

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810088157.9

[51] Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[43] 公开日 2008年8月27日

[11] 公开号 CN 101251486A

[22] 申请日 2008.2.20

[21] 申请号 200810088157.9

[30] 优先权

[32] 2007.2.21 [33] EP [31] 07102771.8

[71] 申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 R·伊滕

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 段晓玲 韦欣华

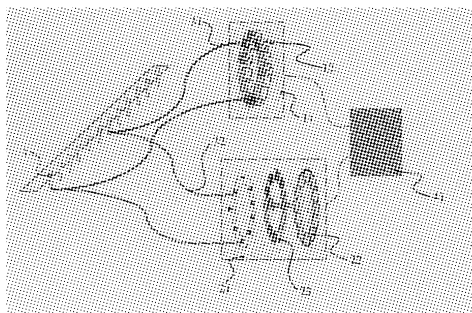
权利要求书3页 说明书21页 附图5页

[54] 发明名称

用于发射和检测光束的装置

[57] 摘要

本发明的目的是提供用于发射和检测光束的装置、仪器和特别用于多重 PCR 应用的方法，其允许大量样品的样品检测时间缩短并具有高灵敏度。



1. 用于发射和检测光束的装置，包含
 - 至少两个反应区域，
 - 激发模块，包含至少两个能够提供不同光谱和波长的激发光束的激发光源，
 - 至少两个第一光导，每个第一光导能够将所述激发光源之一发射的光束引导至所述反应区域的至少一个，
 - 至少两个第二光导，每个第二光导能够将所述反应区域之一发射的光束引导至发射模块，
 - 发射模块，其能够独立地和同时地检测从所述至少两个反应区域的每一个发射的光束，所述发射模块至少包含两个检波器和旋转滤波轮，所述旋转滤波轮位于所述至少两个第二光导和所述检波器之间，和
 - 控制单元，其能够控制所述激发光源的动作和所述发射模块的动作，其中，所述激发光源的动作和所述发射模块的所述旋转滤波轮的转动是电偶联的，和其中所述旋转滤波轮的转动方式使得，对于每个反应区域而言，当所述反应区域被各自的激发光束激发时，安装在所述旋转滤波轮上的滤波器的透射光谱和从所述各个反应区域发射的所述光束的发射光谱相对应；特征在于，所述至少两个激发光源的第一激发光源发射第一波长的光，其通过第一光导传送到至少第一反应区域，和同时，所述至少两个激发光源的第二激发光源发射不同于所述第一波长的第二波长的光，其通过第二光导传送到至少第二反应区域。
2. 根据权利要求 1 所述的装置，其中所述至少两个激发光源安装在旋转轮上，和其中所述携带有所述激发光源的所述旋转轮可以相对于所述第一光导的位置转动，从而至少允许所述激发光源之一发射光束到一个确定的第一光导，和其中所述旋转轮向预先确定位置的转动受所述控制单元的控制。
3. 根据权利要求 1 所述的装置，其中所述至少两个激发光源的每个能够提供各种不同波长光谱的激发光束。
4. 根据权利要求 1—3 任一所述的装置，其中所述激发光源是发光二极管(LED)。

5. 根据权利要求1-4任一所述的装置,其中所述第一光导是单个的或分叉的光导簇,其能够将所述激发光源之一发射的光束引导至至少两个所述反应区域。

6. 根据权利要求1、2、4和5中任一所述的装置,其中所述激发光源每个代表不同的激发波长。

7. 根据权利要求1-6任一所述的装置,其中当旋转滤波轮转动时,所述激发光源被控制单元关闭。

8. 根据权利要求1-7任一所述的装置,其中所述至少一个第一光导的一端附连在所述激发模块上的位置,从而允许一个激发光源与所述一个第一光导光学接触,而在另一端所述至少一个第一光导附连到至少一个反应区域,从而介导发射自所述激发光源的光束到所述至少一个反应区域的确定位置。

9. 根据权利要求2与4-8任一所述的装置,其中携带所述激发光源的所述旋转轮的转动和所述发射模块的旋转滤波轮的转动是电耦联的。

10. 根据权利要求1-9任一所述的装置,还包含用于监控光源功率的至少一个控制光导。

11. 用于扩增和检测核酸的仪器,至少包括

一放置在至少两个反应区域之一中的样品,包含多种组分和可检测标记物,其能够在激发时产生光发射,所述光发射在靶存在时不同于在靶不存在时,

一使所述样品进行扩增和/或熔化反应的设备,和

一根据权利要求1-10任一所述的装置。

12. 使用根据权利要求1-10任一所述装置检测样品中特定试样的方法,包括

一在至少两个反应区域之一中提供样品,其包含至少两种可检测的标记物,其中,当用包含各自激发波长的光的激发光束激发时,每种可检测的标记物发射各自可检测的光束,

一用发射自至少两个激发光源的不同波长光谱的激发光束照射所述样品,和

一当可检测标记物被各自的激发光束激发时,使用发射模块检测发射自样品的发射光束。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述特定试样是核酸。

14. 根据权利要求 13 所述的方法, 还包括步骤
—扩增和/或熔化所述样品中的至少一种靶核酸。

用于发射和检测光束的装置

技术领域

本发明的主题是用于发射和检测光束的装置，包含用于发射和检测光束的装置的用于扩增和检测核酸的仪器，和用于检测样品中特定试样（如核酸）的方法。

背景技术

本发明特别的应用于医疗保健领域以及生物和医学研究，尤其是用于核酸的分析、基因的定量和基因型分型，这里需要对于样品所含成分进行可靠分析。通过光学系统监测化学反应是公知的，例如来自分子诊断（Molecular Diagnostics）的实例，其中通过插入到DNA双链螺旋中心的堆叠碱基之间的荧光染料（例如碘化丙锭，cybergreen，吡啶橙）检测和定量化学反应，或通过用化合物如荧光素、若丹明、青色染料标记的寡核苷酸检测和定量化学反应的特定产物，其中这些标记的寡核苷酸特异性杂交到靶DNA序列上。这里，重要的方面是通过特定波长的光束激发染料并测定这些染料所发射的光来监测反应。这些步骤中的精确性是这些方法准确性的前提。

使用包括变性和扩增步骤的反应循环的方法是聚合酶链式反应（PCR）。这项技术使核酸处理领域内发生了革命性的变化，尤其是在核酸分析上，其提供了增加特定序列的核酸的数量的工具，从可忽略的量增加到能检测的量。EP 0201184 和 EP 0200362 中描述了PCR。例如 EP 0236069 公开了以可控的方式对试管中的样品通过加热和冷却延展的金属块进行热循环的仪器。

越来越多新改进的和更有效的PCR技术已经研究。定量实时PCR是一项实验室技术，其用于同时扩增和定量给定DNA分子的特定部分。该技术用于确定样品中是否存在特定的序列，并且如果存在，则能定量其在样品中的拷贝数。两种常用的定量方法是采用插有双链DNA的荧光染料和经改性的DNA寡核苷酸探针，所述探针当杂交到与其互补的DNA时能够发出荧光。这些方法描述在EP 0512334中。

此外，开发了能够在在一个反应试管中平行扩增两种或多种产物的多重

PCR。在研究、法医和诊断实验室中，该技术广泛地用于基因型分型应用和 DNA 测试的不同领域。使用来源于各种真核生物和原核生物的 cDNA 作为起始模版，多重 PCR 也可以用于定量的或半定量的基因表达的分析。

用于执行、检测和监测上述方法的各种仪器在本领域内是已知的。EP 0953837 中描述的 Roche Cobas[®] TaqMan[®] 仪器，以及 Roche Lightcycler 480 仪器，使用白光源向样品提供激发光束。使用传统的白光源作为激发光源的缺点是因为这样的白光源使用寿命通常低于 1000 个工作小时，从而导致增加了维护和维修的精力和费用。而且，一些白光源（尤其是卤素灯泡）的光谱能量在蓝光范围内相当低，只有有限的能量来激发样品，导致检测的时间增加。此外，白光源的缺点在于它们使用了不同的光谱波长从而需要使用昂贵的滤波器，因为大部分具有其他波长的光不能用于该应用中并且需要滤波器阻断。另外，白光源产生热量，这需从仪器中散出。

在本领域内已知的其它仪器中，激发光束是由单一的发光二极管例如 Roche Lightcycler[®] 1.5 和 2.0 仪器产生的，或由激光例如在 WO 2003/098278 中描述的 ABI Prism 7700、7900 仪器产生，或由相同波长的多个发光二极管如在 WO 2003/002991 中描述的 Eppendorf Mastercycler[®] 的 realplex 仪器产生。由于这些仪器限制为一种特定的激发波长，所以几乎不能进行水解多重应用 (hydrolysis multiplex application)，因为某些染料可能不被激发或者几乎没有被激发，或者只有在仪器构建时具有复杂的修改情况下。

另外，其它仪器，例如在 US 6369893 中描述的 Cepheid Smartcycler，使用不同波长的数种发光二极管来激发一个特定的反应区域。几种检波器用于检测来自同一特定反应区域的发射光。如果需要分析大量的反应区域则这是不利的，因为所有的部件，如 LED 和检波器，需要根据待分析的反应区域数目而倍增。另外，滤波器和分色镜的数量以及用于驱动 LED 和预先放大光电二极管信号的电路也相应的增加。另外，使用多于 4 种不同波长的 LED 类型时，增加了更多的复杂性。因此，当几种反应区域需要用 US 6369893 中描述的检测系统来检测时，检测系统的费用就变得非常高，同样复杂性也一样增高。

此外，在 DE4424961 中描述的分光计仪器是本领域已知的，其使用固定光源 (static light source) 和光纤，每根光纤的一端与一个样品区域连接，另一端与转轮连接。通过转动转轮使每个反应区域可以与固定光源光接触。但是，这种

概念的仪器的缺点在于单一光源的光顺序应用在每个反应区域。使用这种仪器不可能平行地在几个反应区域中检测具有独特激发和发射光谱的数种染料标记物。这将导致检测时间的延长，尤其是当需要和 PCR 应用中一样重复检测大量的样品时，导致总的 PCR 过程时间延长。

因此本申请的目的在于提供在多重 PCR 应用中特别有用的光学系统，其使得对许多样品有短的检测时间并具有高的灵敏度。另外，为了减少复杂性和费用，分析数个反应区域的元件（即激发光源、滤波器和检波器）的数量应该保持最小。

附图说明

本发明的优选实施方案通过举例描述如下，并参见附图，其中：

图 1 显示了用于发射和检测光束的装置，包括具有作为光源（12）的多波长照明器的激发模块（11），包含旋转滤波轮（rotary filter wheel）（23）和检波器（detector）（22）的发射模块（21），控制单元（41），和分别将从一个光源发射的光引导到一个反应区域（1）和将从该反应区域发射的光引导到发射模块（21）的第一（31）和第二（32）光导。

图 2 显示了用于发射和检测光束的装置，包括具有作为光源（12）的多波长照明器的激发模块（11），并使用分叉激发光纤束作为第一光导（31）。

图 3 显示了用于发射和检测光束的装置的另一实施方案，包括具有安装在旋转轮（13）上的多个不同波长的发光二极管（LED）作为光源（12）的激发模块（11），包含旋转滤波轮（23）和检波器（22）的发射模块（21），控制单元（41），和分别用于将从一个光源发射的光引导到一个反应区域（1）和将从所述反应区域发射的光引导到发射模块（21）的第一（31）和第二（32）光导。

图 4 显示了用于发射和检测光束的装置，包括具有安装在旋转轮（13）上的多个不同波长的发光二极管作为光源（12）的激发模块（11），并使用分叉激发光纤束作为第一光导（31）。

图 5 描述了如图 1 和图 3 所示的本发明实施方案中第一（31）和第二（32）光导分布的示意图，每个第一光导引导从光源（12）在特定位置发射的光到特定的反应区域（1），并且每个第二光导（32）引导从特定反应区域发射的光到发射模块（21）的特定位置。

图 6 描述了如图 2 和图 4 所示的本发明实施方案中第一（31）和第二（32）

光导分布的示意图，每个分叉的第一光导引导从光源（12）在特定位置发射的光到两个特定的反应区域（1），并且每个第二光导引导从特定反应区域发射的光到发射模块（21）的特定位置。

图7和8显示了使用根据本发明所述的仪器进行PCR的荧光强度的扩增曲线，靶模板浓度为每 μl 10^6 拷贝的HCV mRNA，每 μl 40拷贝的定量标样(QS)。该靶用FAM-染料标记而QS用HEX-染料标记。这两种靶同时通过运行多重PCR进行扩增。总共对10种样品进行处理。图7显示了靶FAM-荧光强度水平的扩增曲线，图8显示了QS HEX-荧光强度水平的扩增曲线。

图9显示了不同测量步骤的顺序图，这是为了在所有反应区域测量所有的染料-标记物而需要的。该顺序图表是指具有6种不同颜色发光二极管的实施方案。该序列图应用到总共12个反应位点，每个位点包含具有6种不同染料标记物的样品。

附图中显示的实施方案用于帮助理解本发明，而不是作为限制。

发明内容

本发明的第一个主题是用于发射和检测光束的装置，包括

- 至少两个反应区域，
- 激发模块，其包含能够提供不同的光谱和波长的激发光束的至少两个激发光源，
- 至少两个第一光导，每个光导能够引导从所述激发光源之一发射的光束到至少一个所述反应区域，
- 至少两个第二光导，每个第二光导能够引导从所述反应区域之一发射的光束到发射模块，
- 发射模块，其能够独立地和同时地检测从所述至少两个反应区域的每一个发射的光束，所述发射模块至少包含两个检波器和旋转滤波轮，所述旋转滤波轮位于所述至少两个第二光导和所述检波器之间，和，
- 控制单元，其能够控制所述激发光源的和所述发射模块的动作(activity)，其中，所述激发光源的动作和所述发射模块的旋转滤波轮的转动是电偶联的，其中所述旋转滤波轮的转动方式使得，对于每个反应区域而言，当所述反应区域被各自的激发光束激发时，安装在所述旋转滤波轮上的滤波器的透射光谱和从所述各个反应区域发射的所述光束的发射光谱相对应；特征在于，在同

时，所述至少两个激发光源的第一激发光源发射第一波长的光，其通过第一光导传送到至少第一反应区域，和所述至少两个激发光源的第二激发光源发射不同于所述第一波长的第二波长的光，其通过第二光导传送到至少第二反应区域。

本发明的第二个主题是用于扩增和检测核酸的仪器，至少包括：

一放置在至少两个反应区域之一中的样品，其包括多种组分和通过激发能够产生光发射的可检测标记物，所述光发射当靶存在时与靶不存在时是不同的，

一用于使所述样品发生扩增和/或融化反应的设备，和

一根据本发明所述的装置。

本发明的第三个主题是使用本发明的装置检测样品中特定试样的方法，包括

一在所述至少两个反应区域之一中提供样品，该样品包含至少两种可检测的标记物，其中，当用包含各自激发波长光的激发光束激发所述可检测标记物时，每种可检测标记物发射各自的可检测光束，

一用从至少两个激发光源发射出的不同光谱和波长的激发光束照射所述样品，和

一当可检测标记物被各自的激发光束激发时，通过发射模块检测从样品发射的发射光束。

具体实施方式

本发明涉及用于发射和检测光束的装置和包含上述装置的用于扩增和检测核酸的仪器。这里，根据本发明所述的‘光源’优选是发光二极管(LED)、有机发光二极管、激光器(例如气体激光器、化学激光器、受激准分子激光器、固态激光器、半导体激光器、染料激光器、微丝激光器(micro-wire laser))或其组合。

发光二极管(LED)是当沿着正向电偏压时发射非相干窄谱光(电致发光)的半导体设备。发射光的颜色依赖于所使用的半导体材料的化学组成，可以是近紫外光、可见光或近红外光。发射光的波长以及因而其颜色，依赖于形成p-n结的材料的带隙能量。在硅或者锗二极管中，电子和空穴通过非辐射性跃迁(导致没有光发射)发生复合，因为这些是间接带隙材料(indirect band gap material)。如果LED的发射层材料是有机化合物，则称作有机发光二极管(OLED)。为实现半导体的功能，有机发射材料必须有共轭的 π 键。发射材料可以是晶体态的小

的有机分子，或聚合物。聚合物材料可以是柔性的；所述LED'称作PLED或者FLED。与常规的LED相比，OLED更轻，聚合物LED可以具有柔性这种额外的优点。最近，新一代的LED（例如来自Philips Lumiled 照明公司的Luxeon Star）已经开发，与传统的LED相比其具有大得多的光功率。如果传统的LED的光功率不足以充分灵敏度来测量各种样品，那么这些LED可用于光学系统中。此外，这些高功率LED只是比传统的LED大一点。因此，仅需要较小的冷却块（cooling block），因为与传统的白光源相比其散发的热量更加得少。

此外，被称为‘多波长照明器’的LED在本领域内是已知的。这里，一个设备提供了多个封装在紧凑的导热陶瓷基板上的LED芯片（LED chip），所述芯片具有单独受控的从紫外到可见红色光谱范围内的多种波长。

使用LED的优点是因为LED很难断裂并且极其耐用，具有100'000和更多的工作小时的寿命。LED的另一个优点是传统的白光源相比非常小。因此，数个LED可以固定在‘激发模块’中，或可以在‘激发模块’中和冷却块以及所属光学元件（belonging optics）比如透镜和滤波器一起安装在旋转轮上。

‘光源’也可以是以相干光束发射光子的激光器。激光器通常含有激活的激光介质或增益介质，所属介质在从它以前通过外源能量转移而受激到达的较高能态电子跃迁或者分子跃迁到较低能态时能够产生受激发射（stimulated emission）。已经发现多种材料具有形成激光器增益介质所属的性质，所述增益介质是为激光器（气体、液体、染料、固体物质）提供能量所需的。因此，已经开发了适合用于不同场合的具有不同特性的多种激光器类型。在根据本发明的装置中使用激光器的优点是激光器通常以窄光束发射，接近单色，并且由单一波长或颜色组成。此外，激光器可以用于其中通过一种颜色平行激发许多样品的应用中，这是因为激光提供了高能量的光。

‘激发模块（excitation module）’是指含有一个或多个‘光源’的装置的一部分，其中所述的光源发射光以激发位于反应区域中的样品中的特定染料。在特定的实施方案中，该装置的‘激发模块’进一步包含‘旋转轮’，旋转轮含有或携带了用于反应区域激发的光源。此外，在一些实施方案中，适当中心波长和带宽的滤波器可以与透镜一起安装在旋转轮上，所述透镜可能是准直来自光源的光所必需的。

‘发射模块（emission module）’是指含有至少两个检波器的装置的一部分，

所述检波器检测由反应区域中样品发射的光。‘检波器 (detector)’ 是部件，其将光转变成和入射光 (光子) 成比例的电流。‘发射模块’ 进一步包括含有滤波器的‘旋转滤波轮’，滤波器过滤由反应区域中样品发射的光。需要滤波器来阻止和因此把光源发射的光和样品中染料发射的光分离开，因为来自光源的光可能在反应区域和光学系统中的其他部件中散射。发射模块中可以存在透镜，用于准直通过滤波器的光。

‘光导 (light guide)’ 用于传输或分布自然或人工光。‘光导’ 也可以是由玻璃或塑料制成的光学纤维并设计用于通过内全反射沿着其长度引导光。这样的光学纤维广泛地应用于光纤通信中。一方面‘光导’ 可能是单一的玻璃或塑料纤维，或者另一方面可能由这些纤维组成。‘光纤’ 的另一例子是玻璃或塑料棒。另一种类型的‘光导’ 是流体光导。所有这些类型的‘光导’ 可以是分叉的或者不分叉的。此外，分叉的‘光导’ 可以是双重或者多重分叉的。

用在这里的术语‘反应区域’ 是指本发明装置中的区域或部分，其能够容纳含有染料的待测量样品。在某些实施方案中，‘反应区域’ 是指容器 (vessel)，其位于装置中特定的位置上并且含有由该装置检测的包含染料的样品。

‘控制单元’ 含有控制器，其控制旋转滤波轮的运动并操控着光源和检波器的运行。特别的，‘控制单元’ 将旋转滤波轮的转动与光源和检波器的运行协调起来。在特定实施方案中，‘控制单元’ 进一步控制着携带有光源的旋转轮的运动，并使得旋转轮的运动和光源的运行与旋转滤波轮的运动和检波器的运行协调起来。

在本发明的一个实施方案中，用于发射和检测光束的装置包括至少两个反应区域，和激发模块，所述激发模块包含至少两个能够提供不同光谱和波长的激发光束的激发光源。该装置进一步包含至少两个第一光导，每个第一光导能够引导从激发光源之一发射的光束到反应区域的至少一个中；以及至少两个第二光导，每一个第二光导能够引导从反应区域之一中发射的光束到发射模块。该装置进一步包括发射模块，其能够独立地和同时地检测从所述至少两个反应区域的每一个发射的光束。该发射模块至少包括两个检波器和旋转滤波轮，其中所述滤波轮位于所述至少第二光导和检波器之间。此外，该装置包括控制单元，其能够控制激发模块 (即，启动安装在其上的光源) 和发射模块 (即，旋转滤波轮的转动)。这里，激发光源的活动和发射模块旋转滤波轮的转动是电耦

联的。该旋转滤波轮是以如下的方式转动的：对于每个反应区域而言，当反应区域被各自的激发光束激发时，安装在旋转滤波轮上的滤波器的透射光谱与发射自各自反应区域的光束的发射光谱相对应。此外，激发光源能够提供各种不同光谱和波长的激发光束。这样的激发光源是 LED、激光二极管或任何其它的具有独特颜色的光源。这样的装置允许所述至少两个激发光源的第一激发光源发射第一波长的光，其通过第一光导传送到至少第一反应区域，同时所述至少两个激发光源的第二激发光源发射不同与所述第一波长的第二波长的光，其通过第二光导传送到至少第二反应区域。这允许在一个测量步骤中平行地用不同波长激发和检测所述至少两个反应区域。这样的优点是因为可以快又有效的方式执行特定的测量顺序，从而允许在第一步骤中同时测量由不同波长的光束激发的所述至少两个反应区域，在接着的第二步骤中允许同时测量由波长不同于（例如，反相的（*inversely to*））第一步骤使用的波长的光束激发的所述至少两个反应区域，这是通过通过改变激发模块内光源的激发波长并同时旋转发射模块内的旋转滤波轮实现的。在如多重 PCR 应用中，每个样品中存在超过一种染料标记物。所以，使用这种测量步骤顺序，与连续应用其中每次仅仅使用针对一种染料具有特异性的激发和测量波长（而不是针对所有反应位点）的测量步骤相比，将会很大程度上缩短整个顺序测量时间。这样的测量顺序的示例性实施方案在后面的图 9 描述。

另一个优点是，通过引导发射自一个特定光源的光学能量到仅仅一个或一些反应区域，每个反应区域的光学能量都高。这能够缩短每个特定的测量步骤，导致顺序测量时间短。

在一些实施方案中，LED 作为‘光源’使用。这样的优点是因为 LED 相对节省费用，而且因为通常 LED 具有长的寿命，将使得维护费用低。在某些方面，使用能够提供多种波长的多波长照明器。

在特殊实施方案中，第一光导可以是分叉的。在这种实施方案中，多于一个的反应区域可以同时被一个特定光源激发。这种实施方案提供甚至更高总量的样品用于测量。

另一实施方案中，所述至少两个第一光导的每一个的一端被附连（*affix*）在所述激发模块上的特定位置，从而允许一个激发光源与所述一个第一光导进行光接触，而所述至少一个第一光导在另一端被附连到至少一个反应区域，从

而将所述激发光源发射的光束传送到在所述至少一个反应区域处的限定位置。第一和第二光导局部固定在装置中特定的位置中，其固定方式使得一个特定的第一光导引导光从靠近一个光源（例如多波长照明器）的一个特定位置到一个特定反应区域，并使得一个特定的第二光源引导从上述反应区域发射的光到一个靠近旋转滤波轮的特定位置。代替一个光源，可以在激发模块上的特定位置处存在相同波长的多个光源，以便增加光的强度。或者，发射自相同波长的多个光源的光可以通过使用第三光导或第三光导簇传播到激发模块上的特定位置。通过从光源发射所需波长的光和以协调方式通过转动旋转滤波轮，一个反应区域中的含有数种染料的一个样品可以在短时间内通过与所述各种染料的激发光谱相关的不同波长的光束来激发，同时，在每个激发光束作用于样品的过程中，该样品的针对这种激发光束的发射光谱能被同时测量。

在一些方面，当旋转轮转动时激发光源通过控制单元关闭（switch off）。这个优点是因为它允许记录暗值（dark value）并修正测量到的从反应区域发射的信号，所述测量的信号除了信号以外，还含有由于信号处理电子元件的偏置（offset）引起的所述暗值。此外，光源的关闭对于某些类型光源例如 LED 是有利的，因为它降低了发射光的光谱变化。LED 发射的光的光谱变化可能有影响，因为 LED 或半导体激光二极管在连续工作过程中有较高的升温（higher warm-up）。

在某些实施方案中，所述至少两个激发光源的每一个能够提供各种独特光谱和波长的激发光束。所述装置的两个示例性实施方案显示在图 1 和图 2 中。这里，包含作为光源（12）的多波长照明器的激发模块（11），包含旋转滤波轮（23）和检波器（22）的发射模块（21），控制单元（41），和分别用于将来自一个光源（12）的光引导至一个反应区域（1）和将从上述反应区域发射的光引导至发射模块（21）的第一（31）和第二（32）光导。在图 2 的示范性实施方案中，所述装置包括具有作为光源（12）的多波长照明器的激发模块（11），使用分叉激发光纤簇作为第一光导（31）。

图 1 显示了本发明的某种实施方案，具有固定的多波长照明器作为光源（12）和不分叉的第一光导（31）以及 12 个反应区域（1）。光源（12）包含在激发模块（11）中。所有 12 个光源（12）来自相同类型，这些多波长照明器光源的每一个可以提供 6 种不同的波长，其可以依次地打开和关闭。在特定的实

施方案中，多波长照明器的启动是以如下的方式控制的：通常，两个相邻的多波长照明器（12）的对发射相同颜色和波长的光。在测量顺序里的每一个测量步骤中，所有的光源（12）被打开，打开方式使得6个多波长照明器对具有独特的颜色。因此，总有两个反应区域（1）被同样波长的光照射，在每个测量步骤中可以平行使用最多6种不同的波长。通过将6个连续测量步骤的测量顺序应用到每个反应区域（1），其中对每个测量步骤改变激发光束的颜色和波长，则每个反应区域（1）可以快速有效的方式用6种不同波长的光激发。通过第一光导（31）将来自多波长照明器（12）的每一个的激发光束引导到反应区域（1）中的一个。通过12个第二光导（32）将来自12个反应区域（1）的每一个的发射光束引导到发射模块（21）。在图1中仅仅显示了针对两个反应区域的两个示例性第一光导和两个示例性第二光导，但在图5中显示了第一（31）和第二光导（32）排列的详细示意图，显示了所有的光导。在发射模块（21）中，每个来自一个反应区域（1）的发射光束通向12个检波器（22）中的一个。因此，每个发射光束引导通过安装在旋转滤波轮（23）上的一个滤波器。位于上述旋转滤波轮上的滤波器经选择和组装，所述选择和组装方式使中心波长与各自发射光束的光谱相匹配。在这种特定实施方案中，在光谱规格上同样类型的滤波器成对排列并且彼此相邻安装在旋转滤波轮（23）上。但是，旋转滤波轮（23）上滤波器的排列依赖于第一（31）和第二光导（32）相对反应区域（1）的分布，并且可以适当调整。在测量顺序中，每对多波长照明器（12）依次发射所有合适测量的波长的光是必须的。所述的旋转滤波轮（23）在测量顺序中的每个测量步骤结束时以如下方式旋转：使滤波器被定位以提供合适的光谱规格，以便测量由合适的激发光束激发的染料标记物的发射光谱。发射自多波长照明器（12）的激发光束波长的变化和旋转滤波轮（23）的转动受控制单元（41）协调。

图2显示了本发明的另一实施方案。与图1的实施方案相比，多波长照明器（12）的数量由12减少到6。第一光导（31）是具有两个分支的分叉，以便能够使两个反应区域（1）被来自同一单个多波长照明器的相同光谱的激发光束照射。在图2中，示出了仅仅两个示例性的具有两个分支的分叉的第一光导和用于四个反应区域的四个示例性的第二光导，而在图6中显示了第一光导（31）和第二光导（32）排列的详细示意图，显示了所有的光导。

在另一实施方案中，第一光导（31）的分叉可以是多于两支的分叉，以便

增加一次被来自同一单个多波长照明器（12）的相同光谱的激发光束照射的反应区域（1）的数目。而且，在大多数应用中，将发射模块（21）中的检波器（22）的数量与需要分析的反应区域（1）的数量联系起来是合理的，以便可以实现确定的测量信号分配以及快速平行地测量所有反应区域。旋转滤波轮上的滤波器需要根据它们光谱的规格以如下方式进行选择：使得具有同样光谱规格的滤波器的数量与被同样光谱的激发光激发的反应区域的数量相关联。

用于上述所有反应区域的测量的测量次序图描述在图9中。它显示了分别具有12个反应区域和6个或12个多波长照明器的本发明装置的实施方案的测量顺序。显示了在每个反应区域中存在6种不同染料标记物的情况下，为了分析反应区域中的所有样品而在测量顺序中必需的测量步骤。这个顺序图表中的通道是指特定的一组滤波器，其允许测量存在于12个反应区域中的一种特定染料标记物。在具有6个多波长照明器的实施方案中，通道包含有一个激发滤波器和两个相关光谱规格的发射滤波器。在具有12个多波长照明器的实施方案中，优选两个激发滤波器用于一个通道。激发滤波器位于旋转轮上准直透镜的后面。在两种实施方案中，当执行6步骤测量顺序中的测量步骤1时，通道1优选用于第一和第二反应区域。与此同时，经适合配置用于测量存在于样品中的其它类型染料标记物的其它通道2—6应用于剩余的反应区域3—12。这样的好处在于因为反应区域3—12中合适的染料标记物和反应区域1和2中的染料标记物平行测量。在开始测量步骤2之前，所有的多波长照明器改变发射光的颜色和波长，并且旋转滤波轮以如下方式转动：使得通道1现在用于反应区域3和4中的样品。因此，在测量步骤2中，和在测量步骤1中在反应区域1和2中所测量的相同种类的染料标记物现在在反应区域3和4中测量。同时，与测量步骤1相比，所有的其余通道2—6的位置朝向新的反应区域对，从而允许测量反应区域中存在的另一类型的合适染料标记物。在对所有样品应用所有6个测量步骤后，用所有6个通道测量了12个反应区域中的6种染料标记物。因此，使用本发明装置用此测量程序在多重PCR应用中特别有用，其缩短了许多样品的样品测量时间并具有高的灵敏度。

其他实施方案中，反应区域、激发光源和激发波长的数量可变。反应区域的数量也不必是分别是被测量的染料标记物的数量的倍数或者不同的多波长照明器颜色的数量的倍数。此外，一次发射相同颜色的多波长照明器的数量或者

具有相同光谱规格的滤波器种类的数量都是不受限制的。

本发明的另一实施方案中，用于发射和检测光束的装置包含至少两个反应区域、和激发模块，所述激发模块包含至少两个安装在旋转轮上的能够提供独特光谱和波长的激发光束的激发光源。它还包含至少两个第一光导，每个第一光导能够将所述激发光源之一发射的光束引导到至少一个反应区域中，还包含至少两个第二光导，每个第二光导能够将所述反应区域之一发射的光束引导到发射模块。该装置还包含发射模块，其能够独立地和同时地检测发射来自所述至少两个反应区域的每一个的光束。该发射模块至少包含两个检波器和旋转滤波轮，其中所述滤波轮位于所述至少两个第二光导和检波器之间。此外，该装置包含控制单元，其能够控制激发模块（即，将旋转轮转动到预定位置和启动安装在其上的光源）和发射模块（即，旋转滤波轮的转动）。这里，携带有激发光源的旋转轮可以相对于所述至少一个第一光导的位置旋转，从而至少允许一个激发光源发射光束到一个确定的第一光导。而且，携带有光源的旋转轮的转动、激发光源的动作和发射模块的滤波轮的转动，都通过控制单元内的控制器电耦联，从而允许旋转滤波轮以如下方式转动：所述方式使得对每个反应区域来说，安装在滤波轮上的滤波器的透射光谱和发射自各自反应区域的光束的发射光谱相应。这样，携带激发光源的旋转轮可以相对第一光导的位置转动，从而至少允许一个激发光源可以发射光束到一个确定的第一光导。旋转轮转动到预定的位置优选被控制单元控制。这样的装置使得如下情况可以发生：安装在所述旋转轮上的所述至少两个激发光源中的第一激发光源发射第一波长的光，其通过第一光导传送到至少第一反应区域，同时，安装在所述旋转轮上的所述至少两个激发光源的第二激发光源发射与所述第一波长不同的第二波长的光，其通过第二光导传送到至少第二反应区域。这使得在一个测量步骤中可以用不同波长平行地激发和测量所述至少两个反应区域。这是有利的，因为测量步骤的特定次序可以采用快又有效的方式进行，从而允许在第一步骤中同时测量由不同波长的光束激发的所述至少两个反应区域，并在接着的第二步骤中允许同时测量由和第一步骤中所用波长不同（例如，反相的（*inversely to*））的波长光束激发的所述至少两个反应区域，这是通过携带光源的所述旋转轮的耦连转动以及发射模块中的旋转滤波轮协同转动来进行的。所述测量顺序的示范性实施方案描述在后面的图9中。

在某个实施方案中，第一光导可以分叉或可以使用光导簇。在这种实施方案中，多于一个的反应区域可以被安装在旋转轮上的一个光源同时激发。这种实施方案提供甚至更高总量的样品用于测量。

在某方面，LED 被用作本发明装置的“光源”。这是有利的，因为 LED 相对便宜和由于 LED 通常具有长的使用寿命使得维护的费用低。此外，使用 LED 减弱了对待用滤波器阻挡性能的苛刻要求，因为只有较窄的光谱范围需要高的阻挡 (blocking)，这将使滤波器便宜很多。此外，携带 LED 的旋转轮占用更小的空间，能够构建更紧凑的分析仪器。

在某些实施方案中，所述至少两个第一光导中的每一个的一端附连 (affix) 在所述激发模块的特定位置，从而允许一个激发光源与所述一个第一光导光学接触，所述至少一个第一光导在另一端附连在至少一个反应区域中，从而将发射自所述激发光源的光束传送到所述至少一个反应区域的确定位置。

在某些方面，当旋转轮转动时，通过控制单元关闭激发光源。这样的好处是因为它允许记录暗值 (darking value) 并校正发射自反应区域的被测信号，所述被测信号除了信号以外还含有由于信号处理电子元件偏置引起的暗值。此外，关闭光源的优点是因为它减少了由光源散发出的热量，并因此减少了由于它们较高的内部温度引起的光源光谱变化对测量准确性产生不希望影响的风险。

在某些实施方案中，激发光源每一个都代表了不同的激发波长。在其他实施方案中，根据本发明的装置包含不同颜色的光源，其中在旋转轮上的每个特定位置处存在着数个同一颜色的光源，其存在方式使得在旋转轮上的每个位置处，所述同一颜色的数个光源结合形成一个光源。这里，在旋转轮上的每一个特定光源位置，由相同颜色的多个光源发射的光能够通过分叉或不分叉的光导引导至反应区域。这种实施方案的优点在于给反应区域提供了足够的光学能量，尤其当存在大量反应区域时。

在一个测量步骤中，确定波长的光发射自安装在旋转轮上的一个激发光源，并通过第一光导引导到反应区域。在该反应区域内，光可以与样品中包含的至少一种特定染料相互作用，导致从该反应区域发射光。发射的光通过第二光导被引导至安装在发射模块的旋转滤波轮上的滤波器。滤波器的透过率经选择以和发射自该反应区域的光的波长相关。透过滤波轮的光随后被发射模块的检波器检测。检波器的信号然后被评价并可被编辑。第一和第二光导局部固定

在装置中的特定位置中，固定方式使得一个特定的第一光导将来自靠近携带光源的旋转轮的一个特定位置的光引导到一个特定的反应区域，并且一个特定的第二光导将从该反应区域发射的光引导至靠近旋转滤波轮的一个特定位置。通过转动携带光源的旋转轮和通过以协调方式转动旋转滤波轮，在一个反应区域中含有多种染料的一个样品在短时间内可被不同波长的光束（和所述各种染料的激发光谱相关）激发，并且，在每个激发光束作用于样品上的过程中，可以同时测量对应于该激发光束的样品的发射光谱。原则上，携带光源的旋转轮的每个位置可以与旋转滤波轮上的用户确定的位置相关，从而具有将激发和发射波长组合起来的高度灵活性。因此，随着两个旋转轮进行有限量的协同转动，一个样品能在短时间内被不同波长的光激发，这是有利的，尤其在用多重 PCR 测定评价样品时。因此，这使得能够通过仅仅一些转动，用不同波长的光照射在各个反应区域中提供的所有样品。因为旋转轮上不同光源的排列，在每个单个测量步骤中不同的样品被不同颜色照射。这种照射模式在测量顺序的下一个测量步骤中改变，其改变方式使得在测量顺序结束时所有样品与所有的颜色组合。测量顺序的总时间被最小化，因为在每一个测量时间点平行地进行许多测量。

所述装置的这种实施方案的两个示范性实施方案在图 3 和图 4 中描述。图 3 显示了本发明的某个实施方案，具有安装在旋转轮（13）上的 12 个作为光源（12）的 LED、12 个反应区域（1）和不分叉的第一光导（31）。安装在旋转轮（13）上的 LED（12）容纳在激发模块（11）中。在这个特定实施方案中，成对安装在旋转轮（13）上的 12 个 LED 的相邻 2 个 LED 总是具有不同的颜色。激发光束通过第一光导（31）从 LED（12）引导至反应区域（1）。在这种设置中，通常两个反应区域用同一颜色照射。由于光导（31）在激发模块（11）中的位置固定，所以可以通过将旋转轮（13）转动到预定位置而使每个反应区域（1）与每个光源光学接触。在测量顺序的每个测量步骤开始时，打开所有的 LED。因而，通常两个反应区域被相同波长的光照射，并且在每个测量步骤中可以平行使用多达 6 种不同的波长。每个测量步骤后，携带 LED（12）的旋转轮（13）转动两个位置，以便使在测量步骤 1 中导至反应区域 1 和 2 的第一光导（31）光学接触的 LED，与在测量步骤 2 中导至反应区域 3 和 4 的第一光导光学接触，如此类推。通过应用 6 个测量步骤的测量顺序，其中通过相应地转动携带所述

LED 的旋转轮 (13) 来针对每个测量步骤改变激发光束的颜色和波长, 每个反应区域 (1) 可以被 6 种不同波长的光以又快又有效的方式激发。通过 12 个第二光导 (32) 将发射自 12 个反应区域 (1) 的发射光束引导至发射模块 (21)。在图 3 中描述了针对一个反应区域的仅仅一个示例性的第一 (31) 和第二光导 (32), 而图 5 显示了第一 (31) 和第二光导 (32) 排列的详细示意图, 显示了所有的光导。在发射模块 (21) 中, 每个发射光束通过第二光导 (32) 引导至 12 个检波器 (22) 之一。这里, 每个发射光束被引导穿过一个安装在旋转滤光轮 (23) 上的滤波器。位于该旋转滤光轮上的滤波器经过选择和组装, 所述选择和组装方式使得它们的光谱规格与各自的发射光束的光谱相适配。在这个特定实施方案中, 就光谱规格而言同一类型的滤波器是成对排列的, 并在旋转滤光轮 (23) 上相互相邻安装。但是, 在旋转滤光轮 (23) 上滤波器的排列依赖于第一 (31) 和第二光导 (32) 相对于反应区域 (1) 的排列, 并且可以进行合适地调整。6 个 LED 对的颜色模式 (color pattern) 和旋转滤光轮 (23) 上的滤波器可以进行选择, 选择方式使得所有的反应区域 (1) 对被不同光谱的激发光束照射。在开始测量顺序的每个测量步骤之前, 通过转动旋转轮 (13) 将每对 LED 引导至固定在激发模块 (11) 中的第一光导 (31) 的端部。因此, 在一个测量步骤中所有的反应区域 (1) 对被不同的激发光束照射。平行地, 旋转滤光轮 (23) 在每个测量步骤开始前转动, 所述转动方式使得滤波器经定位以提供合适的光谱规格, 从而检测由合适的激发光束激发的染料标记物的发射光谱。在该测量步骤结束的测量之后并在下一个测量步骤开始之前, 携带有光源 (12) 的旋转轮 (13) 和旋转滤光轮 (23) 被转动到下一个测量位置。旋转轮 (13) 的转动和旋转滤光轮 (23) 协同方式的转动是由控制单元 (41) 控制的。

图 4 显示了本发明的另一实施方案。与图 3 中的实施方案相比, LED (12) 的数量由 12 减少到 6, 其中这 6 个 LED 具有不同的颜色。第一光导 (31) 是具有两个分支的分叉, 以便两个反应区域 (1) 能被来自同一单个 LED (12) 的相同光谱的激发光束照射。在图 4 中只显示了两个示例性的具有两个分支的分叉的第一光导 (31) 和四个示例性的第二光导 (32) 用于 4 个反应区域, 而在图 6 中显示了第一 (31) 和第二光导 (32) 排列的详细示意图, 显示了所有的光导。在其他实施方案中, 第一光导可以是具有多于两个分支的分叉, 目的是增加一次被来自同一 LED 的相同光谱的激发光束照射的反应区域 (1) 的数量。此外,

在多数应用中，合理的做法是将发射模块（21）中检波器（22）的数量与需要分析的反应区域（1）的数量建立相关，从而可以具有确定的测量信号配置并可以快速并行地测量所有反应区域。位于旋转滤波轮（23）上的滤波器需要考虑它们光谱规格进行选择，选择方式使得具有相同光谱规格的滤波器的数量与被相同光谱的激发光激发的反应区域（1）的数量相关。

前面所述并在图 9 中描述的用于测量 12 个反应区域并且每个反应区域包含含有 6 种不同染料标记物的样品的测量顺序表，也可以应用到图 3 和图 4 中显示的实施方案中。在每个测量步骤中，通过转动旋转轮将所有 6 个或 6 对具有相同颜色的 LED 引导至激发模块内的下一相邻对的第一光导末端。平行地，以相同的方式相应地转动旋转滤波轮。这确保了在第一测量步骤中与反应区域 1 和 2 光学接触的通道在下一测量步骤中应用到反应区域 3 和 4 中的样品上。因此，在这个测量步骤中，在前一测量步骤中在反应区域 1 和 2 中测量的同一染料标记物现在可以在反应区域 3 和 4 中测量。同时，所有其余的 2—6 通道与上一测量步骤相比移动到新的反应区域对，从而允许测量反应区域中存在的另一种合适的染料标记物。在对所有样品应用了全部 6 个测量步骤后，在 12 个反应区域中的 6 种染料标记物用全部 6 个通道测量过。因此，使用根据本发明装置进行的这种测量顺序在多重 PCR 应用中特别有用，能够缩短大量样品的样品测量时间并具有高的灵敏度。

在其他实施方案中，反应区域、激发光源和激发波长的数量可变。反应区域的数量也不必是待测染料标记物数量的倍数或是不同光源颜色的数量的倍数。此外，一次发射相同颜色的光源的数量或者具有相同光谱规格的滤波器类型的数量都不受限制。

在本发明的某些实施方案中，激发光源可以固定在激发模块中，而靠近激发光源的第一光导的端部可以相对于激发光源旋转。在这个实施方案中，光导的另一端附连在反应区域。通过这种方式，显示在图 9 中的相同测量顺序能够应用在反应区域。

在本发明的某些实施方案中，单色光源（例如，LED）可以被固定在激发模块内，代替固定在旋转轮上。在所述实施方案中，通过光学设备（例如棱镜、光学微电子机械系统（MEMS）、镜子）将光传送到第一光导。该设备能够将每个光源的光引导到每个第一光导上，引导方式使得如图 9 所示相同有利的测量

顺序可以应用。所述光学设备的不同实施方案是可以想到的。整个设备可以转动，以便将来自光源的光引导到第一光导，或设备本身包含光学换向器（例如，可换向的镜子），其将来自不同光源的光引导到第一光导。

根据本发明的装置可以在某些实施方案中还包含至少一个用于监测光源功率的控制光导（control light guide）。这种光导与附连在激发模块内的特定位点的第一光导联合使用，并导向独立的检波器。这样做，能够在激发各个反应区域的同时监测光源的功率。在一些实施方案中，多于1个的控制光导可以存在，它们中的每一个引导光至独立的检波器。由此，每个光源能够在每个反应区域的激发过程中同时被监测。

上述的装置可以用在用于扩增和检测核酸的仪器中。除了用于发射和检测光束的装置外，所述仪器至少包含放置在至少两个反应区域内的样品（其包含大量组分和在激发时能产生光发射的可检测的标记物，所述光发射在存在靶时与不存在靶时不同），和将所述至少一个样品进行扩增和/或融化反应的设备。在某一实施方案中，可以将样品提供在位于反应区域中的容器内。该装置可以和热循环仪联合使用，所述热循环仪对反应区域施加特定温度循环使得反应区域包含的样品得到扩增。除了热循环仪和本发明的装置以外，该仪器可以包含从血浆中提取核酸的器具（means）（例如，吸管设备、培养箱、洗涤和分离器和用于装载试剂瓶、试剂架和样品试管的器具）。此外，这样的仪器可以是全过程解决方案，包括从核酸提取到初始靶浓度的定量，并包括所有电子印刷线路板（PCB）和个人电脑和用于控制该过程的特定设计的软件。

根据本发明所述的装置和仪器可以特别用于实时 PCR，特别是多重 PCR 的应用中，所述多重 PCR 应用包含多于一种待处理的靶序列，并且该靶序列或特异性杂交到该靶系列上的探针被不同染料标记物标记。但是，除了荧光标记物外，磷光、化学发光的和电化学发光的标记物可以用在本发明所述的装置和/或仪器中。除了多重 PCR 应用外，本发明所述的装置和仪器也可以用在其它应用如杂交测定、使用肽核酸探针的荧光原位杂交测定、RNA-RNA 杂交测定、蛋白多重测定或其它扩增-检测应用如定量 PCR、定量实时 PCR、连接介导的 PCR（ligation-mediated PCR）（例如，多重连接依赖性探针扩增（MLPA）、连接酶链反应）、RACE-PCR、非对称 PCR，等等。

在测量样品（sample）中特定试样（specimen）的方法中，要测量的样品

被提供在反应区域内并且包含至少两种可检测的标记物，其中当被包括各自激发波长的激发光束激发时，每种可检测的标记物发射各自的可检测光束。样品然后被发射自至少一个激发光源的不同光谱的激发光束照射。当可检测标记物被各自的激发光束激发时，使用发射模块检测发射自样品的发射光束。在特定实施方案中，所述的特定试样是核酸。在某些方面，所述样品中至少一种靶核酸被扩增和/或融化。

使用根据本发明所述的装置和/或仪器的所述方法进一步地通过实施例部分的实施例来描述。

实施例

使用本发明所述的两个装置，进行已知浓度的丙肝病毒（HCV）纯化靶（clean target）和定量标样（QS）的实时多重PCR。在每个反应区域，提供 50 μ l PCR 试剂混合物（对每个样品，含有 RT 引物 ST778AA 和额外的上游引物 ST280A 的 44.6 μ l Master Mix 和 5.4 μ l Mn²⁺缓冲液）与 25 μ l 浓度为 1 \times 10⁶ 拷贝/ μ l 的 HCV 靶和 25 μ l 浓度为 40 拷贝/ μ l 的定量标样（QS）。Master Mix、Mn²⁺缓冲液和定量标样（QS）是商业上可获得的试剂盒（Roche HCV CTM Master Mix: Kit no.58004181, Roche HCV CTM Manganese: Kit no.52004183, Roche Amplicor[®] Monitor QS HCV V2.0: Kit no.58002560）。所述纯化靶用 FAM 标记物染料标记，而定量标样（QS）用 HEX 标记物染料标记。使用两台热循环仪，按下列所示对每个反应区域进行 62 次温度循环以及一次预循环（pre cycle）和一次逆转录酶步骤。下面的表显示了用于扩增的热循环模式。

	nr	温度/°C	时间/秒
预循环	1	50	300
逆转录酶	1	59	1800
变性	2	95	15
退火/延伸		58	40
变性	60	91	15
退火/延伸		58	40
后循环	1	40	120

用于改变所施加温度的加热和冷却速度选择为 7°C/分钟（用于加热）和 5 °C/分钟（用于冷却）。

所获扩增曲线显示在图 7 和图 8 中。

结果

图 7 显示了上述实时多重 HCV-PCR 的扩增曲线。扩增 10 个含有 PCR 混合物的样品，在 FAM 通道中实时测量信号。因为用 HEX 标记物染料标记的定量标样造成的串扰(crosstalk)（所述标样部分被激发并也在 FAM-通道中被检测到），因此数据进行了校正。显著的信号增强表明存在靶序列。在其中发生显著信号增强的循环数（cycle number）是初始靶浓度的度量。循环数越少，初始靶浓度越高。这种特征循环数被称为拐点数（elbow number）。该拐点数的确定是用于分析扩增曲线的算法类型的特定性质。不同的算法能够确定出同一扩增曲线的不同拐点数。下表显示了图 7 所显示的扩增曲线的拐点数：

热循环仪 nr	反应区域 nr	靶拐点 nr
1	2	23.3
1	3	23.5
1	4	23.6
1	8	23.3
1	9	23.5
2	2	23.3
2	3	23.4
2	4	23.6
2	8	23.4
2	9	23.6

图 8 显示了相同实时多重 HCV-PCR 的定量标样（QS）的扩增曲线。所有的 10 种样品除了含有 PCR 混合物之外还含有 25µl 的定量标样。在 HEX 通道中实时测定信号。因为用 FAM 标记物染料标记的纯化靶造成的串扰（所述靶被部分激发并也在 HEX-通道中被检测出来），因此数据经过了校正。显著的信号

增强表明存在定量标样。同样对于定量标样，采用分析 QS 扩增曲线的算法确定了特征循环数（被称为拐点数）。下表显示了图 8 中所示扩增曲线的拐点数：

热循环仪 nr	反应区域 nr	QS 拐点 nr
1	2	32.1
1	3	32.6
1	4	32.3
1	8	32.5
1	9	32.6
2	2	31.2
2	3	31.5
2	4	31.4
2	8	31.6
2	9	31.6

初始靶浓度可以借助靶和定量标样之间拐点数差异的校正曲线来计算。下表显示了这些计算出的以拷贝/ μl 表示的效价 (titer)：

热循环仪 nr	反应区域 nr	结果靶拷贝/ μl
1	2	8.55E+05
1	3	1.42E+06
1	4	7.40E+05
1	8	1.45E+06
1	9	1.38E+06
2	2	2.66E+05
2	3	3.13E+05
2	4	2.34E+05
2	8	3.88E+05
2	9	3.14E+05

附图标记

1	反应区域
11	激发模块
12	激发光源
13	旋转轮
21	发射模块
22	检波器
23	旋转滤波轮
31	第一光导
32	第二光导
41	控制单元

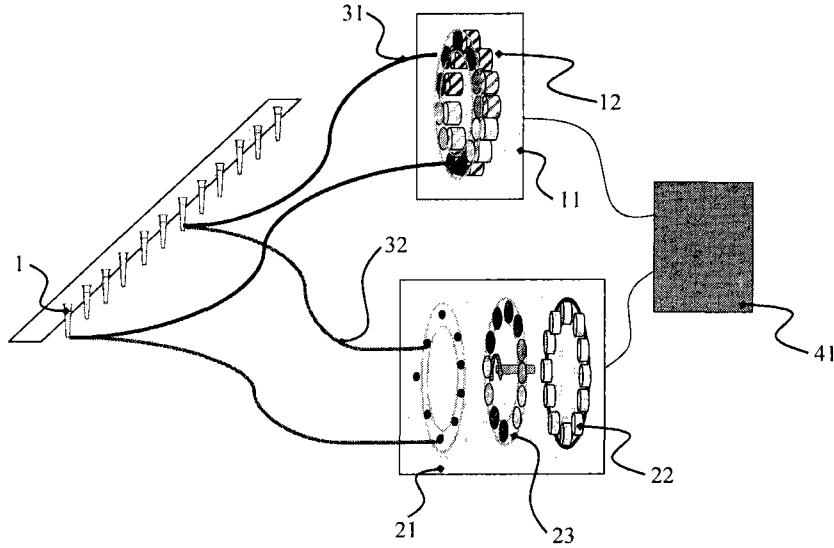


图 1

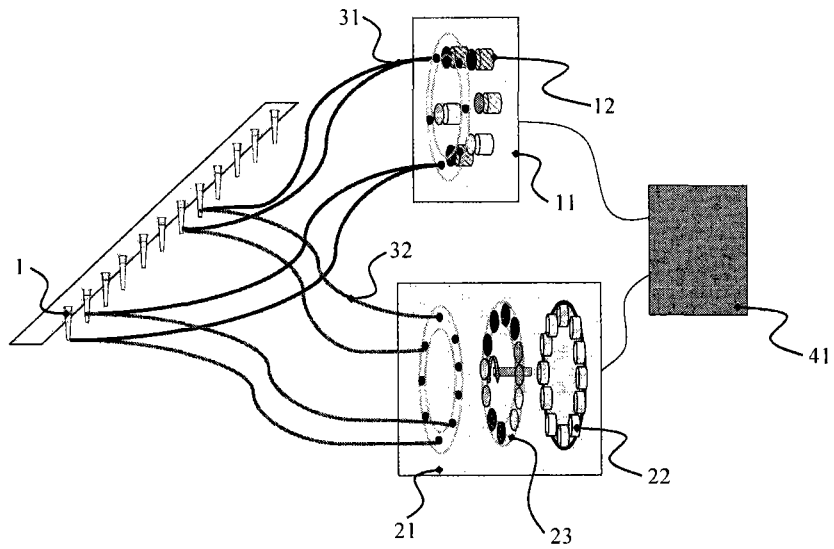


图 2

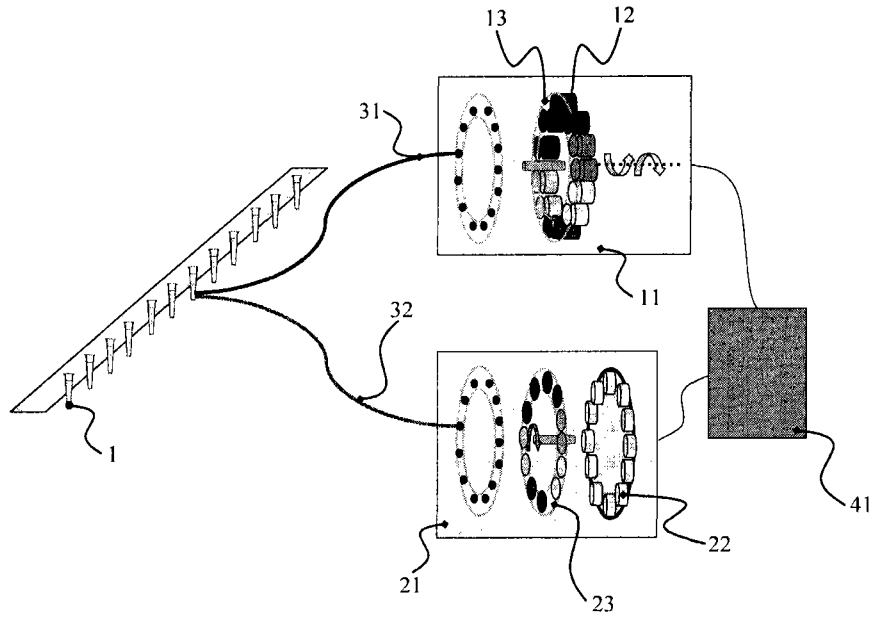


图 3

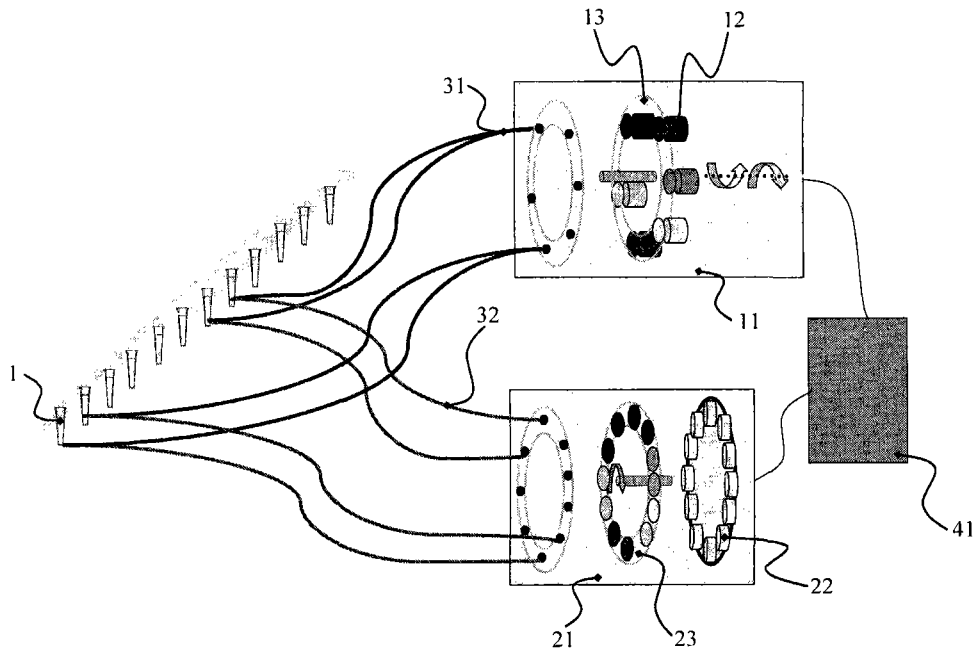


图 4

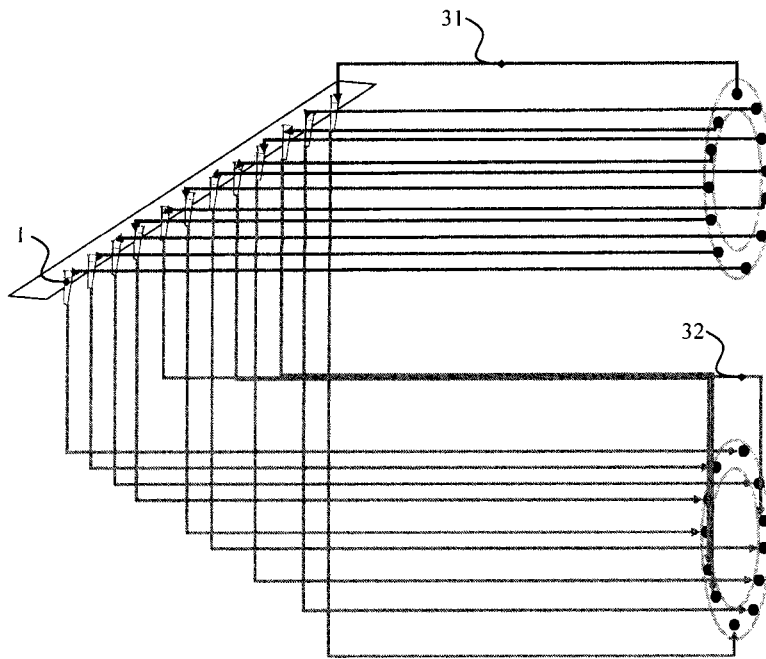


图 5

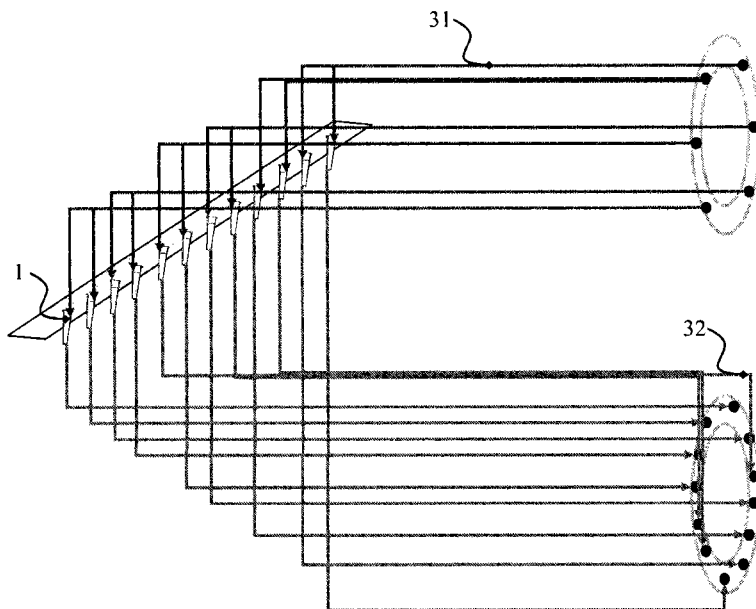


图 6

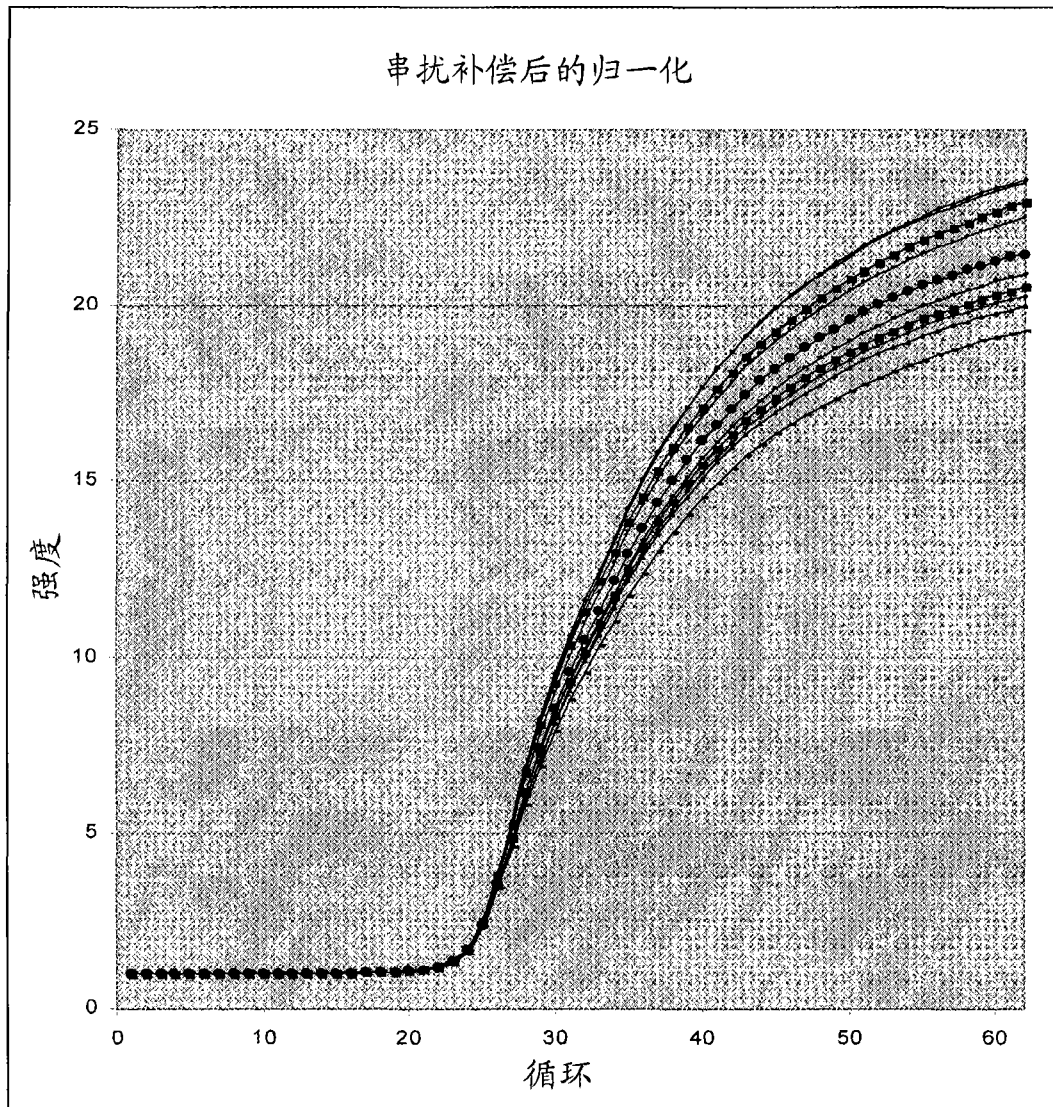


图 7

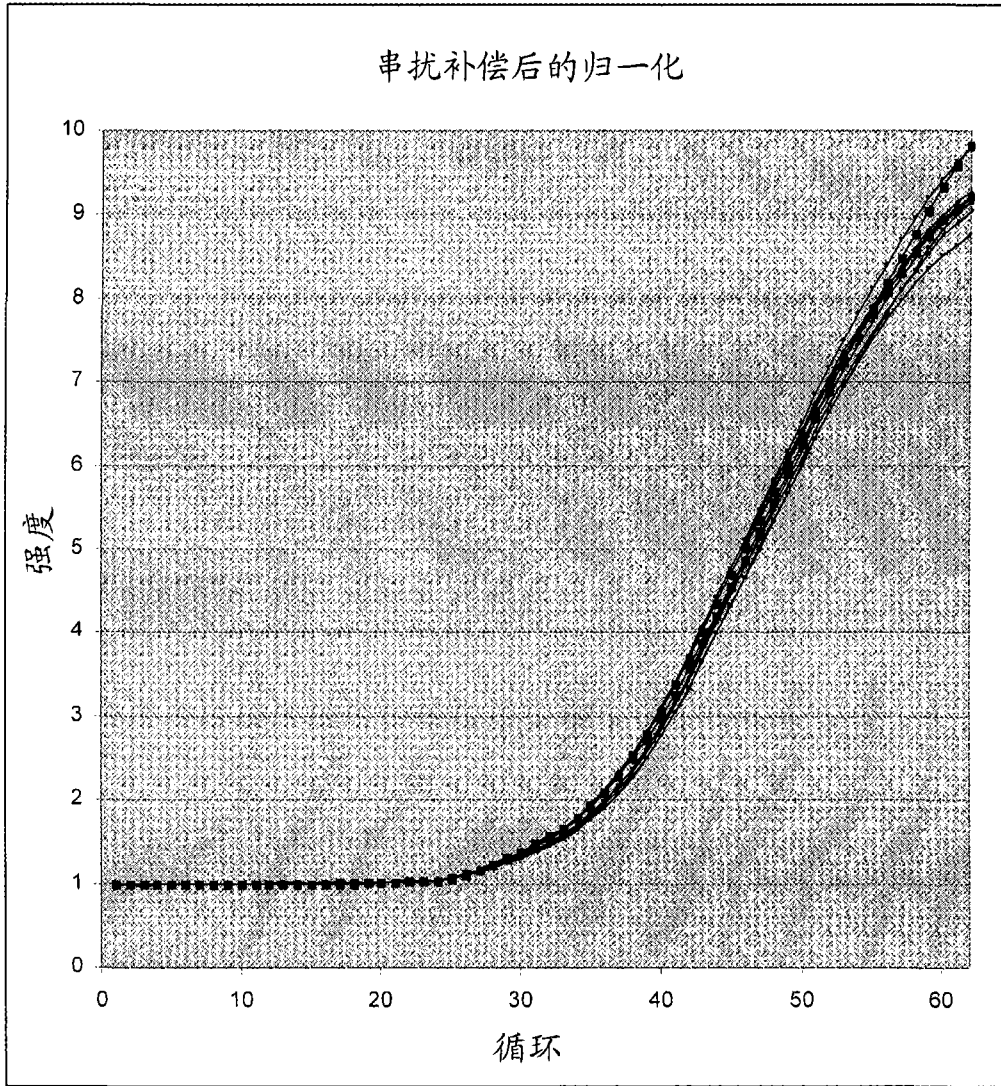


图 8

测量步骤	反应区域1	反应区域2	反应区域3	反应区域4	反应区域5	反应区域6	反应区域7	反应区域8	反应区域9	反应区域10	反应区域11	反应区域12
1	通道1	通道1	通道6	通道6					通道3	通道3	通道2	通道2
2	通道2	通道2	通道1	通道1	通道6	通道6			通道3	通道3	通道3	通道3
3	通道3	通道3	通道2	通道2	通道1	通道1	通道6	通道6			通道4	通道4
4			通道3	通道3	通道2	通道2	通道1	通道1	通道6	通道6		
5					通道3	通道3	通道2	通道2	通道1	通道1	通道6	通道6
6	通道6	通道6					通道3	通道3	通道2	通道2	通道1	通道1

图 9