除了孔116。然而，由于上文讨论的原因，光发射元件（如灯炮14b）最好平行于热交换器22的上表面并位于凹陷上方的中央，以增强在热交换器上的光分布的均匀性。如果使用了滤光镜以获得所需波长，可将滤光镜安装在例如位于灯的光路与凹陷24中的样本之间的孔116处的套壳上。

双色镜104 最好使用低通双色镜，它直接位于热交换器 2 2 上方并且最好使其角度与热交换器的上表面约成 4 5 °，以适应灯 1 4′和摄像机16a′的方向。以图中显示的安排，双色镜为低通双色镜，它的构造要求在暴露给激发光时对具有相应于由激发光源 1 4 发射光的波长的光能穿透或透明，而对具有相应于由凹陷 2 4 中样本发射光的波长的光进行反射（参见图 1 5 ）。当然双色镜的穿透和反射特征是根据具体应用而选择的。例如，当用溴化－ 3 ， 8 －二氨基－ 5 －乙基－ 6 －苯基菲啶鎓作为荧光结合试剂时，如上文讨论的，激发光波长可以约为302或480nm。在这两种中的任意一种的情况下，发射光波长为约600nm。因此，可以这样构造双色镜，使它对波长约为302或480nm的光透过或者对约为302和约为480nm 波长光均透过。在这两种情况下，将双色镜建造成反射波长约为600nm的光。图 1 6 显示当采用溴化－ 3 ， 8 －二氨基－ 5 －乙基－ 6 －苯基菲啶鎓作为荧光结合试剂时　双色镜的适宜的特征的穿透性对波长的代表性曲线。在此例子中，双色镜对波长约为300至510nm（后者为截止波长）的光具有高度穿透性，然而当波长接近600时又变得有高度反射性。还要注意到，当使用其它荧光结合试剂（如荧光素）时可以使用具有于图 1 6 中说明的特性的双色镜。荧光素分别有约495nm的激发波长和522nm的发射波长。至于穿透性和反射性的程度，图 1 6 中所示的能穿透约 8 5 % 的激发光和将 9 8 %的发射荧光反射至摄像机16a′的镜子已为按照本发明以溴化－ 3 ， 8 －二氨基－ 5 －乙基－ 6 －苯基菲啶鎓检测核酸扩增提供了适宜的结果。

为了说明的目的，给出了下面的数据，这些数据并不是意在限制本发明。一种在使用溴化－ 3 ， 8 －二氨基－ 5 －乙基－ 6 －苯基菲

啶镝作为荧光结合光时用于分离激发光和发射光的适宜双色镜的规格如下：UV穿透510nm截止短程透过（UV Transmitting 510nm Cut-Off Short Pass）：对300－500nm，穿透性平均≥80%，在300nm处绝对值≥65%；对525－610nm，反射性绝对值≥90%；硬耐熔氧化物表面涂层；基底物质（底物）－Corning 7940 熔化的硅；且各边缘倒角为0.010×45°。适合的双色镜制造商包括Omega Optical, Inc.（VT）和Janos Optical, Inc.（VT）。

尽管已经描述了低通装置，但也可以使用高通双色镜。然而，在用高通双色镜时，如对本领域普通技术人员是显而易见的，应该把灯14′和摄像机16a′的位置颠倒。

回到图14和15所示的实施方案的组成的安排上，双色镜104借助合页128与隆起物或凸起物126铰接固定，使镜子可在轴上转动以接近热交换器22。隆起物或凸起物126自上壁106延伸，并且被建造成可防止或最大程度地减少来自光源14′的光越过合页128而至摄像机16a。

按照优选的实施方案提供了光快门，它示于图15中并给予参考编号124，用以限制反应样本受激发光的曝光。如图15中图解所示，快门124可滑动地联至上壁106上以便在孔116开启处的第一位置（以实线显示）和它覆盖孔116时的第二位置（以虚线显示）之间移动。快门可以如本领域常规使用的那样，用弹簧使之偏向于关闭位置，而通过电磁控制开启到打开位置。可以控制快门使它例如只在PCR 期间各循环的退火／延伸期期间打开，即在该期间预计可产生最大的荧光。快门以这种方式通过提高样本稳定性从而改善了系统的性能。在此实施方案中由于灯与反应管更接近，所以样本受到相对强的激发光强度

照射，这可以导致样本降解或光失敏，或称作“漂白”。快门使样本暴露给光的时间最大程度地减少，因此消除了或显著减少了漂白的问题。尽管显示了快门与套壳102相连，但它也可以与灯１４′相连，位于导热板正上方从而也位于样本的正上方，或者以某种其它方式控制样本对激发光的暴光。也可以使用其它机构控制这种曝光或设定曝光时间。

可在双色镜104和摄像机16a′镜头片120之间置放向场透镜（物镜）或平凸透镜130。向场透镜使由镜104反射的射线向内偏，从而基本上使所有的由样本和热交换器２２发射的荧光均射向镜片120。向场透镜130最好可滑动地连至套壳102上，以便如本领域普通技术人员显而易见的，根据样本发射光波长而将透镜130移向或移离镜片120。

可将单个滤光镜或多个滤光镜（如滤光镜轮）连至摄像机以只允许某个（或某些）波长被检测。参照图１５，如本领域常规所用的那样，将滤光镜轮132连至镜片120上，从而使多种标记物或靶物质可以被检测和被监测。这就是说，借助旋转滤光镜轮使滤光镜交换位置从而使检测被限定在所需波长。交换位置的步骤可依据具体应用在每个退火／延伸期间或在预先选定的循环数之后进行，另外，也可以考虑采用可区分波长的摄像机如光谱成像仪。

参照图１５，最好提供一个加热的透明或穿透性窗或构件134以改善热循环条件。构件134应至少具有足够的穿透性以允许样本有效的激发和所伴随产生的荧光的检测。加热构件或窗134例如可使用石英，并且可被置于反应管２６上或略高于它的上方。提供加热构件134一般是为了维持反应混合物的热循环温度曲线使之尽可能贴近预选的热循环温度曲线并最大程度地减少回流。加热构件最好维持在约

95－105℃的温度范围内，优选约100℃。即，该窗最好维持在相应于变性温度的温度上。构件134可以例如用镍铬丝加热，或根据常规的实践用其它的加热元件加热。

参照图17，它显示了用镍铬丝作加热元件的加热构件，还要注意到尽管显示加热元件134覆盖仅有9个凹陷的热交换器，但这仅仅是为了简化该图。镍铬丝136可以嵌于构件134中或固定于其表面。镍铬丝的铺敷最好不跨越过热交换器中的凹陷24，因此不会干扰激发光和发射光的光路。镍铬丝还要连至将构件134的温度维持在所需温度的常规温度控制器138上。

显示器最好连至处理器上以显示诸如靶序列是否存在以及其浓度的数据。另外，应用连续监测扩增反应（上文已讨论），用于显示被测的扩增反应的装置在扩增反应进行的同时可以被显示出来。这能使热循环次数减少。例如，如果可以作出反应混合物在相对早期时已含有靶序列的判断，就可以取出该样本并将另一样本置于其位置上，从而增加了样本的流通量。这一点在以带有不同反应混合物（如一些用于测试遗传疾病，另一些用于测试HIV 等等）的多至96个小孔装入热交换器时，或者当按不同时间装入混合物时，尤其显示出其优点。

以上是对本发明具体实施方案的详尽的描述。应认识到在本发明范围内可以作出偏离已公开的具体方案，而且对本领域技术人员来讲可以进行显而易见的修改。本发明的全部范围在所附权利要求及其等同物中列出。因此，本发明的权利要求和说明书不应该被认为将保护的全部范围不适当地缩小至本发明命名的范围内。

荧光强度 (cps)
1.010e+06
1.520e+05
25°C
50°C
94°C
0
2000
4000
6000
8000
10000
时间（秒）
参见图 1 A

图 1

荧光强度 (cps)
a
b
c
4000
4020
4030
时间（秒）

图 1A

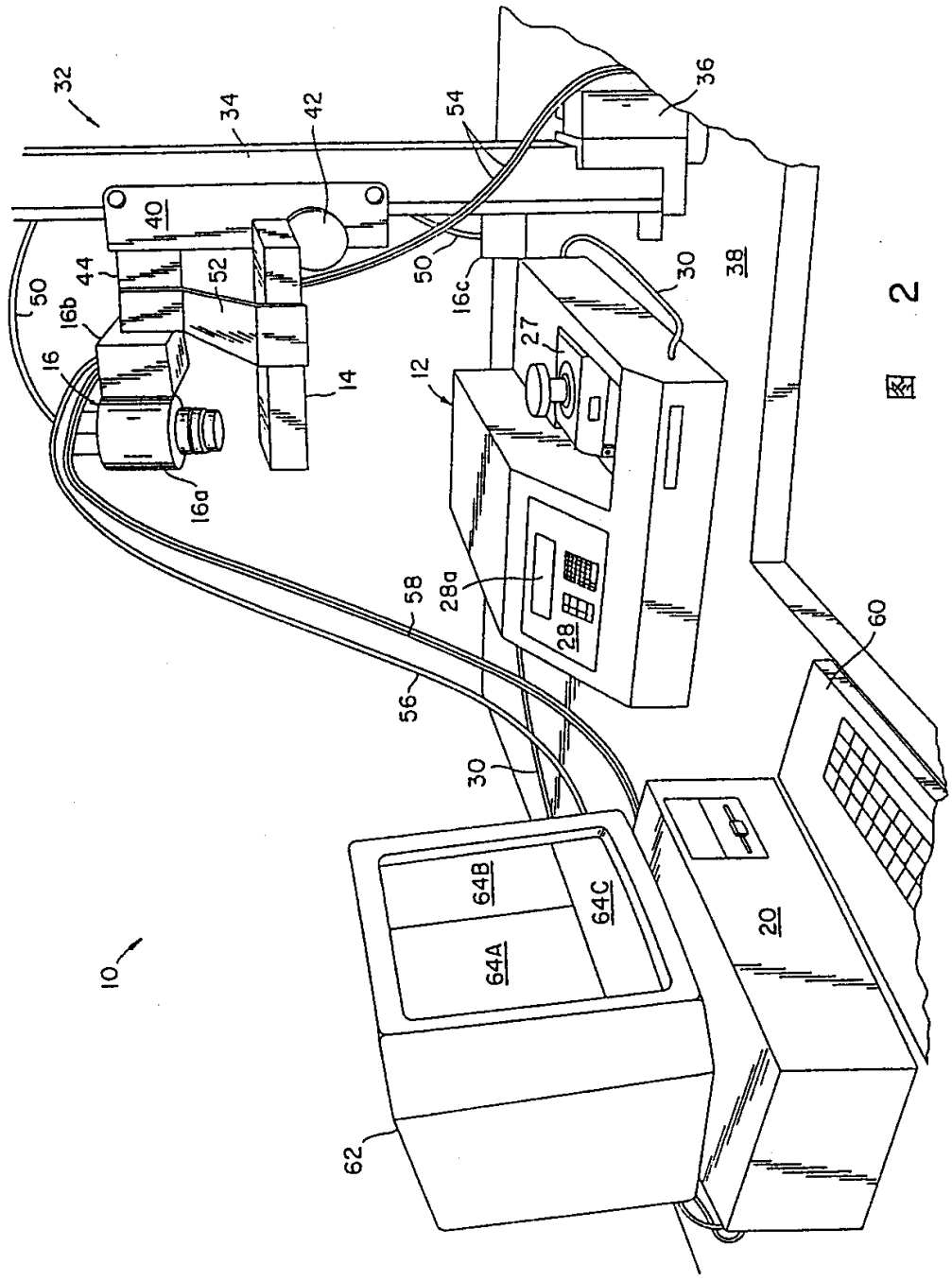

32
34
42
54
36
40
44
52
50
16b
16
16a
14
50
16c
30
38
27
12
28a
28
58
56
60
30
64B
64C
64A
20
62
10

图 2

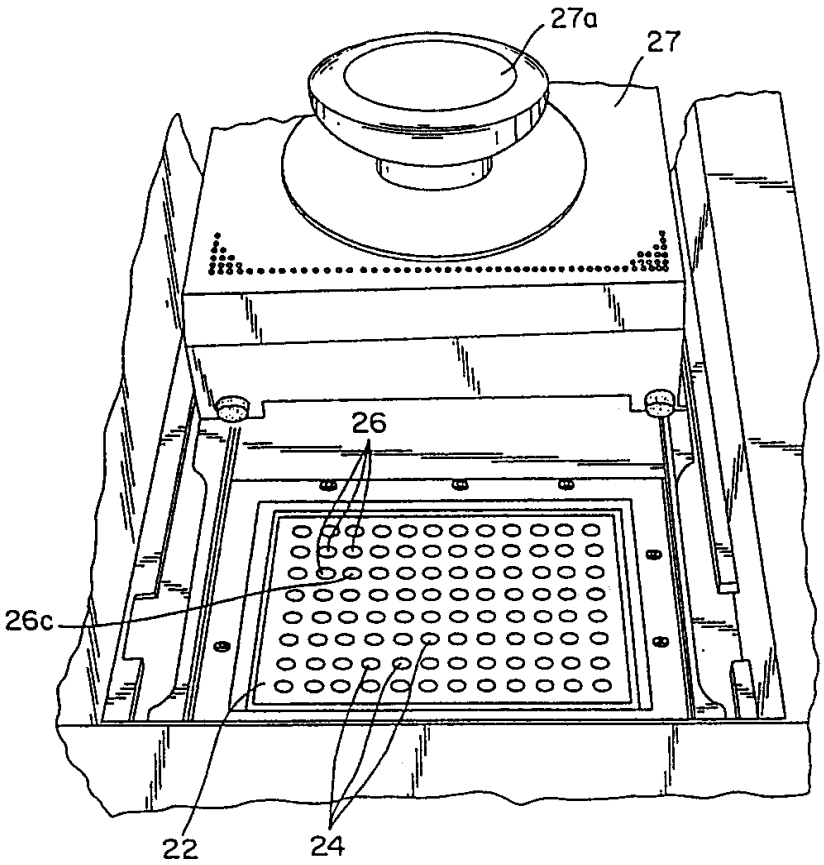


图 3

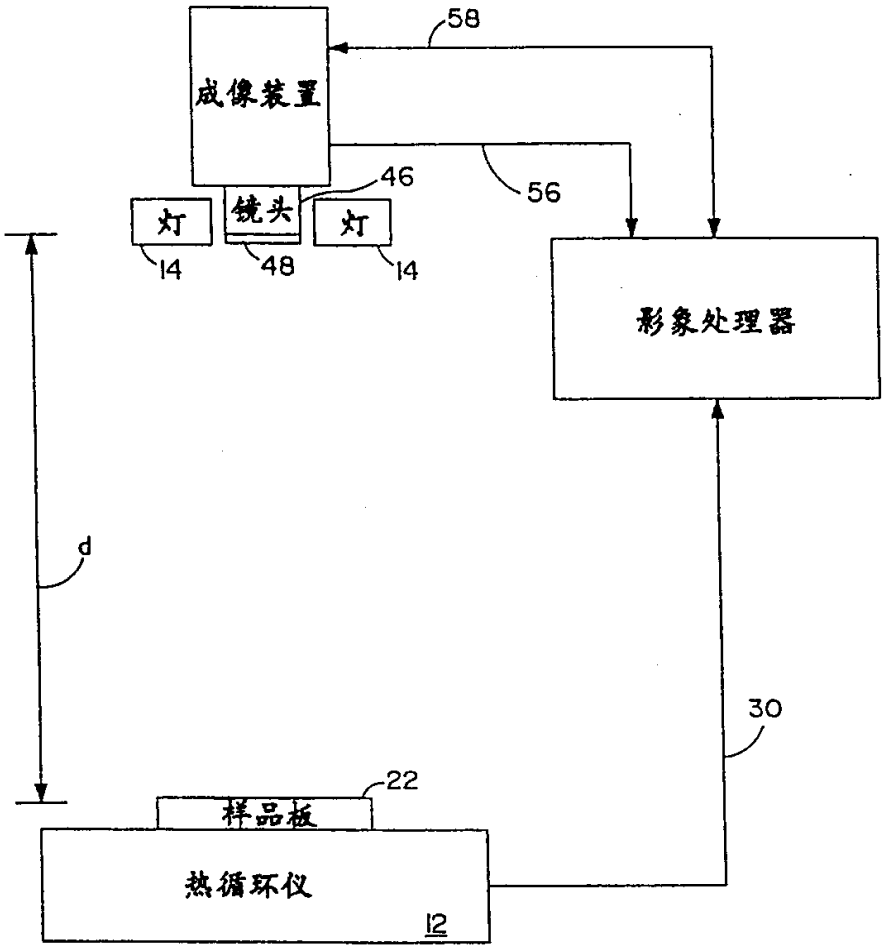
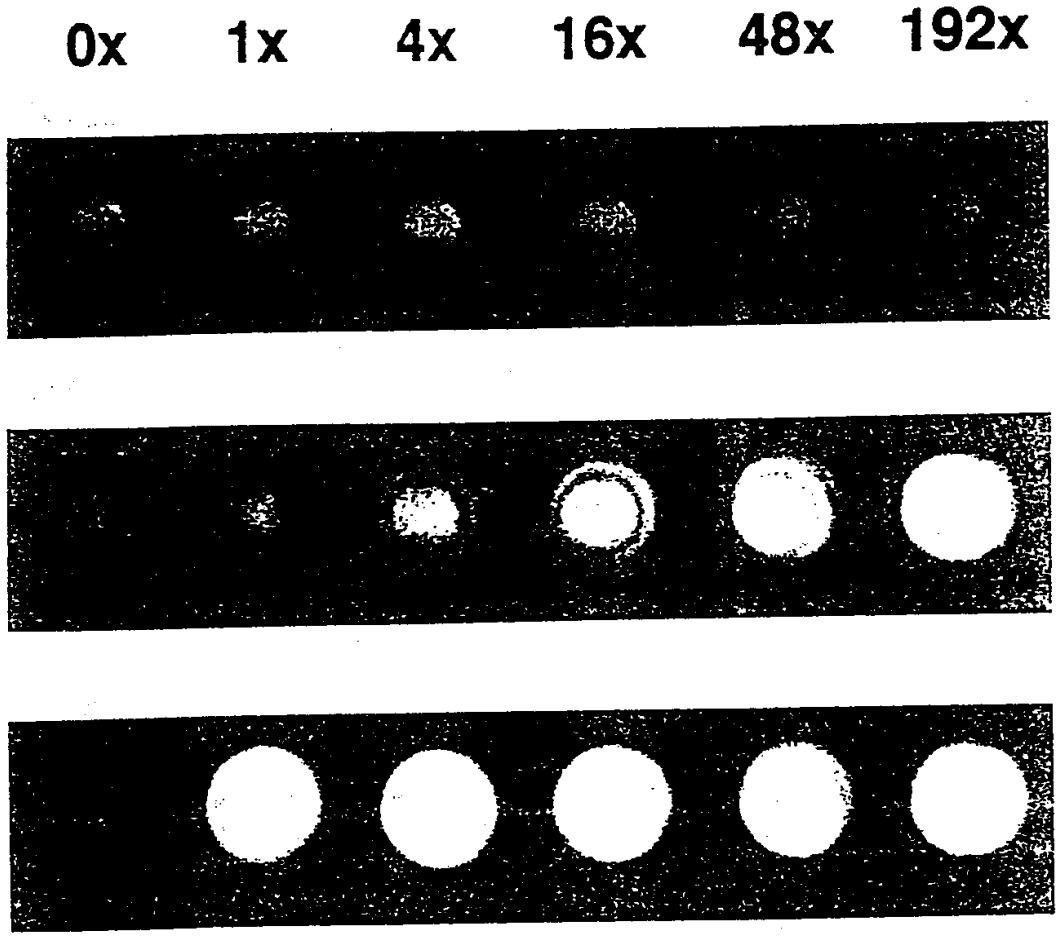


图 4

图 5



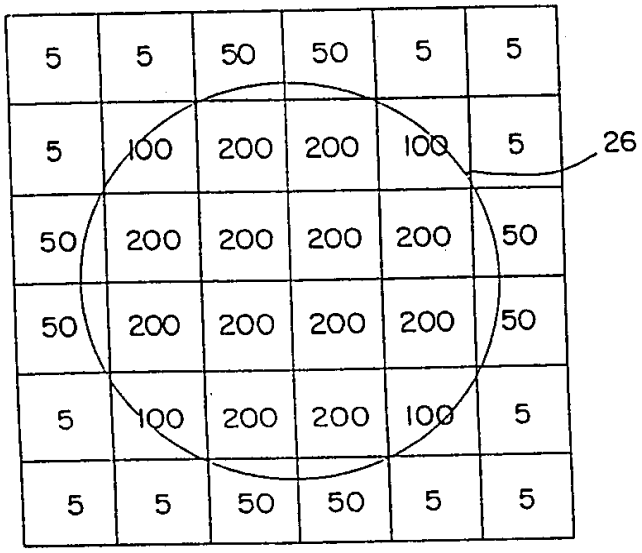

5 5 50 50 5 5
5 100 200 200 100 5
50 200 200 200 200 50
50 200 200 200 200 50
5 100 200 200 100 5
5 5 50 50 5 5
26

图 6

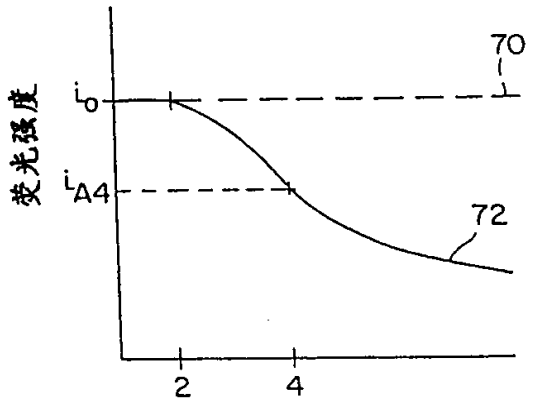

荧光强度
i_0
i_{A4}
70
72
2
4

图 7

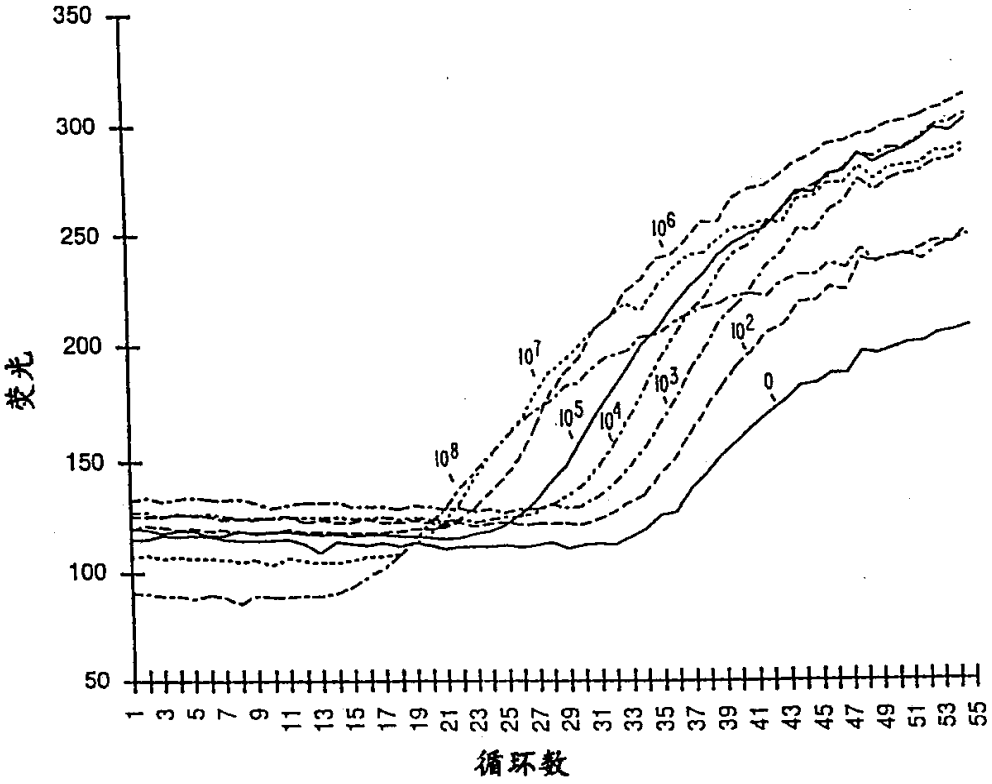

350
300
250
200
150
100
50
荧光
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
0
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55
循环数

图 8A

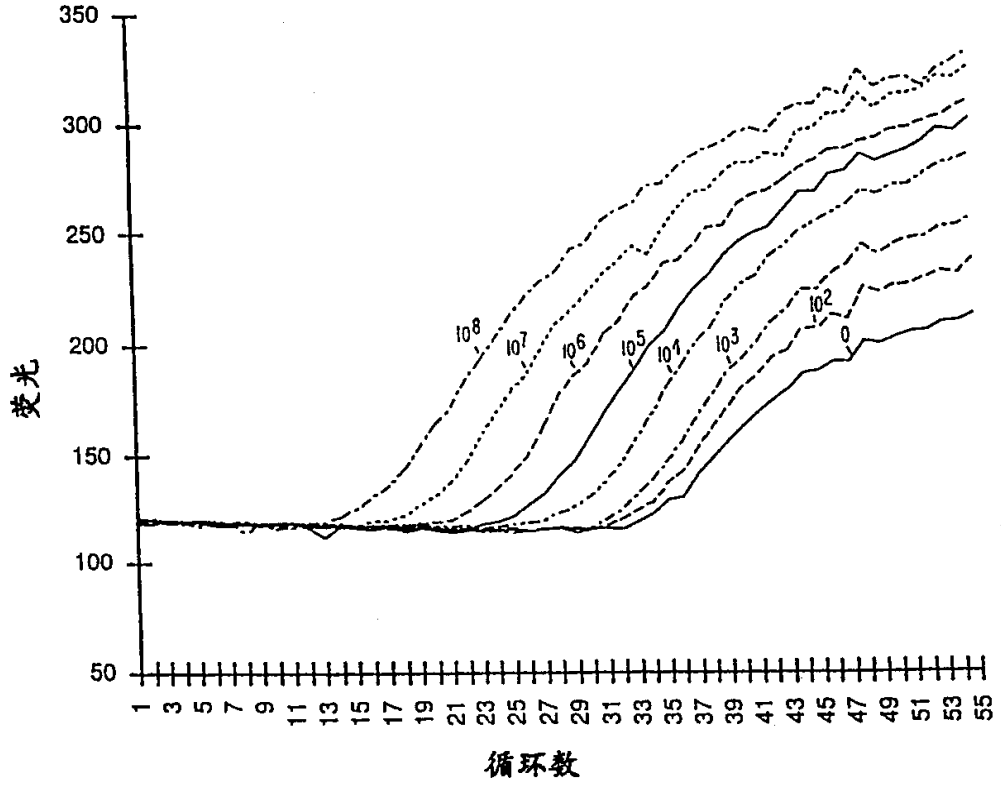
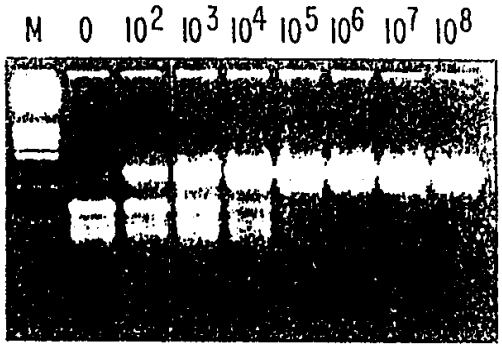

350
300
250
200
150
100
50
荧光
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
0
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55
循环数

图 8B

图 8 C



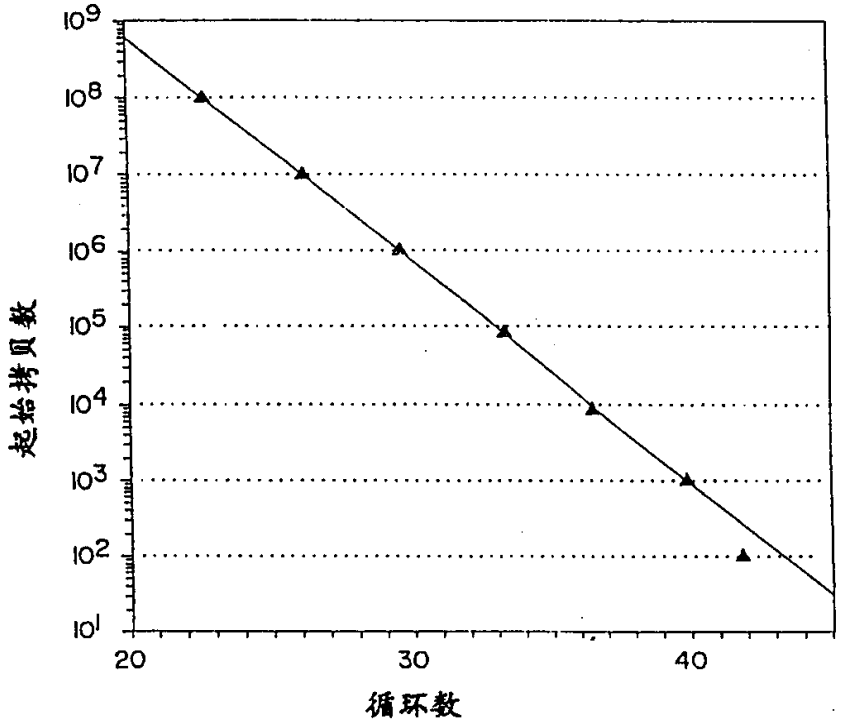


图 9

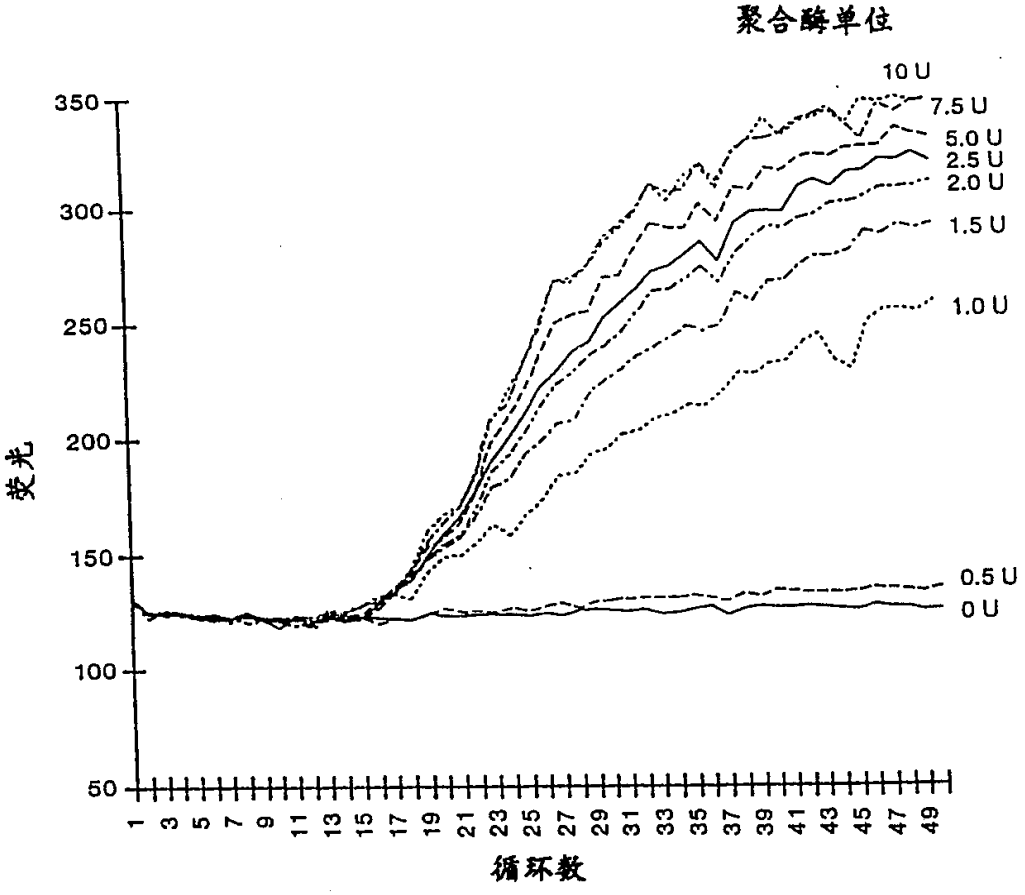

聚合酶单位
10 U
7.5 U
5.0 U
2.5 U
2.0 U
1.5 U
1.0 U
0.5 U
0 U
350
300
250
200
150
100
50
荧光
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31
33
35
37
39
41
43
45
47
49
循环数

图 10A

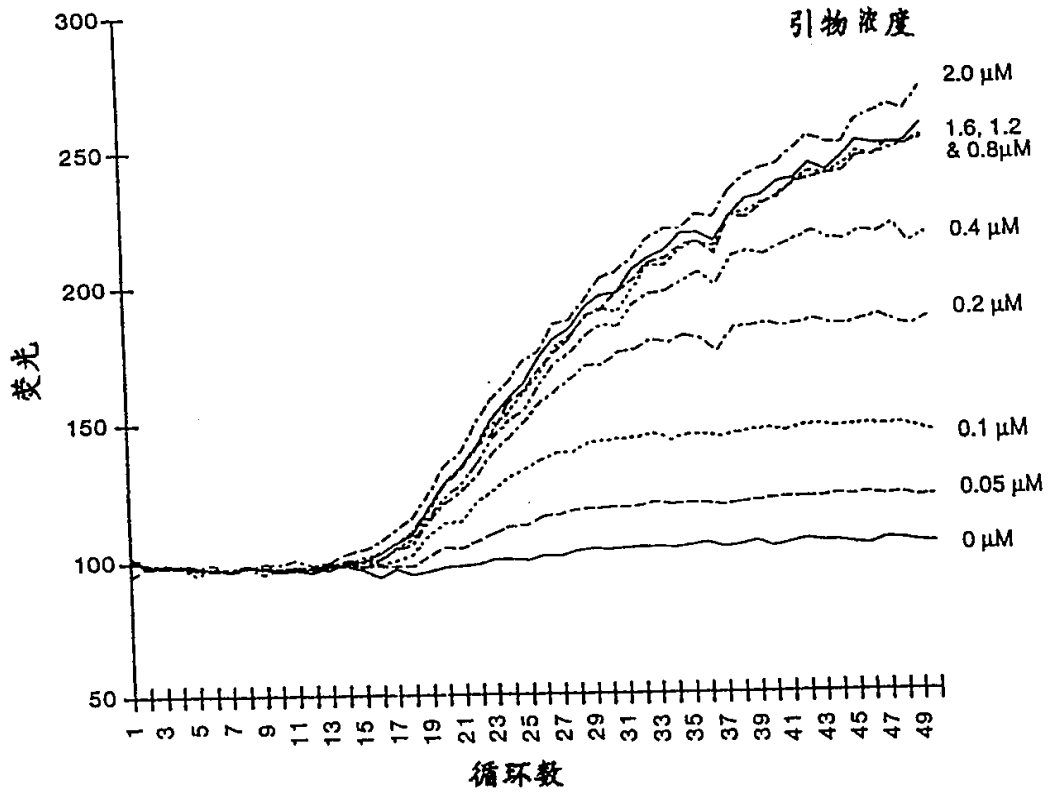

引物浓度
2.0 μM
1.6, 1.2
& 0.8μM
0.4 μM
0.2 μM
0.1 μM
0.05 μM
0 μM
荧光
300
250
200
150
100
50
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49
循环数

图 10B

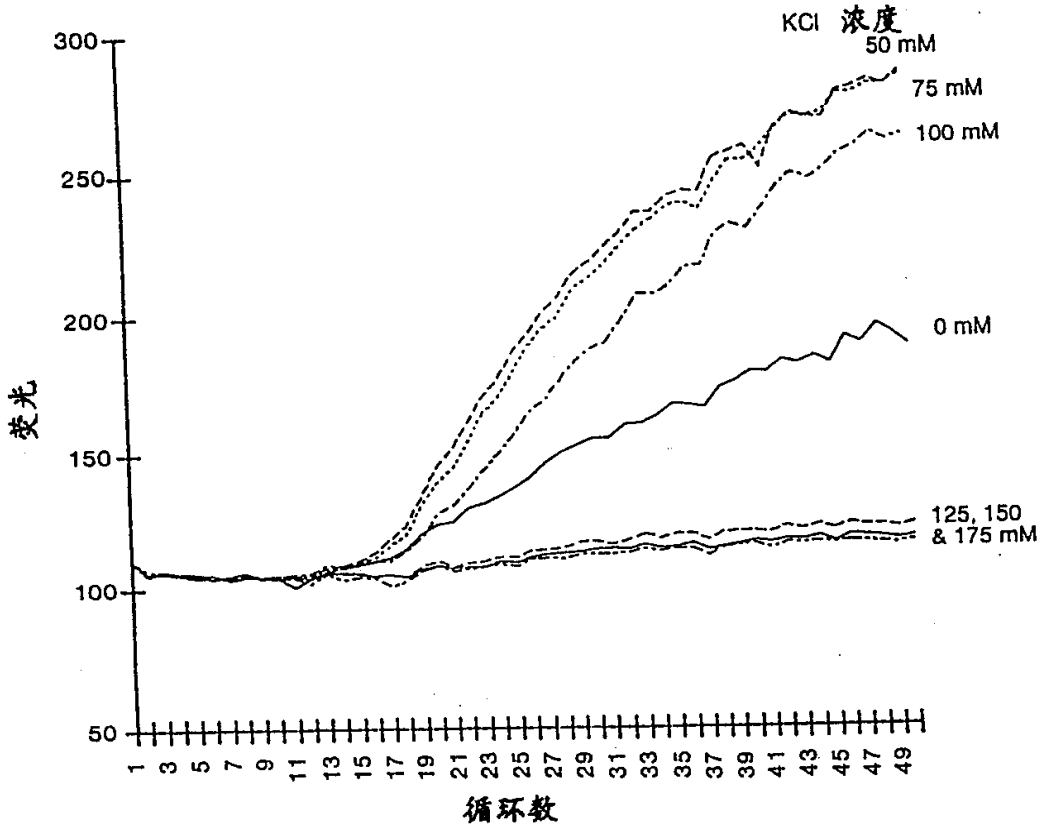

KCl 浓度
50 mM
75 mM
100 mM
0 mM
125, 150
& 175 mM
300
250
200
150
100
50
荧光
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49
循环数

图 10C

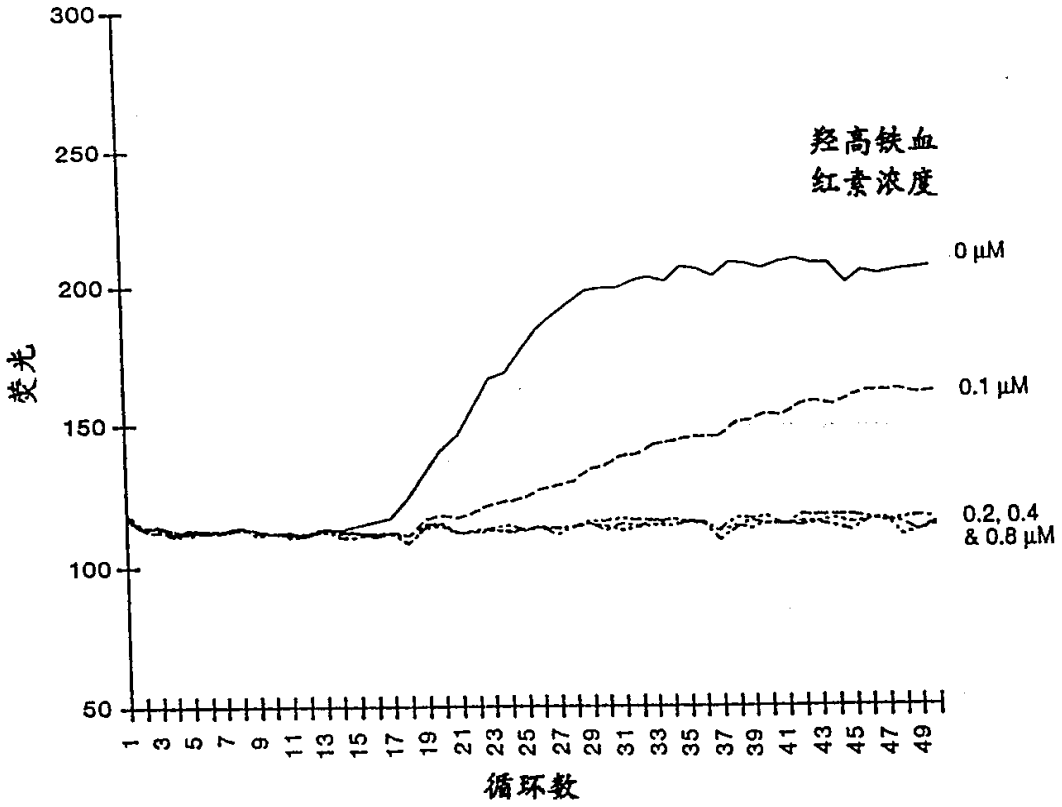

300
250
200
150
100
50
荧光
羟高铁血
红素浓度
0 μM
0.1 μM
0.2, 0.4
& 0.8 μM
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49
循环数

图 10D

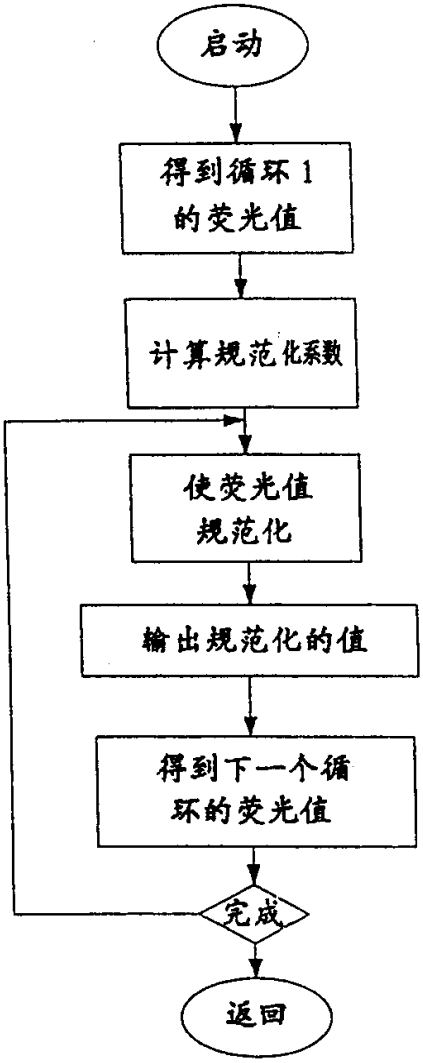

启动
得到循环 1
的荧光值
计算规范化系数
使荧光值
规范化
输出规范化的值
得到下一个循
环的荧光值
完成
返回

图 11

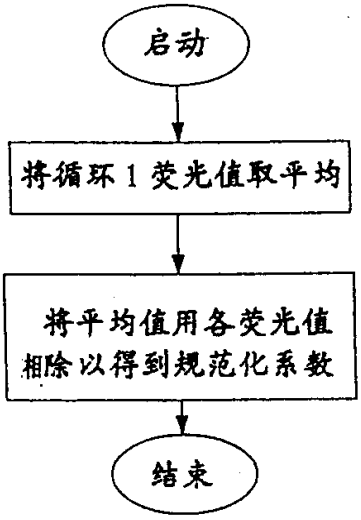

启动
将循环 1 荧光值取平均
将平均值用各荧光值
相除以得到规范化系数
结束

图 13

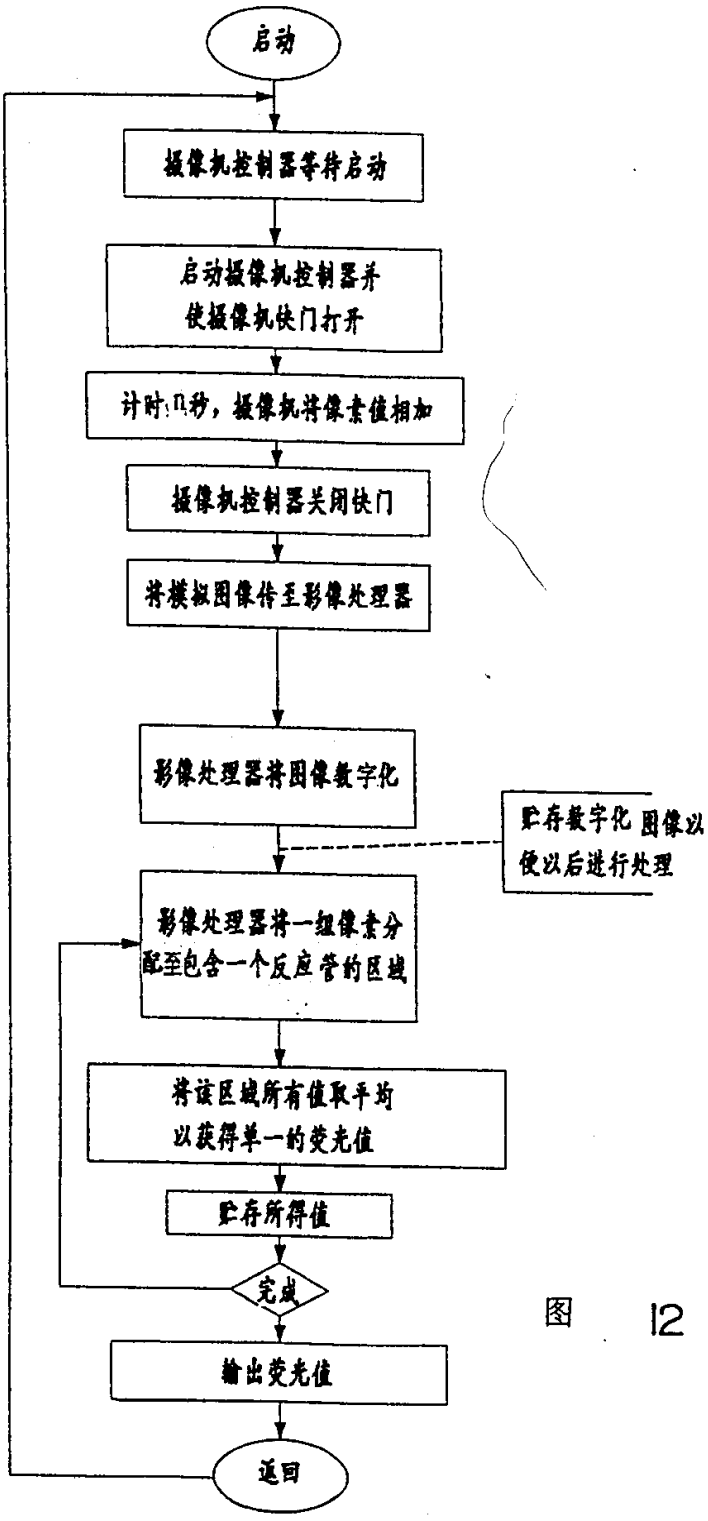

启动
摄像机控制器等待启动
启动摄像机控制器并
使摄像机快门打开
计时几秒，摄像机将像素值相加
摄像机控制器关闭快门
将模拟图像传至影像处理器
影像处理器将图像数字化
贮存数字化图像以
便以后进行处理
影像处理器将一组像素分
配至包含一个反应管的区域
将该区域所有值取平均
以获得单一的荧光值
贮存所得值
完成
输出荧光值
返回

图 12

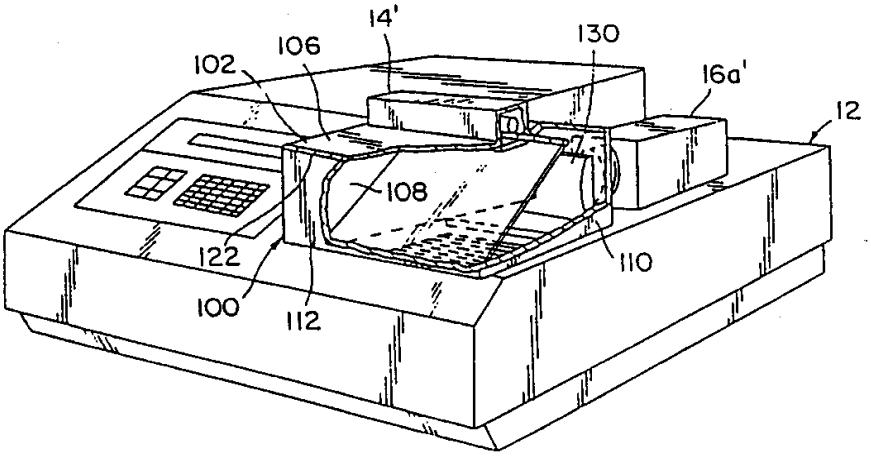

14'
106
102
130
16a'
12
108
122
110
100
112

图 14

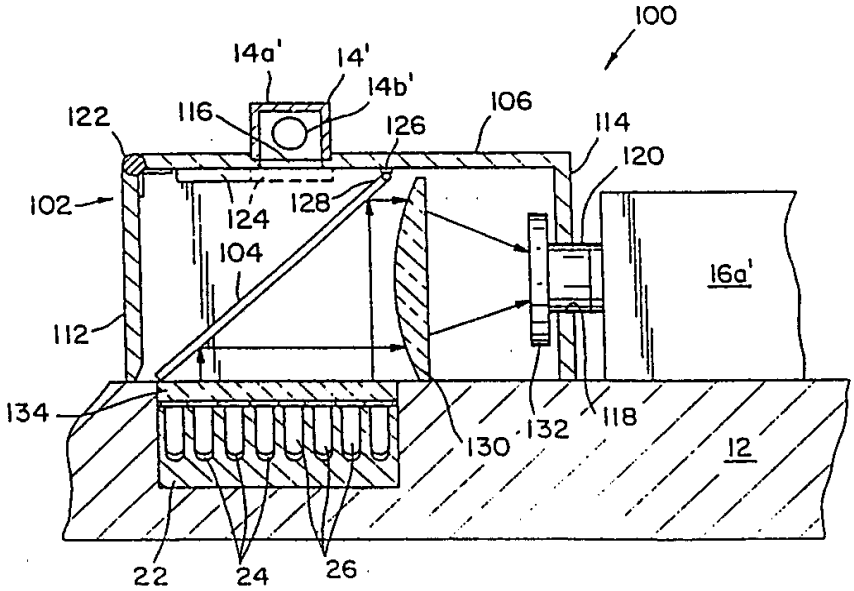

100
14a'
14'
14b'
122
116
126
106
114
120
102
124
128
104
16a'
112
134
130
132
118
12
22
24
26

图 15

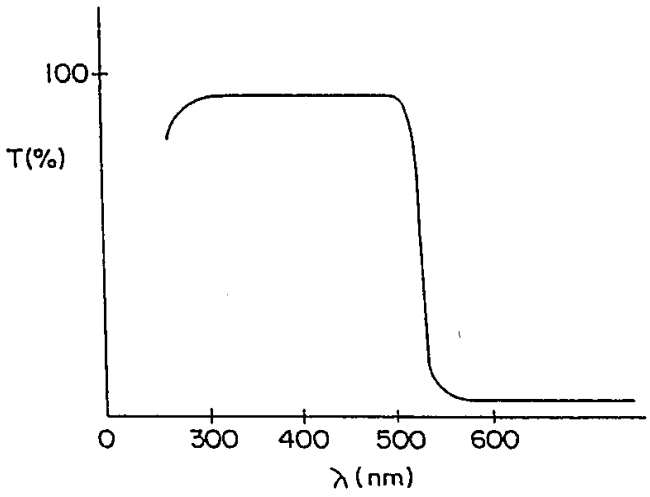


图 16

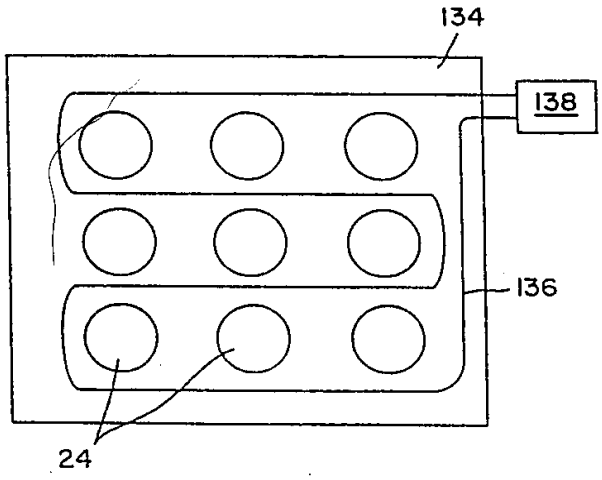


图 17