

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6602374号
(P6602374)

(45) 発行日 令和1年11月6日(2019.11.6)

(24) 登録日 令和1年10月18日(2019.10.18)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68
G 1 6 B 25/20 (2019.01)	G 1 6 B 25/20
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z N A Z

請求項の数 21 (全 54 頁)

(21) 出願番号	特願2017-517690 (P2017-517690)	(73) 特許権者	507292955
(86) (22) 出願日	平成27年9月30日 (2015.9.30)		シージーン アイエヌシー
(65) 公表番号	特表2018-502552 (P2018-502552A)		大韓民国 1 3 8 - 8 2 8 ソウル ソン
(43) 公表日	平成30年2月1日 (2018.2.1)		パーク オグムーロ 9 1 タエウォン
(86) 国際出願番号	PCT/KR2015/010308		ビルディング 8階・9階
(87) 国際公開番号	W02016/052991	(74) 代理人	100107515
(87) 国際公開日	平成28年4月7日 (2016.4.7)		弁理士 廣田 浩一
審査請求日	平成29年4月17日 (2017.4.17)	(74) 代理人	100107733
(31) 優先権主張番号	10-2014-0132229		弁理士 流 良広
(32) 優先日	平成26年10月1日 (2014.10.1)	(74) 代理人	100115347
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		弁理士 松田 奈緒子
(31) 優先権主張番号	10-2014-0191924		
(32) 優先日	平成26年12月29日 (2014.12.29)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 試料の分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 試料を使用する信号発生反応のそれぞれのサイクルにおける信号値を取得し、サイクルにおける信号値を提供する段階と、

(b) それぞれのサイクルに一つの閾値を適用し、複数の閾値をサイクルに適用する段階であって、前記サイクルの少なくとも二つのサイクルの閾値は、互いに異なっている段階と、

(c) 閾値のそれぞれにより定められる閾値基準を満足する一つ以上のサイクルを確認する段階と、

(d) 前記段階(c)で確認されたサイクルを使用して試料を分析する段階と、

を含み、

前記閾値は、閾値変化サイクル(threshold-changed cycle, TCC)を基準に、前記TCC以前のサイクル及びこれに対応する閾値の集合により形成された関数と、前記TCC以後のサイクル及びこれに対応する閾値の集合により形成された関数とが互いに異なっているように設定される試料の分析方法。

【請求項 2】

前記試料の分析は、試料内分析物質の存在または不存在を定量的または定性的に決定するものであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記信号発生反応は、増幅曲線を提供する反応であることを特徴とする、請求項 1 に記

10

20

載の方法。

【請求項 4】

前記信号値は、信号発生反応から発生した信号値であるか、あるいは信号発生反応から発生した信号の数学的に変形された値であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記閾値基準は、閾値と同一であるか、閾値より大きい信号値を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記試料の分析は、試料内標的核酸分子の存在を決定するものであり、前記閾値基準を満足する一つ以上のサイクルの確認は、増幅曲線の Ct 値を決定するものであることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記試料の分析は、試料内標的核酸分子の存在を決定するものであり、前記閾値基準を満足する一つ以上のサイクルの確認は、増幅曲線のベースライン領域のエンドポイントサイクルを決定するものであることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 8】

(a) (i) 増幅反応における増幅サイクル及び (i i) 信号発生手段から得た前記増幅サイクルにおける信号値を含む生データセットを収得する段階と、

(b) 前記生データセットからベースラインスタートポイントサイクルとエンドポイントサイクルを決定して、ベースライン領域を決定する段階と、

20

(c) 前記決定されたベースライン領域内生データセットの二つ以上のデータポイントからベースライン領域の最適ライン関数を算出する段階と、

(d) 前記生データセットの信号値から前記ベースライン領域の最適ライン関数により計算された関数値を差し引き、補正されたデータセットを収得する段階であって、前記補正されたデータセットは、(i) 増幅反応の増幅サイクル及び (i i) 前記差し引いた結果を含む段階と、

を含む、信号発生手段の存在下で行われた増幅反応から収得した生データセットを補正する方法であって、

前記段階 (b) において、ベースライン領域のエンドポイントサイクルは、

(b 1) それぞれの増幅サイクルに一つのベースライン閾値を適用し、複数の閾値をサイクルに適用する段階であって、前記サイクルの少なくとも二つのサイクルのベースライン閾値は、互いに異なっている段階と、

30

(b 2) ベースライン閾値のそれぞれにより決定される閾値基準を満足する一つ以上のサイクルを確認する段階と、

(b 3) 前記段階 (b 2) で確認されたサイクルを使用してベースライン領域のエンドポイントサイクルを決定する段階と、

を含む方法により決定され、

増幅サイクルに対するベースライン閾値は、ベースライン閾値変化サイクル (b a s e l i n e t h r e s h o l d - c h a n g e d c y c l e , B T C C) を基準に、前記 B T C C 以前のサイクル及びこれに対応するベースライン閾値の集合により形成された第 1 関数と、前記 B T C C 以後のサイクル及びこれに対応するベースライン閾値の集合により形成された第 2 関数とが互いに異なっているように設定される、方法。

40

【請求項 9】

前記段階 (a) は、前記生データセットをプロットして増幅曲線を収得する段階をさらに含み、前記段階 (d) は、前記補正されたデータセットをプロットして補正された増幅曲線を収得する段階をさらに含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記増幅サイクルは、ベースライン閾値変化サイクルを境界に 2 以上のグループに分類されて、同一なグループに属するサイクルは、連続的であり、同一なグループに属するサイクルは、互いに同一なベースライン閾値を有して、互いに隣接したグループに属するサ

50

イクルは、互いに異なるベースライン閾値を有することを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記段階 (b 2) における確認は、生データセットを使用して、それぞれの増幅サイクルに対して計算された傾きと、それぞれの増幅サイクルに対するベースライン閾値を比較して行われることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記傾きは、特定サイクルにおけるデータポイント及び前記特定サイクルの以前及び / または以後のサイクルの少なくとも一つのデータポイントを利用した最小二乗法により計算されることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記段階 (b) において、ベースラインのエンドポイントサイクルは、最小ベースラインエンドポイントサイクル (minimum baseline end - point cycle , M B E C) 以上のサイクルで決定されることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記ベースラインエンドポイントサイクルは、

(i) それぞれの増幅サイクルに対して計算された傾きを収得する段階と、

(i i) 前記傾きをそれぞれの増幅サイクルに対するベースライン閾値と比較し、ベースライン領域の候補エンドポイントサイクルを収得する段階と、

(i i i) 前記候補エンドポイントサイクルを M B E C と比較する段階であって、前記候補エンドポイントサイクルが M B E C より大きい場合、前記候補エンドポイントサイクルをエンドポイントサイクルに決定する段階と、

を含む方法により決定することを特徴とする、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記ベースライン領域の最適ライン関数を算出する段階は、ベースライン領域内の少なくとも二つのデータポイントを使用した線形回帰分析により行うことを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 6】

試料を分析する方法を実行するためのプロセッサを具現する指示を含む、コンピュータ読み取り可能な記録媒体であって、前記試料を分析する方法は、

(a) 前記試料を使用する信号発生反応のそれぞれのサイクルにおける信号値を収得し、サイクルにおける信号値を提供する段階と、

(b) それぞれのサイクルに一つの閾値を適用し、複数の閾値をサイクルに適用する段階であって、前記サイクルの少なくとも二つのサイクルの閾値は、互いに異なっている段階と、

(c) 閾値のそれぞれにより定められる閾値基準を満足する一つ以上のサイクルを確認する段階と、

(d) 前記段階 (c) で確認されたサイクルを使用して試料を分析する段階と、

を含み、

前記閾値は、閾値変化サイクル (threshold - changed cycle , T C C) を基準に、前記 T C C 以前のサイクル及びこれに対応する閾値の集合により形成された関数と、前記 T C C 以後のサイクル及びこれに対応する閾値の集合により形成された関数とが互いに異なっているように設定されることを特徴とする、記録媒体。

【請求項 1 7】

信号発生手段の存在下で行われた増幅反応から収得した生データセットを補正する方法を実行するためのプロセッサを具現する指示を含む、コンピュータ読み取り可能な記録媒体であって、前記生データセットを補正する方法は、

(a) (i) 前記増幅反応における増幅サイクル及び (i i) 前記信号発生手段から得た前記増幅サイクルにおける信号値を含む生データセットを収得する段階と、

(b) 前記生データセットからベースラインスタートポイントサイクルとエンドポイントサイクルを決定して、ベースライン領域を決定する段階と、

(c) 前記決定されたベースライン領域内生データセットの二つ以上のデータポイントからベースライン領域の最適ライン関数を算出する段階と、

(d) 前記生データセットの信号値から前記ベースライン領域の最適ライン関数により計算された関数値を差し引き、補正されたデータセットを収得する段階であって、前記補正されたデータセットは、(i) 増幅反応の増幅サイクル及び(ii) 前記差し引いた結果を含む段階と、

を含み、

前記段階(b)において、ベースライン領域のエンドポイントサイクルは、

(b1) それぞれの増幅サイクルに一つのベースライン閾値を適用し、複数の閾値をサイクルに適用する段階であって、前記サイクルの少なくとも二つのサイクルのベースライン閾値は、互いに異なっている段階と、

(b2) ベースライン閾値のそれぞれにより決定される閾値基準を満足する一つ以上のサイクルを確認する段階と、

(b3) 前記段階(b2)で確認されたサイクルを使用してベースライン領域のエンドポイントサイクルを決定する段階と、

を含む方法により決定され、

増幅サイクルに対するベースライン閾値は、ベースライン閾値変化サイクル(baseline threshold-changed cycle, BTCC)を基準に、前記BTCC以前のサイクル及びこれに対応するベースライン閾値の集合により形成された第1関数と、前記BTCC以後のサイクル及びこれに対応するベースライン閾値の集合により形成された第2関数とが互いに異なっているように設定されることを特徴とする、記録媒体。

【請求項18】

(a) コンピュータプロセッサと、(b) 前記コンピュータプロセッサと連結された、請求項16に記載のコンピュータ読み取り可能な記録媒体とを含む、試料の分析のための装置。

【請求項19】

(a) コンピュータプロセッサと、(b) 前記コンピュータプロセッサと連結された、請求項17に記載のコンピュータ読み取り可能な記録媒体とを含む、信号発生手段の存在下で行われた増幅反応から得た生データセットを補正する方法のための装置。

【請求項20】

試料を分析する方法を実行するためのプロセッサを具現する、コンピュータ読み取り可能な記録媒体に格納されたコンピュータプログラムであって、前記試料を分析する方法は、

(a) 前記試料を使用する信号発生反応のそれぞれのサイクルにおける信号値を収得し、サイクルにおける信号値を提供する段階と、

(b) それぞれのサイクルに一つの閾値を適用し、複数の閾値をサイクルに適用する段階であって、前記サイクルの少なくとも二つのサイクルの閾値は、互いに異なっている段階と、

(c) 閾値のそれぞれにより定められる閾値基準を満足する一つ以上のサイクルを確認する段階と、

(d) 前記段階(c)で確認されたサイクルを使用して試料を分析する段階と、を含み、

前記閾値は、閾値変化サイクル(threshold-changed cycle, TCC)を基準に、前記TCC以前のサイクル及びこれに対応する閾値の集合により形成された関数と、前記TCC以後のサイクル及びこれに対応する閾値の集合により形成された関数とが互いに異なっているように設定されることを特徴とする、コンピュータプログラム。

10

20

30

40

50

【請求項 21】

信号発生手段の存在下で行われた増幅反応から収得した生データセットを補正する方法
を実行するためのプロセッサを具現する、コンピュータ読み取り可能な記録媒体に格納さ
れたコンピュータプログラムであって、前記生データセットを補正する方法は、

(a) (i) 前記増幅反応における増幅サイクル及び (ii) 前記信号発生手段から得
た前記増幅サイクルにおける信号値を含む生データセットを収得する段階と、

(b) 前記生データセットからベースラインスタートポイントサイクルとエンドポイン
トサイクルを決定して、ベースライン領域を決定する段階と、

(c) 前記決定されたベースライン領域内生データセットの二つ以上のデータポイント
からベースライン領域の最適ライン関数を算出する段階と、

(d) 前記生データセットの信号値から前記ベースライン領域の最適ライン関数により
計算された関数値を差し引き、補正されたデータセットを収得する段階であって、前記補
正されたデータセットは、(i) 増幅反応の増幅サイクル及び (ii) 前記差し引いた結
果を含む段階と、

を含み、

前記段階 (b) において、ベースライン領域のエンドポイントサイクルは、

(b1) それぞれの増幅サイクルに一つのベースライン閾値を適用し、複数の閾値をサ
イクルに適用する段階であって、前記サイクルの少なくとも二つのサイクルのベースライ
ン閾値は、互いに異なっている段階と、

(b2) ベースライン閾値のそれぞれにより決定される閾値基準を満足する一つ以上の
サイクルを確認する段階と、

(b3) 前記段階 (b2) で確認されたサイクルを使用してベースライン領域のエンド
ポイントサイクルを決定する段階と、

を含む方法により決定され、

増幅サイクルに対するベースライン閾値は、ベースライン閾値変化サイクル (base
line threshold - changed cycle, BTCC) を基準に、
前記 BTCC 以前のサイクル及びこれに対応するベースライン閾値の集合により形成され
た第 1 関数と、前記 BTCC 以後のサイクル及びこれに対応するベースライン閾値の集合
により形成された第 2 関数とが互いに異なっているように設定されることを特徴とする、
コンピュータプログラム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料の分析方法に関する。特に、本発明は、試料を分析する方法及び増幅反
応の生データセットを補正する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

試料の分析は、多様な技術分野で非常に重要な技術である。試料の分析は、特定の特性
の観点で試料を詳細に説明するか、描写するか、あるいは特徴を確認するために行う。

【0003】

試料の分析は、生命工学分野でさらに重要な意味を有する。特に、試料の分析は、一般
に分析物質 (analyte) の存在または不存在、結合親和度、酵素活性、遺伝子発現
水準及びアミノ酸やヌクレオチド配列のような特定特性に対する情報を提供するために行
う。代表的に、試料の分析のために免疫分析法 (immunoassay) 及び遺伝子分
析法 (genetic analysis) が広く使用されてきて、生体試料 (bios
ample) を分析する技術に係る米国特許第 6,516,276 号、第 6,228,5
93 号、第 7,349,809 号、第 7,115,229 号及び第 6,816,790 号
に公開されている。

【0004】

標的核酸増幅反応は、標的核酸分子を検出する大部分の技術に広く関連している。核酸

10

20

30

40

50

増幅は、多様な増幅技術が提案されているほど、分子生物学分野の多様な方法のうち、最も核心的な技術である。核酸増幅技術として最も広く使用される技術は、重合酵素連鎖反応 (Polynucleotide Chain Reaction: PCR) であって、この技術は、二本鎖DNAの変性、DNA鋳型へのオリゴヌクレオチドプライマーのアニールング及びDNA重合酵素によるプライマー伸長の繰り返されたサイクル過程に基づいている (Mullisら, 米国特許第4,683,195号, 第4,683,202号及び第4,800,159号; Saiki et al., (1985) Science 230, 1350-1354)。

【0005】

リアルタイムPCRは、試料から標的核酸分子を実時間で検出するためのPCRベースの技術である [Logan J et al., (2009). Real-Time PCR: Current Technology and Applications. Caister Academic Press]。特定標的核酸分子を検出するために、標的核酸の量に比例して検出可能な蛍光信号を放出する信号発生手段を利用する。検出可能な蛍光信号の放出は、例えば、二本鎖DNA間に結合したら信号を放出するインターカレーター (intercalator) を使用するか、蛍光レポーター分子及びクエンチャー分子を有するオリゴヌクレオチドを使用する方法がある。標的核酸の量に比例する蛍光信号が各増幅サイクル毎に検出されて、これを増幅サイクルに対してプロットし、増幅曲線 (amplification curve) または増幅プロファイル曲線 (amplification profile curve) を得るようになる。

【0006】

一般に、リアルタイムPCRによる増幅曲線は、ベースライン領域 (baseline region)、指数領域 (exponential phase)、直線領域 (linear phase) 及び渋滞領域 (plateau phase) に分かれる。指数領域は、PCR増幅産物の増加に比例し、放出される蛍光信号が増加する領域である。直線領域では、蛍光信号増加が実質的に減少し、実質的に線形方式で行動するようになり、渋滞領域は、PCR増幅産物の増加及び蛍光信号の放出が飽和状態に至り、それ以上蛍光信号の増加が現れない領域を意味する。

【0007】

ベースライン領域は、PCR反応初期サイクルの間に、蛍光信号がほとんど変化せず一定に維持される領域を意味する。この領域では、PCR産物の水準が、検出できるほど十分ではないため、この領域の蛍光信号の大部分は、反応試料自体の蛍光信号及び測定システム自体の蛍光信号を含む背景信号 (background signal) に起因する。

【0008】

リアルタイムPCRデータの正確且つ再現性のある分析のために、得られた増幅曲線の補正 (correction) または正規化 (normalization) を行わなければならない。増幅曲線の補正は、ベースライン領域を決定し、決定されたベースライン領域における背景信号 (background signal) を除去することにより行うことができる。

【0009】

背景信号は、PCR反応時、反応条件及び環境の変化を反映するため、反応毎に変わって、これにより、試料内の核酸分子の量とは無関係なベースライン移動 (baseline drift) が頻繁に起こる。このようなベースライン移動は、反応間の増幅曲線の比較を難しくして、標的核酸検出において、偽陽性または偽陰性結果を招来しやすい。したがって、PCRデータ分析において、このようなベースライン領域の適切な設定及び設定されたベースラインに基づいたPCR実験データの修正が必要である。

【0010】

増幅曲線を補正するための従来の一つの方法では、PCR初期サイクルの任意のサイクル領域 (例えば、3~15サイクル) をベースラインと決定して、他の方法では、実験に

10

20

30

40

50

より増幅曲線が決定された後、増幅信号が十分増加する前にサイクルを決定して、ベースラインを設定する。米国特許第8,219,324号は、増幅曲線の2次導関数(second derivative)を求めて、一定な特徴を有するデータポイントをベースラインのエンドポイントサイクルとし、ベースライン領域を設定する方法を開示する。

【0011】

このような従来の方法は、幾つかの重要な短所を有する。

【0012】

前述の従来の一つの方法において、ベースラインを一つの初期任意サイクル領域に決定する場合、反応毎に相異なる背景信号の変化を補正することはできるが、この方法は、ベースライン移動(baseline drift)を補正するものではない。また、増幅領域の始まりは、初期試料に存在する標的核酸の量によって変わるため、ベースライン領域が予め決定されている場合、これを多様なサンプルに一律的に適用することは困難である。また、ベースライン領域を実験者が任意で決定する場合、同一増幅曲線といっても、分析する実験者によってベースライン領域設定が相異なる場合があり、これにより、実際増幅産物の量が変わってしまうため、信頼できる結果を導出することが困難である。

【0013】

または、米国特許第8,219,324号に開示された方法によると、ベースラインは、複雑なアルゴリズムにより決定されるが、この場合、前記アルゴリズムには、明確に定義されていない多くのパラメータが必要になり、最適化が難しくなる。

【0014】

閾値を使用する多様な試料分析方法において、ノイズ信号または非典型的なパターンの信号(例えば、陰の傾きパターン)の発生により、偽陽性または偽陰性結果が引き起こされる。このような分析誤りは、従来の閾値を使用する方法によっては除去することが難しい。

【0015】

したがって、当業界では、各試料(またはPCR反応)に対し、新しい方式で閾値を設定するか、正確なベースライン領域を設定することにより、試料分析方法を改善するための新しい接近法(例えば、増幅曲線の補正)の開発が切実に必要であり、これは、より正確で且つ信頼性のある分析結果に寄与する。

【0016】

本明細書全体にかけて多数の引用文献及び特許文献が参照され、その引用が表示されている。引用された文献及び特許の開示内容は、その全体が本明細書に参照として取り込まれ、本発明の属する技術分野の水準及び本発明の内容がより明確に説明される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明の発明者は、信号発生反応を通じて収得したデータセットの加工を通じて、さらに正確で且つ信頼性のある信号発生反応の結果を得て、これにより、さらに正確で且つ信頼性のある試料の分析結果を提供するために鋭意研究した。その結果、信号発生反応による信号の有意性を決定するに邪魔になる要素、または信号発生反応による実際信号の増加を示すものではない不正確な信号を効果的に除去するために、サイクルの少なくとも二つのサイクルの閾値が互いに異なっている可変閾値が、信号発生反応のサイクルに適用できることを見出した。また、本発明が増幅反応の生データセットの補正に適用できることを見出した。

【0018】

したがって、本発明の目的は、可変閾値を使用した試料分析方法を提供することである。

【0019】

本発明の他の目的は、信号発生手段を利用した増幅反応の生データセットを補正する方法を提供することである。

【 0 0 2 0 】

本発明のまた他の目的は、試料分析方法を実行させるためのプロセッサを具現する指示を含む、コンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供することである。

【 0 0 2 1 】

本発明のまた他の目的は、信号発生手段を利用した増幅反応の生データセットを補正する方法を実行するためのプロセッサを具現する指示を含む、コンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供することである。

【 0 0 2 2 】

本発明のまた他の目的は、試料分析のための装置を提供することである。

【 0 0 2 3 】

本発明のまた他の目的は、信号発生手段を利用した増幅反応の生データセットを補正する装置を提供することである。

【 0 0 2 4 】

本発明のまた他の目的は、試料分析方法を実行させるためのプロセッサを具現する、コンピュータ読み取り可能な記録媒体に格納されたコンピュータプログラムを提供することである。

【 0 0 2 5 】

本発明のまた他の目的は、信号発生手段を利用した増幅反応の生データセットを補正する方法を実行するためのプロセッサを具現する、コンピュータ読み取り可能な記録媒体に格納されたコンピュータプログラムを提供することである。

【 0 0 2 6 】

本発明の他の目的及び利点は、発明の詳細な説明、請求の範囲及び図面により、さらに明確にされる。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 2 7 】

本明細書の発明の詳細な説明において、本発明と直接的な関連がなく、技術分野によく知られた一般技術及び知識に関する説明は、詳細な説明が本発明をさらによく説明するために省かれる。また、以下説明されたセクション間共通する内容は、明細書の複雑性を避けるために省かれる。

【 0 0 2 8 】

I . 可変閾値を利用した試料の分析

本発明の様態によると、本発明は、(a) サイクルにおける信号値を提供するために、前記試料を使用する信号発生反応のそれぞれのサイクルにおける信号値を収得する段階と、

(b) それぞれのサイクルに閾値を適用し、複数の閾値をサイクルに適用する段階(前記サイクルの少なくとも二つのサイクルの閾値は、互いに異なっている) と、

(c) 閾値のそれぞれにより定められる閾値基準を満足する一つ以上のサイクルを確認する段階と、

(d) 前記段階(c) で確認されたサイクルを使用して試料を分析する段階と、を含む、試料の分析方法を提供する。

【 0 0 2 9 】

本発明は、信号発生反応で得たデータセット(例えば、信号値とサイクル) を使用して、これを加工して試料を分析する方法に関する。

【 0 0 3 0 】

本発明の一具現例によると、試料の分析は、試料内分析物質の存在または不存在を決定することである。用語「試料内分析物質の存在または不存在の決定」は、試料内分析物質の存在または不存在を定量的、定性的に決定することを意味する。

【 0 0 3 1 】

本発明の発明者は、信号発生反応を通じて収得したデータセットの加工を通じて、さらに正確で且つ信頼性のある信号発生反応の結果を得て、これにより、さらに正確で且つ信

10

20

30

40

50

頼性のある試料の分析結果を提供するために鋭意研究した。その結果、信号発生反応による信号の有意性を決定するに邪魔になる要素、または信号発生反応による実際信号の増加を示すものではない不正確な信号を効果的に除去するために、サイクルの少なくとも二つのサイクルの閾値が互いに異なっている可変閾値が、信号発生反応のサイクルに適用できることを見出した。また、本発明が増幅反応の生データセットの補正に適用できることを見出した。

【 0 0 3 2 】

サイクルのうち、少なくとも二つのサイクルの閾値が互いに異なる値を有する閾値が信号発生反応のサイクルに適用される本方法は、知られていない。

【発明の効果】

10

【 0 0 3 3 】

本発明の特徴と利点を要約すると以下の通りである。

(a) 試料分析のための本発明は、多重反応及び工程でよく現れる、誤り信号に基づいたサイクルの決定を防止し、これにより、試料分析のための情報をより正確に得ることができる。

(b) 試料分析のための本発明において、閾値は、各サイクルに適用され、複数の閾値がサイクルに独立して適用され、これにより、試料の分析において、非正常的な信号の影響を除去する。従来の方法は、試料分析において、信号そのものを分析して、非正常的な信号を除去する。したがって、本発明の方法は、従来の方法とは異なるアルゴリズムで行われるものであり、したがって、従来の方法と共に使用することができ、これにより、試料分析の正確性を大幅に向上させることができる。

20

(c) 本発明は、各試料のより正確なベースライン領域の設定を通じて増幅曲線を補正するため、増幅反応の結果は、より正確で、信頼性高く分析される。

(d) 本発明は、簡潔な過程 (アルゴリズム) によって増幅曲線を補正するため、分析対象および測定装備による最適化が非常に容易である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 4 】

【図 1 A】図 1 A は、本発明の試料分析方法の一具現例に対する流れ図である。

【図 1 B】図 1 B は、本発明の増幅曲線補正方法の一具現例に対する流れ図である。

【図 2】図 2 は、信号発生手段として T a q M a n プローブを使用して行った 5 0 サイクル以上リアルタイム P C R の結果を示す補正前増幅曲線を示す。リアルタイム P C R は、信号発生手段の存在下で行われて、増幅サイクル番号と測定された信号を含む生データセットを収得する。生データセットは、プロットされる。R F U は、相対的蛍光単位を表示する。

30

【図 3】図 3 は、図 2 の補正前増幅曲線の傾き曲線を示す。Y 軸は、生データセットを利用して計算された各増幅サイクルにおける傾きを示す。傾きは、最小二乗法により計算された。S は、ベースライン領域のスタートポイントサイクルであり、E は、ベースライン領域のエンドポイントサイクルである。初期サイクルの一つがスタートポイントサイクル (S) と決定されて、ベースライン閾値と傾き曲線の一番目のクロスポイントサイクルがエンドポイントサイクル (E) と決定された。

40

【図 4 A】図 4 A は、図 2 の補正前増幅曲線 (生データセット) のベースライン領域と、最小二乗法により収得した最適ライン関数により書かれた最適ライン (線形回帰線) のベースライン領域の拡大図である (S は、ベースライン領域のスタートポイントサイクルであり、E は、ベースライン領域のエンドポイントである) 。

【図 4 B】図 4 B は、生データセットの測定された信号値から最適ライン関数の値を差し引いて収得した、補正された増幅曲線のベースライン領域の拡大図である (S は、ベースライン領域のスタートポイントサイクルであり、E は、ベースライン領域のエンドポイントである) 。

【図 5】図 5 は、図 2 の補正された増幅曲線を収得する過程を示している。図 2 の生データセットの蛍光信号強度から最適ライン (線形回帰線) 関数値が差し引かれ、補正された

50

データセットが取得されて、補正されたデータセットをプロットし、補正された増幅曲線を取得した。

【図6】図6は、本発明の試料分析用プログラムを備えたリアルタイムPCRシステムの一具現例を図式的に示している。

【図7】図7は、ベースライン領域のエンドポイントを決定するために、固定ベースライン閾値（'300'または'30'）を全体増幅サイクルに使用する場合、ベースライン領域決定に誤りが発生することを示す。

【図8A】図8Aは、高濃度試料においてベースライン領域を決定する具現例を示す。エンドポイントサイクルは、傾き曲線とベースライン閾値とのクロスポイントサイクルのうち、最小ベースラインエンドポイントサイクル（MBEC）以後サイクルに決定された。

10

【図8B】図8Bは、低濃度試料においてベースライン領域を決定する具現例を示す。エンドポイントサイクルは、傾き曲線とベースライン閾値とのクロスポイントサイクルのうち、最小ベースラインエンドポイントサイクル（MBEC）以後サイクルに決定された。

【図8C】図8Cは、エンドポイントサイクルの決定に、MBECを使用するか、使用せずに決定されたベースライン領域を使用して、増幅曲線を補正した結果を示す。

【図9】図9は、サイクルによって変われるベースライン閾値が増幅曲線（または傾き曲線）に適用された多数の具現例を図式的に示している。太線は、ベースライン閾値を示す。BTCCは、ベースライン閾値変化サイクルを示す。

【図10A】図10Aは、高濃度試料の傾き曲線にVBT（可変ベースライン閾値、Variable Baseline Threshold）を適用した結果を示している。エンドポイントサイクルは、傾き曲線とBTCC（ベースライン閾値変化サイクル）によって相異して適用されるベースライン閾値と傾き曲線間のクロスポイントサイクルに決定される。

20

【図10B】図10Bは、低濃度試料の傾き曲線にVBT（可変ベースライン閾値、Variable Baseline Threshold）を適用した結果を示している。エンドポイントサイクルは、傾き曲線とBTCC（ベースライン閾値変化サイクル）によって相異して適用されるベースライン閾値と傾き曲線間のクロスポイントサイクルに決定される。

【図10C】図10Cは、エンドポイントサイクル決定にVBT（可変ベースライン閾値）を使用するか、使用せずに求められたベースライン領域を使用して増幅曲線を補正した結果を示している。

30

【図11A】図11Aは、 C_t 値を決定するために、増幅曲線にVST（可変信号閾値）を適用した結果を示している。FST（固定信号閾値）方法は、公知技術を意味する。

【図11B】図11Bは、 C_t 値を決定するために、順に希釈されたFlu Aのgenomic RNA（ 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 及び 10^{-7} 希釈）の増幅曲線にVST（可変信号閾値）を適用した結果を示している。

【図11C】図11Cは、 C_t 値を決定するために、順に希釈されたFlu Aのgenomic RNA（ 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 及び 10^{-7} 希釈）の増幅曲線にVST（可変信号閾値）を適用した結果を示している。

【発明を実施するための形態】

40

【0035】

図1Aは、本発明の試料分析方法の一具現例に対する流れ図である。本発明をより詳細に説明すると、以下のようである。

【0036】

段階（a）：信号値取得段階（S10）

第一、サイクルにおける信号値を提供するために、前記試料を使用する信号発生反応のそれぞれのサイクルにおける信号値を取得する。

【0037】

本発明は、信号発生反応で得たデータセット（例えば、信号値とサイクル）を使用して試料を分析する方法に関する。段階（a）は、（i）試料を利用した信号発生反応のサイ

50

クル及び (i i) サイクルにおける信号発生反応の信号値を含むデータセットを取得する段階とも説明でできる。

【 0 0 3 8 】

本発明で用語 ‘ 信号発生反応 ’ は、試料内分析物質の存在に依存的に信号を発生できる反応を意味する。

【 0 0 3 9 】

信号発生反応は、信号の変化を伴う。

【 0 0 4 0 】

本発明の一具現例によると、信号発生反応は、信号増幅反応である。

【 0 0 4 1 】

本発明で用語 ‘ 信号 ’ は、測定可能な産出物を意味する。

【 0 0 4 2 】

信号変化は、分析物質の存在または不存在を定量的または定性的に示す指標役割をすることができる。

【 0 0 4 3 】

有用な指標の例としては、蛍光強度、発光強度、化学発光強度、生発光強度、燐光強度、電化伝達、電圧、電流、電力、エネルギー、温度、粘度、光散乱、放射線強度、反射力、透過度、吸光度がある。最も広く使われる指標としては、蛍光強度がある。

【 0 0 4 4 】

本発明の一具現例によると、信号発生反応は、増幅曲線を提供する反応である。特に、増幅曲線は、信号増幅曲線である。

【 0 0 4 5 】

このような信号発生反応は、生物学的または化学的反応を含む。生物学的反応は、P C R、リアルタイムP C R、マイクロアレイ、インベーターアッセイ、免疫アッセイ反応及び細菌培養分析のような遺伝的分析反応を含む。特に、信号発生反応を遺伝的分析反応を含む。化学的反応は、化学物質の生産、変化または分解を含む化学的分析方法を含む。

【 0 0 4 6 】

分析物質 (a n a l y t e) は、核酸 (例えば、D N A または R N A)、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、アミノ酸、生物学的化学物、ホルモン、抗体、抗原、代謝産物、細胞などである。択一的に、分析物質は、化学物質のような非生物学的物質である。

【 0 0 4 7 】

本発明の一具現例によると、分析物質は、標的核酸分子である。用語 ‘ 標的核酸分子 ’ は、分析または検出対象核酸分子を意味する。

【 0 0 4 8 】

本発明の一具現例によると、信号発生反応は、分析物質の増幅を伴うかあるいは伴わない反応である。

【 0 0 4 9 】

特に、信号発生反応は、分析物質、具体的に標的核酸分子の増幅を伴う反応である。さらに具体的には、信号発生反応は、標的核酸分子の増幅を伴い、標的核酸分子の増幅によって信号が増加または減少 (好ましくは、増加) できる反応である。

【 0 0 5 0 】

本発明で用語 ‘ 信号発生 ’ は、信号の発生または消滅及び信号の増加または減少を全部含む。特に、用語 ‘ 信号発生 ’ は、信号の増加を意味する。

【 0 0 5 1 】

本発明の一具現例によると、前記信号発生反応は、信号発生手段の存在下で行われる。

【 0 0 5 2 】

本発明で用語 ‘ 信号発生手段 ’ は、分析物質 (例えば、標的核酸分子) の存在を示す信号の発生に使用される物質を意味する。例えば、オリゴヌクレオチド、標識及び酵素である。択一的に、本発明で用語 ‘ 信号発生手段 ’ は、信号発生のための物質を使用する方法を意味するものとして使用できる。

10

20

30

40

50

【0053】

多様な種類の信号発生手段が当業者に知られている。信号発生手段は、標識そのもの及び標識の付いたオリゴヌクレオチドを全て含む。標識は、蛍光標識、発光標識、化学発光標識、電気化学的標識及び金属標識を含む。標識は、インターカレーティング染料 (intercalating dye) のように、標識そのものが信号発生手段として使用できる。択一的に、単一標識または供与分子 (donor molecule) 及び受容分子 (acceptor molecule) を含む相互作用的二重標識が、一つ以上のオリゴヌクレオチドに結合された状態で使用できる。

【0054】

信号発生手段は、核酸分解酵素 (例えば、5' - ヌクレアーゼまたは / 及び 3' - ヌクレアーゼ) のような信号を発生させるための要素を追加的に含むことができる。

10

【0055】

本発明の方法は、標的核酸分子の存在または不存在を決定するために使用されるため、信号発生反応は、当業界に知られた多様な方法によって行うことができる。代表的な例としては、TaqManTM probe方法 (米国第5,210,015号)、Molecular Beacon方法 (Tyagiら, Nature Biotechnology, 14 (3):303 (1996)), スコルピオン (Scorpion) 方法 (Whitcombeら, Nature Biotechnology 17:804-807 (1999)), サンライズ (Sunrise or Amplifluor) 方法 (Nazarenkoら, Nucleic Acids Research, 25 (12):2516-2521 (1997)), 及び米国特許第6,117,635号), Lux方法 (米国特許第7,537,886号), CPT (Duck Pら, Biotechniques, 9:142-148 (1990)), LNA方法 (米国特許第6,977,295号), Plexor方法 (Sherrill C Bら, Journal of the American Chemical Society, 126:4550-4556 (2004)), HybeaconsTM (D. J. Frenchら, Molecular and Cellular Probes (2001) 13, 363-374 及び米国特許第7,348,141号), Dual-labeled, self-quenched probe (米国特許第5,876,930号), Hybridization probe (Bernard P Sら, Clin Chem 2000, 46, 147-148), PTOCE (PTO cleavage and extension) 方法 (WO 2012/096523), PCE-SH (PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Hybridization) 方法 (WO 2013/115442), PCE-NH (PTO Cleavage and Extension-Dependent Non-Hybridization) 方法 (PCT/KR2013/012312)、CER方法 (WO 2011/037306) がある。

20

30

【0056】

本発明で用語 '増幅' または '増幅反応' は、信号を増加または減少させるための反応を意味する。前記信号の増加または減少は、信号発生手段により起こる。

40

【0057】

本発明の一具現例によると、信号発生手段による信号は、分析物質 (例えば、標的核酸分子) の存在に依存的に発生して、前記信号の強度は、増幅反応によって増加または減少する。

【0058】

本発明の一具現例によると、増幅反応は、分析物質 (例えば、標的核酸分子) の存在に依存的に信号発生手段による信号を増幅するための反応を意味する。

【0059】

本発明の一具現例によると、増幅曲線は増幅反応によって得られる。

50

【0060】

本発明において、用語‘サイクル’は、状態の変化を伴う複数の測定において状態の変化の単位を意味する。状態の変化は、例えば温度の変化、反応時間の変化、反応回数の変化、濃度の変化、pHの変化および/または測定対象（例えば、標的核酸分子）の複製回数の変化を含む。したがって、サイクルは、時間またはプロセスサイクル、単位運営サイクル及び複製サイクルでありえる。

【0061】

例えば、酵素の基質分解能が基質の濃度によって分析される場合、酵素の分解能に対する複数の測定が様々な基質濃度で行われる。この場合、基質濃度の増加が状態の変化に該当し、その増加の単位がサイクルに該当する。

10

【0062】

他の例として、等温増幅反応は、反応時間に応じて、同一温度条件で複数の測定が行われ、この場合、反応時間が状態の変化に該当し、反応時間単位がサイクルに該当する。

【0063】

特に、一連の反応の繰り返しまたは一定時間間隔を有する反応の繰り返しの場合、用語‘サイクル’は、前記繰り返しの単位を意味する。

【0064】

例えば、重合酵素連鎖反応（PCR）において、サイクルは、標的分子の変性、標的分子とプライマーのアニール（混成化）及びプライマーの伸長を含む反応単位を意味する。この場合、反応の繰り返しの増加が状態の変化に該当し、前記繰り返し単位がサイクルに該当する。

20

【0065】

本発明の一具現例によると、標的核酸分子が試料に存在する場合、測定される信号値（例えば、信号強度）は、増幅反応のサイクルの増加によって増加または減少する。

【0066】

本発明の一具現例によると、標的核酸分子の存在を示す信号の増幅のための増幅反応は、信号が標的核酸分子の増幅と同時に増幅される方法（例えば、リアルタイムPCR）で行われる。択一的に、前記増幅反応は、信号が標的核酸分子の増幅を伴わずに増幅される方法[例えば、CPT方法（Duck P、et al、Biotechniques、9：142-148（1990））、Invaderアッセイ（米国特許第6,358,691号及び第6,194,149号）]で行うことができる。

30

【0067】

標的核酸分子を増幅する様々な方法が知られている。これらに限定されないが、例えば、重合酵素連鎖反応（PCR、polymerase chain reaction）、リガーアゼ連鎖反応（LCR、ligase chain reaction、Wiedmann Mら、'Ligase chain reaction（LCR）- overview and applications、'PCR Methods and Applications、1994 Feb；3（4）：S51-64）、GLCR（gap filling LCR、WO 90/01069、EP 439182、およびWO 93/00447）、Q-beta（Q-beta replicase amplification、Cahill P、et al、Clin Chem、37（9）：1482-5（1991）、米国特許第5,556,751号）、鎖置換増幅（SDA、strand displacement amplification、GT Walkerら、Nucleic Acids Res、20（7）：1691-1696（1992）、EP 497272）、NASBA（nucleic acid sequence-based amplification、Compton、J、Nature 350（6313）：912（1991））、転写媒介増幅（TMA、Transcription-Mediated Amplification、Hofmann WPなど、J Clin Virol、32（4）：289-93（2005）；米国特許第5,888,779号）またはローリングサークル増幅（RCA、

40

50

Rolling Circle Amplification、Hutchison C Aなど、Proc. Natl Acad. Sci. USA. 102:1733217336(2005))である。

【0068】

本発明の一具現例によると、本発明で使用する標識は、蛍光標識であり、より具体的に、単一蛍光標識または蛍光レポーター分子とクエンチャー分子を含む相互作用的二重標識である。本発明の一具現例によると、本発明で使用する増幅反応は、標的核酸分子の増幅を伴って信号を増幅させる。本発明の一具現例によると、本発明の増幅反応は、PCR方法によって行われる。

【0069】

信号発生反応は、試料分析のためのデータセット（信号値及びサイクル値）を提供する。

【0070】

本発明において、用語「信号値」は、信号発生反応のサイクルで実際に測定された信号値（例えば、増幅反応による実際蛍光強度）またはその変形を意味する。前記変形は、測定された信号値（信号強度）の数学的に加工された値とする。測定された信号値の数学的に加工された値は、例えば、測定された信号値の対数値（logarithmic values）または微分値（derivatives）である。前記測定された信号値の微分値は、多重微分を含む。

【0071】

本発明において、用語「データポイント」は、サイクルと、前記サイクルにおける信号値を含む座標値を意味する。信号発生手段を用いた増幅反応によって得られたデータポイントは、直交座標系の座標値で表示することができる。前記直交座標系において、X軸は、増幅反応のサイクルを示し、Y軸は、該サイクルで前記信号発生手段からの信号値を示す（図2参照）。

【0072】

本発明において、用語「データセット」は、データポイントの集合を意味する。前記データセットは、生データセットと変形されたデータセットとを含む。

【0073】

生データセットは、本発明の分析のための最初のデータセットである。前記生データセットは、試料分析のための信号発生反応（例えば、増幅反応）を介して直接取得したデータポイントのセットである。

【0074】

例えば、本発明は、増幅反応の生データセットを補正するために使用される場合、生データセットは、増幅反応から直接取得したデータポイントの集合を含む（図2参照）。

【0075】

変形されたデータセットは、生データセットが数学的に加工されたデータセットを含む。前記変形されたデータセットは、補正されたデータセット及び傾きデータセットを含む。補正されたデータセットは、生データセットの補正を介して取得したデータポイントのセットである。

【0076】

本明細書では、生データセットと変形されたデータセットは、相対的な意味を有する。たとえば、生データセットは、あるデータの変形になる前のデータセットを意味し、変形されたデータセットは、データの変形後に取得したデータセットである。

【0077】

本発明で利用されたデータセットは、信号発生反応で得られたデータポイントの部分または全部または補正されたデータポイントの全部又は一部を含むことができる。

【0078】

本発明の一具現例によると、前記信号発生反応は、標的核酸分子の増幅を伴う反応である。より具体的に、前記標的核酸分子の増幅を伴う反応は、リアルタイム重合酵素連鎖反

10

20

30

40

50

応である（リアルタイムPCR）。

【0079】

本発明の一具現例によると、前記信号値は、信号発生反応から発生した信号値であるか、または信号発生反応から発生した信号の数学的に変形された値である。

【0080】

本発明の一具現例によると、前記信号発生反応は、リアルタイムPCRであり、前記信号値は、リアルタイムPCRから発生された信号の数学的に変形された値であって、前記数学的に変形された値は、信号値をサイクルに対して微分した値である（図3参照）。前記サイクルに対して微分された信号値は、生データセットの導関数を含む。

【0081】

図2は、信号発生反応として、リアルタイムPCRを通じて取得したデータセットの具体的な例を示しており、リアルタイムPCRの増幅曲線に該当する。図2に示されたデータセットは、信号発生反応から直接的に取得した生データセットである。生データセットは、リアルタイムPCRの増幅サイクル及び前記増幅サイクルで測定された信号強度（例えば、RFU）を含む。

【0082】

図3は、生データセットの変形の一つを示しているが、これは、増幅サイクルで計算された傾きに対するデータポイントを含む。図3の曲線は、図2の生データセットの導関数に該当する。

【0083】

増幅反応を示す増幅曲線は、信号値を増幅サイクルに対してプロットして得ることができる。本明細書の増幅曲線は、データセットをプロットして得た曲線をいう。

【0084】

補正前増幅曲線は、測定された信号値またはその変形に基づいた、各増幅サイクルで測定された信号値またはその変形された値を示す補正前増幅曲線を意味する。前記補正前増幅曲線は、増幅サイクルに対して測定された信号強度をプロットして得られる。特に、補正前増幅曲線は、生データセットをプロットして得ることができる。

【0085】

補正後増幅曲線は、補正前増幅曲線をもとに補正された増幅曲線を意味する。前記補正された増幅曲線は、補正されたデータセットをプロットして得ることができる。

【0086】

本発明において、用語「標的核酸」または「標的核酸分子」は、検出または定量する関心核酸分子を意味する。前記標的核酸分子は、二本鎖だけでなく、一本鎖の配列をすべて含む。前記標的核酸分子は、反応で新たに生成された配列だけでなく、初期から核酸試料中に存在する配列を含む。

【0087】

前記標的核酸分子は、あらゆるDNA（gDNA、cDNA）、RNA分子またはこれらの交雑体（chimeranucleic acid）を全て含む。前記核酸分子は、二本鎖形態または一本鎖形態である。出発物質として核酸が二本鎖である場合、二本の鎖を、一本鎖または一部一本鎖形態に変形することが好ましい。鎖を分離する既知の方法は、これに限定されず、例えば、熱処理、アルカリ、ホルムアミド（formamide）、尿素（urea）及びグリオキサール（glyoxal）処理、酵素的処理（例えば、ヘリカーゼ活性）、および結合タンパク質がある。例えば、鎖分離は80乃至105の熱処理を通じて行うことができる。このような処理を実現する一般的な方法は、Joseph Sambrookら、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.（2001）で提供される。

【0088】

前記標的核酸分子は、自然に発生した原核、真核（例えば、原生動物（protozo

10

20

30

40

50

ans)と寄生動物(parasites)、カビ(fungi)、酵母(yeast)、高等植物、下等動物、哺乳類や人間を含む高等動物)、ウイルス(例えば、ヘルペスウイルス(Herpes viruses)、HIV、インフルエンザウイルス(influenza virus)、エプスタイン-バールウイルス(Epstein-Barr virus)、肝炎ウイルス(hepatitis virus)、ポリオウイルス(polio virus)など)またはウイロイド(viroid)の核酸を含む。また、核酸分子は、組換え的に生産または化学的に合成された、あるいは合成できる核酸分子も含む。したがって、前記核酸配列は、自然から発見されるか、発見されないものである。標的核酸分子は、知られているか知られていない配列をすべて含む。

【0089】

10

本発明の用語「試料」は、細胞、組織、生物由来の流体(fluid)または本発明によって評価できるその他の中間物質を意味し、前記試料は、例えば、ウイルス、バクテリア、組織、細胞、血液、血清、血漿、リンパ、喀痰、スワップ(swap)、吸引液(aspirate)、気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid)、乳、尿、糞便、眼球液、唾液、精液、脳抽出物、脊髄液、盲腸、脾臓および扁桃腺抽出液、羊膜液、腹水液および非生物学的試料(例えば、食品または水)である。また、前記試料は、化学反応の液相、固相の物質である。さらに、前記試料は、生物学的原料から抽出した天然核酸と合成された核酸分子の両方を含む。

【0090】

段階(b): 各サイクルに閾値適用段階(S20)

20

閾値がそれぞれのサイクルに適用され、複数の閾値がサイクルに適用される。前記サイクルの少なくとも二つのサイクルの閾値は、互いに異なっている。つまり、複数の閾値は、全体がまたは一部が異なる値を有する。

【0091】

本発明の最も目立つ特徴は、複数の閾値を信号発生反応のサイクルに適用し、この際、前記サイクルの少なくとも二つのサイクルの閾値は、互いに異なっていることである。

【0092】

各サイクルには、一つの個別閾値が割り当てられる。例えば、信号発生反応のサイクルが30個である場合、30個の閾値が個別に割り当てられる。前記割り当てられた閾値は、同一か、相異なっている。本発明の最も顕著な特徴は、前記割り当てられた閾値の少なくとも二つは、互いに異なっていることである。

30

【0093】

閾値の適用は、閾値によって決定される閾値基準を満足するデータポイントを選択するために行われる。伝統的に、信号発生反応における信号値を評価するために、一つの閾値が採択される。つまり、従来の技術は、信号発生反応の信号値を評価するために、すべてのサイクルに渡って同一な閾値を使用する固定閾値方法を導入した。

【0094】

これとは異なって、本発明は、サイクルの少なくとも二つのサイクルの閾値は、互いに異なる可変閾値を使用して、これにより、試料を分析する。

【0095】

40

サイクルの少なくとも二つのサイクルの閾値は、互いに異なっている。いわば、複数の閾値は、全体が異なっているか、あるいは、一部が互いに異なる値を有する。

【0096】

サイクルに対する閾値をプロットして得られたグラフをTCグラフ(threshold cycle graph)という。このTCグラフは、閾値セットをプロットして得られる。前記閾値セットは、閾値ポイントの集合である。閾値ポイントとは、サイクルと前記サイクルにおける閾値を含む座標値をいう。

【0097】

ベースラインを求めるために、データセットに適用される閾値は、ベースライン閾値と命名され、サイクルに対してベースライン閾値をプロットして得られたグラフをBTグラ

50

フという。

【0098】

本発明の方法が増幅反応の生データセットを補正するために使用される場合（e g、b a s e l i n i n g）、T C グラフの一種のB T グラフは、ベースライン閾値をサイクルに対してプロットして得られる（図9参照）。

【0099】

本発明の一具現例によると、サイクルの少なくとも二つ以上のサイクルは、互いに異なる閾値を有し、したがって、試料分析のための情報をとびきり正確に得ることができる。本発明ではこれを「可変閾値（V T）」方法と命名する。前記V T方法は、可変ベースライン閾値方法と可変信号閾値方法とを両方とも含む。

10

【0100】

本発明の一具現例によると、前記閾値は、閾値 - 変化サイクル（t h r e s h o l d - c h a n g e d c y c l e、T C C）を基準に、前記T C C以前のサイクル及びこれらに適用される閾値の集合によって形成された関数と、前記T C C以後のサイクル及びこれらに適用される閾値の集合によって形成された関数とが互いに異なっているように決定される。

【0101】

本発明の一具現例によると、T C Cには、T C C以前のサイクルの関数またはT C C以後のサイクルの関数のいずれも適用することができる。

【0102】

20

本発明において、用語「閾値 - 変化サイクル」（T C C）は、閾値変化のパターンがサイクルを超えながら変更される基準サイクルを意味する。特に、本発明において、用語「閾値 - 変化サイクル」（T C C）は、閾値が変わる基準サイクルを意味する。前記T C Cは、一つであるか、または複数である。本発明において、用語「T C C以前のサイクル」とは、閾値 - 変化サイクルより前のサイクルを意味し、「T C C以後のサイクル」とは、閾値 - 変化サイクルより後のサイクルを意味する。

【0103】

T C C以前のサイクルとこれらのT C C以前のサイクルに適用される閾値によって形成された関数と、T C C以後のサイクルとこれらのT C C以後のサイクルに適用される閾値によって形成された関数とが互いに異なっていることは、T C C以前のサイクルとT C C以後のサイクルのT C グラフが互いに異なるパターンを示すことを意味する。この例示は、図9に示されており、セクションI Iで後述する。

30

【0104】

前記T C Cは、一つの反応に一つまたはそれ以上設定することができる。

【0105】

本発明の一具現例によると、前記T C Cの数は1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 20, 40または50個である。前記T C Cの数は、70, 60, 50, 40または30以下である。具体的に、前記T C Cの数は、1 ~ 2または1 ~ 3個である。

【0106】

本発明の一具現例によると、サイクルは、少なくとも一つのT C C（閾値 - 変化サイクル）を基準に、少なくとも二つの異なるグループに分類される。同一なグループに分類されたサイクルは連続的であり、同一な閾値を有する。互いに隣接したグループに属するサイクルは、互いに異なる閾値を有する。したがって、互いに離れたグループに属するサイクルは、相異なる、あるいは同一な閾値を有する。T C CはT C C前のサイクルまたはT C C後のサイクルと同一な閾値を有することができる。T C Cは、一つのデータセットにおいて、一つが設定可能であり、この場合、データセットのサイクルは、二つのグループに分類される。択一的に、T C Cは、一つのデータセットにおいて、二つ以上設定可能であり、この場合、データセットのサイクルは、3つ以上のグループに分類される。

40

【0107】

表現「互いに隣接したグループに属するサイクル」の例は、以下の通りである。信号発

50

生反応は、合計 40 個のサイクルを含み、グループ 1 は、1 ~ 10 サイクル、グループ 2 は、11 ~ 20 サイクル、グループ 3 は、21 ~ 30 サイクルであって、グループ 4 は、31 ~ 40 サイクルである。この場合、互いに隣接したグループは、グループ 1 とグループ 2、グループ 2 とグループ 3 またはグループ 3 とグループ 4 である。互いに離れたグループは、グループ 1 とグループ 4、グループ 1 とグループ 3 またはグループ 2 とグループ 4 である。

【0108】

本発明の一具現例によると、前記互いに隣接したグループの関数は、互いに異なっており、前記互いに離れたグループの関数は、互いに同一であるか、異なっている。

【0109】

本発明の一具現例によると、前記の段階 (b) は、サイクルの少なくとも一つのサイクルに追加閾値を適用する段階をさらに含む。

【0110】

本発明の一具現例によると、付加的な閾値セットがデータセットに適用される。

【0111】

本発明の一具現例によると、閾値セットは、サイクルの少なくとも二つのサイクルに適用される閾値が互いに異なっている、可変閾値セットである。

【0112】

本発明の一具現例によると、閾値セットは、サイクルに適用された閾値が同一な、固定閾値セットである。

【0113】

本発明の一具現例によると、多重閾値セットは、可変閾値セット及び固定閾値セットで構成された群から選択される少なくとも二つの閾値セットを含む。

【0114】

本発明の一具現例によると、多重閾値セットは、少なくとも一つの固定閾値セットを含む。

【0115】

本発明の一具現例によると、多重閾値セットは、少なくとも一つの可変閾値セットを含む。

【0116】

本発明の一具現例によると、多重閾値セットは、少なくとも一つの固定閾値セットと、少なくとも一つの可変閾値セットを含む。

【0117】

本発明の一具現例によると、多重閾値セットのそれぞれは、対応する閾値基準を有する。

【0118】

本発明の一具現例によると、多重閾値セットは、データセットの分析に同時に適用される。複数のサイクルが閾値基準を満たしていることが観察されると、これらのすべてが分析に使用されるか、またはその一部が分析に使用できる。

【0119】

本発明の一具現例によると、多重閾値セットは、データセットの分析に順次適用される。最初に適用された閾値セットの閾値基準を満たしているサイクルがない場合、別の閾値セットが適用される。

【0120】

本発明の一具現例によると、閾値セットは、データセットに適用され、追加閾値は、サイクルの少なくとも一つのサイクルに適用できる。

【0121】

追加閾値の適用については、後述するセクション II の (3) 多重閾値セット方法の記載を参照して説明することができる。

【0122】

段階(c)：閾値基準を満足するサイクルの確認(S30)

各サイクルに閾値を適用した後、各閾値によって決定された閾値基準(criterion)を満足する1つ以上のサイクルが確認される。

【0123】

本発明において、用語「閾値基準」は、一定の特徴を有するサイクルを確認するための基準をいい、前記一定の基準は、各閾値によって決定される。

【0124】

本発明の一具現例によると、閾値基準は、閾値と関心サイクルにおける信号値を含む、ある参照(reference)または基準(benchmark)である。

【0125】

本発明の一具現例によると、前記閾値基準は、サイクルの信号値と該サイクルに適用された閾値間の大きさ関係である。

【0126】

本発明の一具現例によると、前記閾値基準は、各サイクルの信号値と、各増幅サイクルの閾値との比較である。

【0127】

特に、前記閾値基準は、信号値が閾値以上であるか、以下であるかによって定義される。

【0128】

本発明の一具現例によると、前記閾値基準は、閾値と同一であるか、閾値より大きい信号値を有するものである。

【0129】

たとえば、閾値が1~10サイクルでは、5に設定されて、11~20サイクルでは、2に設定される場合、閾値基準は、信号値が1~10サイクルでは、5以上、11~20サイクルでは、2以上と定義される。

【0130】

段階(d)：確認されたサイクルを使用して試料を分析する段階(S40)

試料は、段階(c)で確認されたサイクルを使用して分析される。

【0131】

本発明の一具現例によると、前記試料の分析は、試料内の標的核酸分子の存在を決定することであり、前記閾値基準を満足する1つ以上のサイクルの確認は、増幅曲線の C_t 値を決定することである。この場合、閾値基準は、閾値と同一な信号値を有することができる。確認されるサイクルの数は、一つでありえる。

【0132】

本発明の方法が、標的核酸分子の存在を決定するために、リアルタイムPCRで C_t 値を決定するに適用される場合、本発明の方法は、以下のような段階を含む；

(a) サイクルにおける信号値を提供するために、前記試料を使用するリアルタイムPCRのそれぞれのサイクルにおける信号値を収得する段階と、

(b) それぞれのサイクルに信号閾値を適用して、複数の信号閾値をサイクルに適用する段階(前記サイクルの少なくとも二つのサイクルの閾値は、互いに異なっている)と、

(c) 信号閾値のそれぞれによって決定される閾値基準を満足する一つ以上のサイクルを確認する段階と、

(d) 前記段階(c)で確認されたサイクルを使用して、リアルタイムPCRにおける C_t 値を決定する段階。

【0133】

リアルタイムPCRにおける C_t 値決定に適用する例は、実施例3及び図11A乃至11Cに例示されている。前記閾値は、 C_t 値決定においては、信号閾値と命名される。 C_t 値を決定する本方法は、VST(可変信号閾値)方法と命名される。

【0134】

実施例3及び図11A乃至11Cに記載されているように、可変信号閾値を使用する本

10

20

30

40

50

方法は、初期ノイズ信号が発生される初期増幅サイクルのデータポイントが、標的核酸分子が存在すると決定される誤りを除去することができる。さらに、本方法は、後期増幅サイクルにおいて、信号値が増加するスタートポイントをより正確に決定することができる、これによって、 C_t 値の決定において、誤りを除去することができる。

【0135】

本発明の一具現例によると、試料の分析は、試料から標的核酸分子の存在を決定することであり、閾値基準を満足する一つ以上のサイクルを確認することは、リアルタイムPCRの増幅曲線のベースライン領域のエンドポイントサイクルを決定することができる。この場合、閾値基準は、ベースライン閾値と同一な信号値を有するものである。確認されるサイクルの数は、一つでありえる。

10

【0136】

本方法が、標的核酸分子の存在を決定するための増幅曲線のベースライン領域のエンドポイントサイクルを決定するために適用される場合、本方法は、以下の段階を含む；

(a) サイクルにおける信号値を提供するために、試料を使用するリアルタイムPCRのそれぞれのサイクルにおける信号値を収得し、(i) リアルタイムPCRの増幅サイクル、および(ii) 前記増幅サイクルにおける信号値を含む生データセットを収得する段階と、

(b) 前記生データセットを使用してベースライン領域のスタートポイントサイクルとエンドポイントサイクルを決定して、ベースライン領域を決定する段階(前記エンドポイントサイクルは、下記段階によって決定される)と、

20

(b1) ベースライン閾値を各増幅サイクルに適用し、複数のベースライン閾値を増幅サイクルに適用する段階(サイクルの少なくとも二つのサイクルのベースラインの閾値は、互いに異なっている)と、

(b2) それぞれのベースライン閾値によって決定されるベースライン閾値基準を満足する1つ以上のサイクルを確認する段階と、

(b3) 前記段階(b2)で確認されたサイクルを使用してベースライン領域のエンドポイントサイクルを決定する段階、

(c) 前記決定されたベースライン領域内生データセットの二つ以上のデータポイントからベースライン領域の最適ライン関数を算出する段階と、

(d) 前記生データセットの信号値から前記ベースライン領域の最適ライン関数によって計算された関数値を差し引き、補正されたデータセットを収得する段階(前記補正されたデータセットは、(i) 前記リアルタイムPCRの増幅サイクル及び(ii) 前記差し引いた結果を含む)。

30

【0137】

さらに具体的に、前記段階(b2)における確認は、生データセットを使用し、それぞれの増幅サイクルに対して計算された傾きと、それぞれの増幅サイクルに対するベースライン閾値とを比較して行われる。

【0138】

セクションIIに説明された方法がセクションIの代表的な実施例であるため、その共通する内容は、明細書の複雑性を避けるために省く。

40

【0139】

本方法は、増加パターン(例えば、増幅反応による信号変化)及び減少パターンの信号変化を含む如何なるパターンの信号変化にも適用することができる。

【0140】

II. 増幅反応の生データセットの補正

本発明の他の様態によると、本発明は、以下の段階を含む信号発生手段の存在下で行われた増幅反応の生データセットを補正する方法を提供する；

(a) (i) 前記増幅反応における増幅サイクル及び(ii) 前記信号発生手段から得た前記増幅サイクルにおける信号値を含む生データセットを収得する段階と、

(b) 前記生データセットからベースラインスタートポイントサイクルとエンドポイン

50

トサイクルを決定して、ベースライン領域を決定する段階と、

(c) 前記決定されたベースライン領域内生データセットの二つ以上のデータポイントからベースライン領域の最適ライン関数を算出する段階と、

(d) 前記生データセットの信号値から前記ベースライン領域の最適ライン関数により計算された関数値を差し引き、補正されたデータセットを取得する段階(前記補正されたデータセットは、(i) 前記増幅反応の増幅サイクル及び(ii) 前記差し引いた結果を含む)。

【0141】

増幅反応の生データセットを補正する方法である本方法は、試料を分析する方法の特定具現例であるため、これらの間に共通する記載は、明細書の複雑性を避けるために省く。

10

【0142】

本発明の発明者は、増幅反応を通じて取得した生データセットを補正して、これにより、増幅反応に対する、より正確で信頼性の高い分析結果を定性的、定量的に提供する新しい方法について鋭意研究した。その結果、増幅反応の生データセットを補正するための新しい方法を発見した。特に、本発明の新しい方法によって、ベースライン領域のエンドポイントサイクルが決定でき、本発明は、増幅反応のより正確で信頼性の高い分析結果を取得するに寄与することを発見した。

【0143】

図1Bは、本発明の増幅曲線補正方法の一具現例に対する流れ図を示す。本発明をより詳細に説明すると、以下のようである。

20

【0144】

段階(a)：生データセットの取得(S110)

最初に、生データセットが取得される。前記生データセットは、(i) 増幅反応の増幅サイクル及び(ii) 信号発生手段から得られた増幅サイクルにおける信号値を含む。

【0145】

生データセットは、信号発生手段の存在下で増幅反応を行って得られる。段階(a)は、択一的に、信号発生手段の存在下で増幅反応を行って、生データセットを取得する段階と表現することができる。

【0146】

本発明の一具現例によると、信号発生手段による信号は、標的核酸分子の存在に依存的に発生し、その強度(intensity)は、増幅反応の進行によって増加または減少する。

30

【0147】

本発明の一具現例によると、増幅反応は、標的核酸分子の存在に依存的に、信号発生手段の存在下で信号を増幅する反応を意味する。

【0148】

特に、一連の反応の繰り返しまたは一定時間間隔を有する反応の繰り返しの場合、用語‘サイクル’は、前記の繰り返しの単位を意味する。

【0149】

例えば、重合酵素連鎖反応(PCR)において、サイクルは、標的分子の変性、標的分子とプライマーのアニールリング(混成化)とプライマーの伸長を含む反応単位を意味する。この場合、反応の繰り返しの増加が状態変化に該当し、前記繰り返し単位がサイクルに当たる。他の例として、LAMP(Loop-mediated isothermal amplification)及びNASBA(Nucleic acid sequence-based amplification)のような等温核酸増幅反応の場合、サイクルは、時間間隔を意味する。

40

【0150】

本発明の一具現例によると、標的核酸分子が試料内に存在する場合、測定された信号値(例えば、信号強度)は、増幅サイクル数の増加によって増加するか、減少する。

【0151】

50

前記生データセットは、(i)増幅サイクル及び(ii)信号発生手段から得られた増幅サイクルにおける信号値を含む。

【0152】

本発明の用語「信号値」は、増幅サイクルで実際測定された信号値またはその変形を意味する。前記変形は、測定された信号値(信号強度)の数学的に加工された値を含むことができる。数学的に加工された値は、例えば、測定された信号値の対数値(logarithmic values)または微分値(derivatives)を含む。前記測定された信号値の微分値は、多重微分を含むことができる。

【0153】

上述のように、生データセットを取得する段階(S110)において、増幅サイクル及び前記増幅サイクルにおける信号発生手段からの信号値を含むデータセットは、増幅反応の実行によって得られ、補正前の増幅曲線(最初の増幅曲線)を提供するためにプロットされる。

10

【0154】

(i)増幅サイクル及び(ii)前記増幅サイクルにおける信号値を含む生データセットは、増幅反応によって得られ、図2に示したような補正前の増幅曲線を提供するためにプロットされる。図2においてRFUは、相対的蛍光単位(relative fluorescence unit)である。

【0155】

上述のように、増幅曲線は、ベースライン領域(baseline region)、指数領域(exponential phase)、直線領域(linear phase)と渋滞領域(plateau phase)に区分される。

20

【0156】

ベースライン領域では、初期増幅サイクルの間に蛍光信号の変化がほとんどない。指数領域は、増幅産物の増加に比例して、蛍光信号が増加することを示す。直線領域では、蛍光信号の増加が実質的に減少し、実質的に線形に現れる。渋滞領域では、増幅産物と蛍光信号の飽和により、蛍光信号の増加はほとんどない。

【0157】

ベースライン領域の信号の大部分を占める背景信号が、試料内標的核酸分子の量と無関係なベースライン移動(drift)の原因となるため、ベースライン領域の決定及び増幅曲線の補正がなされる必要がある。

30

【0158】

段階(b): ベースライン領域の決定(S120)

次に、生データセットを用いたベースライン領域のスタートポイントサイクル及びエンドポイントサイクルの決定によって、ベースライン領域が決定される。

【0159】

ベースライン領域決定に関する「生データセットの利用」は、前記生データセットの直接的、間接的使用をすべて含む。生データセットの間接的利用は、生データセットの変形されたデータセットの利用を含む。

【0160】

本発明の一具現例によると、スタートポイントサイクル及びエンドポイントサイクルは、生データセットから直接決定されるか、あるいは生データセットが数学的に加工されたデータセットから決定される。

40

【0161】

例えば、スタートポイントサイクルは、一定の値以上の信号値を有する最初のサイクルに決定する方法で、生データセットから直接的に決定することができる。択一的に、エンドポイントサイクルは、一定の値以上の傾き値を有する最初のサイクルに決定する方法で、数学的に加工されたデータセットから決定することができる。

【0162】

本発明において、用語「スタートポイントサイクル」は、ベースライン領域の開始に当

50

たるサイクルを意味する。

【0163】

ベースラインスタートポイントサイクル(S)は、ユーザーによって任意に決定することができる。一般には、スタートポイントサイクルは、増幅反応の初期の典型的な変動形態が現れた後のサイクルに決定する。例えば、スタートポイントサイクルは、1~10サイクルから決定でき、例えば2~10、2~8、2~6または2~4サイクルから決定できる。

【0164】

択一的に、ベースライン領域のスタートポイントサイクル(S)は、一定条件を満足するサイクルを考慮して決定することができる。

10

【0165】

例えば、スタートポイントサイクルは、以前サイクルと異なる傾き傾向を示す一番目のサイクルに決定することができる。前記以前サイクルと異なる傾き傾向を示すサイクルは、例えば、以前サイクルより大きい傾きを有するが、初期サイクルの傾きより10%以下の傾きを有するサイクル、以前サイクルの傾きが負のとき正の傾きを示すサイクルまたは以前サイクルの傾きが正のとき、負の傾きを有するサイクルである。

【0166】

本発明の一具現例によると、各サイクルにおける信号値の変化率が計算され、これをベースラインのスタートポイントサイクルまたはエンドポイントサイクルの決定に利用することができる。本明細書で特に言及しない限り、用語「傾き」は、選択されたサイクルで信号値の変化率を意味する。本発明の一具現例によると、傾きは、サイクルに対してプロットされ、傾き曲線を提供する。

20

【0167】

本発明において、用語「エンドポイントサイクル」は、ベースライン領域の終了に当たるサイクルを意味する。ベースラインエンドポイントサイクル(E)がベースライン領域の終わりを決定するため、ベースラインエンドポイントサイクルは、信号増幅が発生する前のサイクルで決定される。

【0168】

前記ベースライン領域のエンドポイントサイクルは、生データセットまたはその変形されたデータセットから決定することができる。

30

【0169】

ベースライン領域のエンドポイントサイクルは、さまざまな方法で決定できる。

【0170】

たとえば、エンドポイントサイクルは、2次微分値が最大となるサイクルに決定することができる。または、データセットの傾き曲線の特徴(位置及び大きさ)がエンドポイントサイクルの決定のために分析される。例えば、傾き曲線は、指数領域のピークが最も大きいはずなので、ベースライン領域のエンドポイントサイクルは、指数領域のピークが始まるサイクルに決定できる。

【0171】

また、エンドポイントサイクルは、以前サイクルと比較し、変動係数(coefficients of variation)が急激に増加することを示す一番目のサイクルで決定することができる。または、エンドポイントサイクルは、予め指定した値以上の変動係数を有するサイクルで決定することができる。前記変動係数は、標準偏差を算術平均で割ったものとして定義される。前記変動係数は、変動係数が算出されるサイクルとその一定数前、後のサイクルを選択して、これらの選択されたサイクルの標準偏差と算術平均を計算して変動係数を求めることができる。前記選択されたサイクルの一定数は、1, 2, 3, 4または5であり、好ましくは、1または2である。

40

【0172】

本発明の一具現例によると、前記エンドポイントサイクルは、前記スタートポイントサイクルと、データセットで最大の傾きを有するデータポイントのサイクルとの間で決定さ

50

れる。

【0173】

本発明の一具現例によると、前記エンドポイントサイクルは、超過サイクル(not-less-than cycle)の中から選択することができる。または、前記エンドポイントサイクルは、超過サイクルの中で選択されたサイクルを、エンドポイントサイクルを決定するための基準サイクルとして決定することができる。

【0174】

本発明において、用語‘超過サイクル’(not-less-than cycle(s))は、ベースライン閾値と同一またはそれ以上の値を有するデータポイントのサイクルを意味する。つまり、超過サイクルは、ベースライン閾値以上の傾きを有するサイクルである。

10

【0175】

増幅曲線が減少するパターンの場合、エンドポイントサイクルは、未満サイクル(not-more-than cycle)の中から選択されたサイクルによって決定できる。

【0176】

本発明の一具現例によると、前記エンドポイントサイクルは、クロスポイントサイクルの中で選択されたサイクルによって決定することができる。または前記エンドポイントサイクルは、クロスポイントサイクルの中で選択されたサイクルをエンドポイントサイクルの決定のための基準サイクルとして決定することができる。

20

【0177】

本発明の用語‘クロスポイントサイクル’(cross-point cycle)は、ベースライン閾値と同一な値を有するデータポイントのサイクルを意味する。

【0178】

前記クロスポイントサイクルは、データポイントのサイクルの中で決定できる。

【0179】

前記クロスポイントサイクルは、ベースライン閾値とデータポイントを使用して数学的に計算されたサイクルによって決定することができる。

【0180】

本発明の一具現例によると、エンドポイントサイクルは、ベースライン閾値と同一な傾きを有するデータポイントのサイクル、ベースライン閾値を超過する傾きを有する一番目のデータポイントのサイクルまたはベースライン閾値未満の一次傾きを有する一番目のデータポイントのサイクルによって決定される。または、特定値の傾きを有するデータポイントのサイクルまたは特定値を超過する一番目のデータポイントのサイクルを基準サイクルとして使用し、エンドポイントサイクルを決定するための数学的方程式に代入する方法でエンドポイントサイクルを決定することができる。前記数学的方程式の例は、‘エンドポイントサイクル=基準サイクル-(1, 2, 3または4サイクル)’; ‘エンドポイントサイクル=基準サイクル+(1, 2, 3または4サイクル)’; ‘エンドポイントサイクル=[基準サイクル×0.9]’; 及び‘エンドポイントサイクル=[基準サイクル-(ベースライン閾値×0.1)]’を含む。[X]は、X値と同一か小さい最大の整数を表示する。

30

40

【0181】

前記傾きと共に記載された特定値は、ベースライン閾値(BT)である。ベースライン閾値は、一般にベースラインを決定するために使用され、本発明では、ベースライン領域のエンドポイントサイクルを決定するために使用される。前記ベースライン閾値は、測定対象および/または測定機器に応じて予め決定(または入力)でき、またはユーザーによって任意に決定することができる。

【0182】

本発明の一具現例によると、エンドポイントサイクルは、ベースライン閾値と傾き曲線の一番目のクロスポイントのサイクルまたは(前記)一番目のクロスポイントのデータポ

50

イントのサイクルに最も近いサイクルによって決定できる。

【0183】

クロスポイントのサイクルまたはクロスポイントのデータポイントのサイクルをクロスポイントサイクルという。前記クロスポイントサイクルは、各サイクルに対してベースライン閾値をプロットして得られたグラフ（以下、ベースライン閾値グラフまたはBTグラフという）と傾き曲線が交互するポイントのサイクルである。

【0184】

クロスポイントサイクルの数は、傾き曲線および/またはBTグラフの形に応じて、一つまたはそれ以上である。エンドポイントサイクルを決定するためのクロスポイントサイクルは、例えば、最初のクロスポイントサイクルまたは最後のクロスポイントサイクルのように、予め決定された特定クロスポイントサイクルによって決定できる。またはクロスポイントサイクルの数が二つ以上である場合、最も少ないサイクル数を有するクロスポイントサイクルがエンドポイントサイクルとして決定される。

10

【0185】

クロスポイントのサイクルの値は、整数ではないことがある。実際の実験で、サイクルは整数で表示されるため、エンドポイントサイクルは、整数であることが望ましい。したがって、前記クロスポイントサイクルを超過する一番目の整数サイクル（integral cycle）または前記一番目の整数サイクルの1, 2, 3または4番目前または後のサイクルがエンドポイントサイクルとして決定できる。またはエンドポイントサイクルは、クロスポイントサイクル未満の最も大きい整数サイクルまたは前記最も大きい整数サイ

20

【0186】

本発明の一具現例によると、ベースライン領域のエンドポイントサイクルは、ベースライン閾値と傾き曲線の一番目のクロスポイントのサイクル又は前記一番目のクロスポイントのデータポイントのサイクルの1, 2, 3または4サイクル前または後のサイクルによって決定される。

【0187】

本発明の一具現例によると、ベースライン閾値は、増幅領域が現れる前の初期サイクルの間、背景信号によって干渉されないように設定できる。

30

【0188】

本発明の一具現例によると、ベースライン閾値は、様々な試料の分析結果によって選択された適切な値に設定することができる。

【0189】

図3は、2～4サイクルのいずれかのサイクルがスタートポイントサイクルに決定されて、ベースライン閾値と傾き曲線間の一番目のクロスポイントサイクルがエンドポイントサイクルに決定されたベースライン領域を示す。

【0190】

本発明では、前記決定されたスタートポイントサイクルとエンドポイントサイクル間の相対的距離が一定値以下である場合、前記相対的距離は、適切なベースライン領域を確保するために、追加に調整することができる。

40

【0191】

前記相対的距離は、エンドポイントサイクルからスタートポイントサイクルを差し引いて計算することができる。前記追加調整が必要な相対的距離の一定値は、0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9または10サイクルであり、好ましくは、0, 1, 2, 3または4サイクルである。

【0192】

前記追加調整の方法は、スタートポイントサイクルまたはエンドポイントサイクル、またはその両方のサイクルを、前記相対的距離が一定値以上になるように任意に設定する方法である。または、前記追加調整方法は、スタートポイントサイクルまたはエンドポイン

50

トサイクルのいずれかを、上述のスタートポイントサイクルまたはエンドポイントサイクル決定方法によって決定し、前記決定されたスタートまたはエンドサイクルから前記相対的距離が一定値以上になるサイクルの範囲で、他の一つを、上述のスタートポイントサイクルまたはエンドポイントサイクル決定方法によって決定する方法で決定することができる。

【0193】

本発明の一具現例によると、データポイントの傾きは、前記データポイントのサイクルにおける信号値の変化を示す。

【0194】

上述のように、本発明の増幅反応は、サイクルに応じて信号減少を示す反応を含む。

10

【0195】

前記傾きは、微分法など、様々な方法で計算することができる。

【0196】

前記傾きは、特定サイクルのデータポイント及び前記特定サイクルの前および/または後のサイクルの少なくとも一つのデータポイントを使用して、最小二乗法またはLMS (least mean square) アルゴリズムなどにより計算することができる。

【0197】

以下、線形回帰分析の代表的な例として、最小二乗法 (least square method) を挙げて説明するが、本発明はこれに限定されない。

【0198】

20

最小二乗法で傾きを計算するのに使用されるデータポイントの数は、二つ以上でありえる。例えば、最小二乗法で傾きを計算するために使用されるデータの数は、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 または 15 個以下である。特に、前記データポイントの数は、2 ~ 3、2 ~ 15、3 ~ 11、3 ~ 9、3 ~ 7、3 ~ 5 または 5 ~ 7 個である。

【0199】

最小二乗法で傾きを計算するのに使用されるデータポイントは、隣接したサイクルであるか、離れているサイクルである。

【0200】

たとえば、傾きは、特定サイクルのデータポイント及び特定サイクル以前および/または以後のサイクルに対応する少なくとも一つのデータポイントを使用して、最小二乗法によって計算することができる。

30

【0201】

他の例としては、前記傾きは、前記データセットのうち、特定サイクルに対応するデータポイント、特定サイクル以前のサイクルのデータポイント及び特定サイクル以後のサイクルのデータポイントを使用して、最小二乗法によって計算することができる。

【0202】

最小二乗法によって傾き計算に使用されるデータポイントの数は、サイクルに応じて変わる。たとえば、データポイントの傾きは、互いに隣接した二つまたは三つのデータポイントを使用して、最小二乗法によって計算することができる。たとえば、一番目のサイクル以前にはサイクルが存在しないため、一番目のサイクルの傾きは、一番目のサイクルとその次のサイクルのデータポイントを使用して、最小二乗法によって計算することができる。最後のサイクル以後には、サイクルがないため、最後のサイクルの傾きは、最後のサイクルと隣接した直前のサイクルを使用して、最小二乗法によって計算することができる。他のサイクルに対しては、前記傾きは、該サイクルのデータポイント、前記該サイクルの直前のサイクルのデータポイント及び前記該サイクルの直後のサイクルのデータポイントを使用して、最小二乗法によって計算することができる。

40

【0203】

本発明の一具現例によると、前記最小二乗法は、下記数学式 1 で表すことができる。

【数 1】

$$m = \frac{\sum_{i=I-a}^{I+b} (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=I-a}^{I+b} (x_i - \bar{x})^2}$$

数学式 1

(前記数学式 1 において、

【数 2】

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=I-a}^{I+b} x_i}{n}, \quad \bar{y} = \frac{\sum_{i=I-a}^{I+b} y_i}{n}$$

10

であり、

I は、傾きを求めようとするデータポイントのサイクルであり、m は、I 番目サイクルのデータポイントの傾きであって、 x_i は、i 番目サイクルのサイクル番号であり、 y_i は、i 番目サイクルで測定された信号値であって、n は、 $a + b + 1$ であり、a 及び b は、独立的に 0 以上 10 以下の整数（但し、a は、I 未満であり、 $a + b + 1$ は、2 以上、生データセットのデータポイントの数以下、 $I + b$ は、生データセットのデータポイントの数以下）である。）

20

【0204】

‘ $a + b + 1$ ’ は、I 番目のサイクルの傾きを計算するために使用されるデータポイントの数であり、LSMR（最小二乗法範囲；Least Squares Method Range）と称する。‘a’ は、I 番目のサイクルの傾きを計算するために使用されるデータポイントのうち、最小サイクルを計算するための値である。‘b’ は、最大サイクルを計算するための値である。データポイントの数は、全体反応で収得したデータポイントの数を意味し、増幅曲線の最大サイクル値に当たる。

【0205】

‘a’ 及び ‘b’ は、独立して、0 乃至 10 の整数であり、好ましくは、1 乃至 5 の整数、さらに好ましくは、1 乃至 3 の整数である。

30

【0206】

前記 ‘a’ 及び ‘b’ は、同一な値であることが有利であるが、これらは、測定対象、測定環境及びサイクルによって変わる。

【0207】

前記 ‘a’ 及び ‘b’ は、 $I - a$ が 1 未満であるか、 $I + b$ が全体データポイントの数を超過する場合を除いて、反応の全体データポイントに同一に適用されることが有利である。しかし、信号値の変化側面で特別な属性または区間特性を示す特定データポイントまたは特定範囲のデータポイントの傾きは、他の前記 ‘a’ 及び ‘b’ を適用して計算することができる。

40

【0208】

たとえある反応のすべてのデータポイントに一定な ‘a’ 及び ‘b’ が適用される場合でも、 $I - a$ が 1 未満であるか、 $I + b$ が全体データポイントの数を超過するデータポイントの傾きを計算するためには、‘a’ と ‘b’ の値は、他のデータポイントに適用されたものとは異なる値を有することができる。たとえば、 $I - a$ が 1 未満であるデータポイントでは、‘a’ は ‘ $I - a$ ’ が 1 になるように調整することができる。この場合、‘b’ は、一定に維持されるか、‘a’ の調整によって変わる。

【0209】

$I + b$ が全体データポイントの数を超過するデータポイントの場合、‘b’ は、‘ $I +$

50

b' が全体データポイントの数と同一になるように調整される。この場合、'a' は、一定に維持されるか、'b' の調整によって変わる。

【0210】

LSMR の値、'a' 及び 'b' は、測定対象および/または測定装置に応じて、あらかじめ決定（入力）することができ、またはユーザーによって任意に決定することができる。

【0211】

図3は、数学式1で表現される最小二乗法によって計算された傾き曲線を示す。Y軸は、最小二乗法により各増幅サイクルで計算された蛍光信号強度（または相対的蛍光単位）の傾きを示す。

10

【0212】

ベースライン領域決定のエンドポイントサイクル

上述のように、初期サイクルにおいて、背景信号による干渉を避けながら、ベースライン領域のエンドポイントサイクルは、生データセットから各増幅サイクルで計算された傾きと各増幅サイクルに対するベースライン閾値とを比較して決定することができる。

【0213】

ベースラインの閾値は、ベースライン領域のエンドポイントサイクルを決定するために設定される。前記ベースライン閾値は、測定対象および/または測定装置に応じて、あらかじめ決定（入力）することができ、またはユーザーによって任意に決定することができる。

20

【0214】

背景信号またはノイズによる増幅分析の誤りは、エンドポイントサイクルの誤った決定によるものでありえる。核酸増幅反応のような増幅反応において、非正常的な蛍光信号は、初期サイクルで頻繁に現れて、記録される。非正常的な蛍光信号の検出は、標的核酸分子の量を反映しない蛍光信号を検出することをいう。

【0215】

ベースライン閾値が過度に低く設定される場合、非正常的な蛍光信号の傾き値がエンドポイントサイクルの決定に影響を与えるようになる。もしそう決定されたエンドポイントサイクルを使用してベースライン領域が決定され、増幅曲線が補正されると、補正された増幅曲線は、偽陽性結果を示すか、増幅産物の量を反映しない。もしエンドポイントサイクルの決定に非正常的な蛍光信号の傾き値が関与することを避けるために、ベースライン閾値が過度に高く設定される場合、ベースライン閾値と傾き曲線間の交差が、初期サイクルではなく、後のサイクルで起こるか、傾き曲線のピークが低い場合は、ベースライン閾値と傾き曲線間の交差が起こらないことがある。

30

【0216】

本発明の一具現例によると、上述の問題を解決するために、特定サイクル以前のサイクルは、エンドポイントサイクルの決定のプロセスから除く。または初期背景信号がエンドポイントサイクルの決定に関与しないよう、ベースライン閾値が調整される。

【0217】

本発明の一具現例によると、ベースライン閾値は、増幅領域が観察される前の初期のサイクルにおいて、背景信号によって干渉されないように設定することができる。

40

【0218】

(1) 特定サイクル以前のサイクルを除外する方法

本発明の一具現例によると、エンドポイントサイクルを決定するために、特定サイクル以前のサイクルを除外する方法において、前記特定サイクルは、最小ベースラインエンドポイントサイクル (MBEC、Minimum Baseline End-point Cycle) である。この方法において、エンドポイントサイクルは、MBEC以上のサイクルの中から決定される。MBEC適用によって、増幅反応初期サイクルの間の背景信号またはノイズ信号によって、エンドポイントサイクルが増幅領域の始まりより過度に離れて最初に決定されることを防止することができる。このようにエンドポイントサイク

50

ルの決定に M B E C を設定する方法を ' M B E C 方法 ' という。

【 0 2 1 9 】

前記 M B E C は、測定機器、個々の装置の特性、分析試料、試薬の影響による背景信号またはノイズ信号のパターンに応じて多様に設定することができる。M B E C は、背景信号またはノイズ信号による誤りが防止される限り、設定サイクル範囲に制限がない。例えば、M B E C は、1 ~ 5 0 サイクルの範囲で決定することができ、好ましくは、1 ~ 1 0、1 ~ 1 5、1 ~ 2 0、1 ~ 2 5、1 ~ 3 0、1 ~ 3 5、1 ~ 4 0、5 ~ 1 0、5 ~ 1 5、5 ~ 2 0、5 ~ 2 5、5 ~ 3 0 サイクル、より好ましくは、5 ~ 1 5 サイクルの範囲で決定することができる。

【 0 2 2 0 】

図 8 A 及び図 8 B に示すように、傾き曲線の二つのクロスポイントサイクル (E_1 、 E_2) のうち、M B E C が適用されると、M B E C を超過する E_2 がエンドポイントサイクルとして決定される。

【 0 2 2 1 】

また、M B E C を超過するクロスポイントサイクルが二つ以上である場合、より小さいクロスポイントサイクルがエンドポイントサイクルに決定される。上述のように、M B E C を超過する最も小さいクロスポイントサイクルの値が整数ではない場合、前記最も小さいクロスポイントサイクルを超過する一番目の整数サイクル値または前記一番目の整数サイクル値の 1、2、3 または 4 サイクル前または後のサイクルがエンドポイントサイクルとして決定される。または、前記最も小さいクロスポイントサイクル値未満の最も大きい整数サイクルまたは前記最も大きい整数サイクルの 1、2、3 または 4 サイクル前または後のサイクルがエンドポイントサイクルとして決定される。

【 0 2 2 2 】

本発明の一具現例によると、前記の段階 (b) において、ベースライン領域のエンドポイントサイクルは、最小ベースラインエンドポイントサイクル (minimum baseline end - point cycle、M B E C) 以上のサイクルで決定され、前記 M B E C は、増幅反応の前または後に決定される。

【 0 2 2 3 】

M B E C が決定された後は、ベースライン領域のエンドポイントサイクルは、さまざまな方法で容易に決定することができる。例えば、クロスポイントサイクルまたは超過サイクルが先に確認され、これらがエンドポイントサイクルに決定できるかどうかを評価するために、M B E C と比較する。または前記エンドポイントサイクルを単純に M B E C 以後のサイクルの中から決定することができる。

【 0 2 2 4 】

もし M B E C 以上のクロスポイントサイクルが存在しない場合は、傾き曲線の最後のサイクルがエンドポイントサイクルに決定される。

【 0 2 2 5 】

本発明の一具現例によると、前記ベースライン領域のエンドポイントサイクルは、以下の段階を含む方法によって決定することができる；

- (i) それぞれの増幅サイクルに対して計算された傾きを取得する段階と、
- (i i) 前記傾きをそれぞれの増幅サイクルに対するベースライン閾値と比較し、ベースライン領域の候補エンドポイントサイクルを取得する段階と、
- (i i i) 前記候補エンドポイントサイクルを M B E C と比較する段階 (前記候補エンドポイントサイクルが M B E C より大きい場合、前記候補エンドポイントサイクルをエンドポイントサイクルに決定する) 。

【 0 2 2 6 】

候補エンドポイントが M B E C 未満の場合、前記候補は除去され、前記段階 (i) および (i i) が、新しい候補エンドポイントを検索するために繰り返される。もし M B E C 以上で候補エンドポイントがない場合、傾き曲線の最後のサイクルがエンドポイントサイクルに決定される。

【0227】

本発明のM B E C方法は、好ましくない増幅反応の初期サイクルでエンドポイントサイクルが決定されることを防止し、結果的に、より正確に増幅曲線を補正することができる。

【0228】

(2) 可変ベースライン閾値方法

本発明の一具現例によると、ベースライン閾値(B T)は、初期背景信号がエンドポイントサイクルの決定に関与しないように調整される。

【0229】

上述のように、生データセットを利用して、各増幅サイクルで計算された傾きと各増幅サイクルに対するベースライン閾値とを比較して、エンドポイントサイクルを決定するために、固定ベースライン閾値(F B T)は、すべての増幅反応のサイクルに適用されることが一般的である。

【0230】

本発明によると、ベースライン閾値は、各サイクルに対して同一であるか、または相異に適用(割り当て)される。またはベースライン閾値は、すべてのサイクルにおいて相異に適用される。

【0231】

本発明の一具現例によると、サイクルの少なくとも二つのサイクルは、互いに異なるベースライン閾値を有する。したがって、複数のベースライン閾値は、全体が又は一部が互いに異なっている。複数のベースライン閾値全部または一部が互いに異なる値を有するように、サイクルに適用されるベースライン閾値を調整する方法は、‘可変ベースライン閾値’(V B T、variable baseline threshold)方法と命名する。

【0232】

本発明の一具現例によると、前記ベースライン領域のエンドポイントサイクルは、以下の段階を含む方法によって決定することができる；

(b 1) それぞれの増幅サイクルにベースライン閾値を適用して、複数のベースライン閾値をサイクルに適用する段階(前記サイクルの少なくとも二つのサイクルのベースライン閾値は、互いに異なっている)、

(b 2) ベースライン閾値のそれぞれによって決定される閾値基準を満足する一つ以上のサイクルを確認する段階と、

(b 3) 前記段階(b 2)で確認されたサイクルを使用してベースライン領域のエンドポイントサイクルを決定する段階。

【0233】

ベースラインの閾値をサイクルに対してプロットして得られたグラフをB Tグラフという。

【0234】

単一ベースライン閾値がすべてのサイクルに割り当てられる場合、前記B Tグラフは、x軸と平行な直線を有する。

【0235】

V B T方法によると、図9に示されたように、互いに異なるベースライン閾値による多様なB Tグラフを収得することができる。

【0236】

本発明の一具現例によると、増幅反応のサイクルは、少なくとも二つの相異なるグループに分類されて、同一なグループに属するサイクルは、互いに同一なベースライン閾値を有し、互いに異なるグループに属するサイクルは、相異なるベースライン閾値を有する。この場合、B Tグラフは、x軸と平行な直線を有する(図9の(a)と(b)を参照)。

【0237】

本発明の一具現例によると、全体または一部サイクルのベースライン閾値は、サイクル

10

20

30

40

50

数の増加によって一定比率で増加するか、減少する。この場合、B T グラフは、1 次関数の形態で表れる（図 9 の（c）、（d）、（g）及び（h）参照）。

【0238】

本発明の一具現例によると、全体または一部サイクルのベースライン閾値は、サイクル数の増加によって変化する比率で増加するか、減少する。この場合、B T グラフは、曲線関数（例えば、2 次関数）形態で表れる（図 9 の（f）参照）。

【0239】

本発明の一具現例によると、増幅サイクルは、少なくとも二つのグループに分類されて、同一グループに分類されたサイクルは、同一なベースライン閾値を有して、異なるグループに分類されたサイクルは、異なるベースライン閾値を有する。このような場合、B T グラフは、少なくとも二つの関数によって表現することができる。前記 B T グラフは、連続的または不連続的にプロットできる。

10

【0240】

本発明の一具現例によると、ベースライン閾値変化サイクル（B T C C）が設定され、前記設定された B T C C の前、後のサイクルには、相異なるベースライン閾値がそれぞれ適用される。

【0241】

本発明において、用語「ベースライン閾値変化サイクル」（B T C C； *baseline threshold - changed cycle*）は、ベースライン閾値の変化パターンがサイクルを超えながら変更される基準サイクルをいう。特に用語「ベースライン閾値変化サイクル」（B T C C）は、ベースライン閾値が変化する基準サイクルを意味する。前記 B T C C は、一つの増幅反応に対して一つまたはそれ以上設定できる。前記 B T C C は、増幅反応前、増幅反応中または増幅反応後に設定できる。

20

【0242】

本発明の一具現例によると、増幅サイクルに対するベースライン閾値は、ベースライン閾値変化サイクル（B T C C）を基準に、前記 B T C C 以前のサイクルとこれらに適用されるベースライン閾値の集合によって形成された第 1 関数と、前記 B T C C 以後のサイクルとこれらに適用されるベースライン閾値の集合によって形成された第 2 関数とが互いに異なっているように設定される。

【0243】

本発明の一具現例によると、B T C C には、B T C C 以前のサイクルに対する関数または B T C C 以後のサイクルに対する関数が適用される。

30

【0244】

一つのサイクルに一つのベースライン閾値が適用されるため、サイクルに対するベースライン閾値の関数が形成できる。前記関数は、全体サイクルに対する閾値の集合から形成することができ、一部サイクルに対する閾値の集合から形成することができる。

【0245】

B T C C 以前のサイクルとこれらに適用されるベースライン閾値の集合によって形成された第 1 関数と、前記 B T C C 以後のサイクルとこれらに適用されるベースライン閾値の集合によって形成された第 2 関数とが互いに異なるように設定されるということは、B T C C 以前のサイクルの第 1 関数の B T グラフと B T C C 以後のサイクルの第 2 関数の B T グラフとが互いに異なるパターンを示すことを意味する。

40

【0246】

たとえば、B T C C 以前のサイクルに適用されたベースライン閾値は、1 次関数で表すことができ、B T C C 以後のサイクルに適用されたベースライン閾値は、定数関数で表すことができる（図 9 の（c）参照）。図 9 の（c）において、B T C C 以前のサイクルに適用されたベースライン閾値は一定に減少し、B T C C 以後のサイクルに適用されたベースライン閾値は、固定された値を有する。

【0247】

他の例として、二つのベースライン閾値を有する場合、一番目の B T C C（B T C C 1

50

）以前のサイクルに対するベースライン閾値と二番目のB T C C (B T C C 2) 以後のサイクルに対するベースライン閾値は、定数関数で表し、B T C C 1 とB T C C 1 間のベースライン閾値は、前記二つの定数関数を連結する1次関数（図9の（d）参照）、または2次関数または他の関数（図9の（f）参照）で表すことができる。

【0248】

B T C C 前のB T グラフとB T C C 後のB T グラフは、B T C C を起点に不連続的な形態でありえる（図9の（e）と（h）参照）。このような場合、B T C C を、B T C C 前の関数とB T C C 後の関数にそれぞれ適用すると、互いに異なる関数値を算出する。

【0249】

本発明の一具現例によると、前記増幅サイクルは、ベースライン閾値変化サイクル（B T C C）を境に、2以上の異なるグループに分類される。この場合、同一なグループに属するサイクルは、連続的で、同一なグループに属するサイクルは、互いに同一なベースライン閾値を有し、互いに隣接した別のグループに属するサイクルは、相異なるベースライン閾値を有する。したがって、離隔された別のグループに分類されたサイクルは、互いに異なるか、同一な閾値を有する。B T C C のベースライン閾値は、B T C C 以前のサイクルまたは以後のサイクルのベースライン閾値と同一でありえる。B T C C は、一つのデータセットに一つ設定でき、この場合、データセットのサイクルは、二つのグループに分類される。または前記B T C C は、一つのデータセットに二つ以上設定することができて、この場合、データセットのサイクルは、3つ以上のグループに分類される。

【0250】

本発明の一具現例によると、増幅サイクルは、少なくとも1つ以上のB T C C を基準に、少なくとも二つの相異なるグループに分類され、同一なグループに属するサイクルは、同一なベースライン閾値を有することができる。非特異的信号またはノイズ信号が激しく表れるサイクル区間には、高いまたは低いベースライン閾値が適用されて、非特異的またはノイズ信号が正常信号として検出されないようにすることができる。また、その他のサイクル区間には、一般的なベースライン閾値が適用され、正常信号を検出および分析する。

【0251】

好ましくは、増幅サイクルは、B T C C を基準に、互いに異なる二つのグループに分類され、同一なグループは、同一なベースライン閾値を有して、異なるグループに分類されたグループは、異なるベースライン閾値を有する。B T C C は、B T C C の前または後のサイクルと同一なベースライン閾値を有することができる。

【0252】

本発明の一実施例では、前記V B T 方法を、初期サイクルが非正常的に高い傾き値を有する増幅結果に使用した。B T C C を設定した後、増幅曲線の補正のために、高いベースライン閾値をB T C C 以前のサイクルに適用して、低ベースライン閾値をB T C C 以後のサイクルに適用した。V B T を適用した場合が、さらに正確に増幅曲線を補正できることを確認した。

【0253】

前記B T C C は、測定機器、試料、試薬の特性に影響を受ける背景信号またはノイズ信号のパターンによって変わる。B T C C は、背景信号またはノイズ信号による誤りが防止される限り、その決定範囲に制限がない。たとえば、B T C C は、70, 60, 50, 40, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 10または15サイクル以下でありえる。前記B T C C サイクルは、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35または40サイクル以上でありえる。B T C C は、1乃至70サイクル範囲内で決定することができ、好ましいサイクル範囲は、1～60、1～50、1～40、1～30、5～60、5～50、5～40、10～40、10～35、15～35、15～30、15～25であり、さらに好ましくは、15～25サイクルである。

【0254】

図10A及び図10Bに示されたように、BTCCを基準に、第1BTグラフ(1st BT)と第2BTグラフ(2nd BT)で表示される二つの関数が定数関数であると、傾き曲線との一番目のクロスポイントサイクルがベースライン領域のエンドポイントサイクル(E2)に決定される。

【0255】

MBC方法とVBT方法は、選択的に適用することができる。また、前記二つの方法を両方とも増幅曲線の補正に適用することができる。

【0256】

実施例2では、インフルエンザAウイルス(Flu A)の核酸を収得して、増幅し、第1増幅曲線を確保した。ベースライン領域のエンドポイントサイクルをMBC方法またはVBT方法をそれぞれ適用するか、両方とも適用せずに、それぞれ収得した。以後、得られたエンドポイントサイクルに決定されたベースライン領域を使用し、第1増幅曲線を補正した。その結果、MBC方法またはVBT方法を適用した補正は、前記方法を適用していない補正に比べて、増幅産物の量をより正確に反映する、補正された増幅曲線を提供することができることを確認した。

【0257】

(3)多重ベースライン閾値セット方法

本発明の一具現例によると、追加的なベースライン閾値が、サイクルの少なくとも一つのサイクルに適用できる。

【0258】

本発明の一具現例によると、追加的なベースライン閾値セットが、データセットに適用できる。

【0259】

一般的な核酸増幅では、標的核酸分子がない場合、増幅曲線は、平らな形状(flat shape)であるか、非特異的結合及び増幅によって少し増加するパターンである。可能性が低い、非正常的な陰性増幅反応は、サイクルの増加に応じて、信号値の減少を示す(すなわち、陰性傾きパターン)。

【0260】

このような場合、ベースライン領域の決定および生データセットの補正において、誤りが発生しやすいが、これは、ベースライン閾値セットと増幅曲線(または傾き曲線)との間のクロスポイントが発生せず、したがって、ベースライン領域のエンドポイントサイクルが設定されないからである。本発明の追加ベースライン閾値のセットの適用は、このような誤りのある分析を防止することができる。例えば、追加ベースライン閾値セットのベースライン閾値が負に適用され、したがって、負の傾き値を有するベースライン領域のエンドポイントサイクルを決定することができる。

【0261】

本発明の一具現例によると、少なくとも二つの閾値セットがデータセットに適用される。増幅曲線の分析において誤り防止のために、少なくとも二つの閾値セットをデータセットに適用する方法は、‘多重ベースライン閾値セット’方法と命名される。ベースライン閾値セットは、ベースライン閾値ポイントの集合である。前記ベースライン閾値ポイントは、サイクルと、前記サイクルにおけるベースライン閾値を含む座標値をいう。

【0262】

本発明の一具現例によると、ベースライン閾値セットは、サイクルの少なくとも二つのサイクルに適用されたベースライン閾値が互いに異なる、可変ベースライン閾値セットである。

【0263】

本発明の一具現例によると、ベースライン閾値セットは、すべてのサイクルに適用されるベースライン閾値が同一な、固定ベースライン閾値セットである。

【0264】

本発明の一具現例によると、多重ベースライン閾値セットは、可変ベースライン閾値セ

10

20

30

40

50

ットと固定ベースライン閾値セットとを含むグループから選択された少なくとも二つのベースライン閾値セットを含む。

【0265】

本発明の一具現例によると、多重ベースライン閾値セットは、少なくとも一つの固定ベースライン閾値セットを含む。

【0266】

本発明の一具現例によると、多重ベースライン閾値セットは、少なくとも一つの可変ベースライン閾値セットを含む。

【0267】

本発明の一具現例によると、多重ベースライン閾値セットは、少なくとも一つの固定ベースライン閾値セット及び少なくとも一つの可変ベースライン閾値セットを含む。

10

【0268】

本発明の一具現例によると、多重ベースライン閾値セットは、少なくとも二つのベースライン閾値セットを含み、前記少なくとも二つのベースライン閾値セットは、すべて固定ベースライン閾値セットである。

【0269】

本発明の一具現例によると、多重ベースライン閾値セットの各ベースライン閾値セットは、対応する閾値基準を有する。

【0270】

本発明の一具現例によると、多重ベースライン閾値セットは、同時に分析対象データセットに適用することができる。閾値基準を満足する複数のサイクルが観察される場合、すべてがまたはその一部が分析に使用できる。

20

【0271】

本発明の一具現例によると、多重ベースライン閾値セットは、順次に分析対象データセットに適用することができる。最初に適用されたベースライン閾値セットの閾値基準を満足するサイクルがない場合、また他のベースライン閾値セットが適用される。

【0272】

本発明の一具現例によると、ベースライン閾値セットがデータセットに適用されて、追加的なベースライン閾値セットがサイクルの少なくとも一つのサイクルに適用できる。

【0273】

30

本発明の一具現例によると、ベースライン領域のエンドポイントサイクルは、以下の段階を含む方法によって決定できる；

(a) 各サイクルにベースライン閾値を適用する段階と、

(b) 少なくとも一つのサイクルに追加ベースライン閾値を適用する段階と、

(c) 各ベースライン閾値によって決定されたベースライン閾値基準を満足する1つ以上のサイクルを確認する段階と、

(d) 前記段階(c)で確認されたサイクルを使用してベースライン領域のエンドポイントサイクルを決定する段階。

【0274】

段階(a)のベースラインの閾値は、正常的な増幅結果のエンドポイント決定のために適用される。

40

【0275】

段階(b)の追加的なベースライン閾値は、段階(a)のベースライン閾値によって決定された主閾値基準(main threshold criterion)を満足するサイクルがない、非正常的な増幅結果に適用される。

【0276】

さらに具体的に、閾値基準を満足するサイクルは、以下の方法で確認される；n番目サイクルの差引結果の符号が(n-1)番目サイクルの差引結果の符号と相異なる場合、n番目サイクルは、閾値基準を満足するものである。前記差引結果は、信号値から閾値を差し引いた結果である。

50

【 0 2 7 7 】

エンドポイントサイクルを決定するために、さまざまなデータセットが使用できる。適切な閾値及び決定方法は、データセットの種類に応じて選択できる。当業者は、本発明の方法を、上述の傾きデータセットの具現例及び実施例の指示および方向に基づいて、多様なデータセットの分析に利用することができる。

【 0 2 7 8 】

段階 (c) : 最適ライン関数の算出 (S 1 3 0)

ベースライン領域の決定に続いて、ベースライン領域の最適ライン関数が、ベースライン領域内生データセットの二つ以上のデータポイントから計算される。

【 0 2 7 9 】

最適ライン関数は、データにあらわれた傾向を最もよく表す関数を意味する。最適ラインは、前記最適ライン関数をプロットして得られたグラフを意味する。

【 0 2 8 0 】

最適ライン関数は、ベースライン領域内の少なくとも二つのデータポイントを使用して求めることができる。例えば、ベースライン領域の一部またはすべての地域のデータポイントを使用して求めることができる。

【 0 2 8 1 】

最適ライン関数は、様々な方法で求めることができる。例えば、ベースライン領域内のデータポイントを使用した線形回帰分析 (linear regression analysis) または LMS (least mean square) アルゴリズムによって求めることができる。

【 0 2 8 2 】

特に、線形回帰の 1 次方程式、 ' $y = mx + b$ ' で表示される最適ライン関数は、スタートポイントサイクルからエンドポイントサイクルまでのデータポイントを使用して求めることができる。

【 0 2 8 3 】

図 4 A に示されたように、最適ライン傾きの ' m ' 及び最適ラインの y 軸切片の ' b ' は、下記数学式 2 及び 3 によって計算することができる。

【 0 2 8 4 】

【 数 3 】

$$m = \frac{\sum_{i=S}^E (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=S}^E (x_i - \bar{x})^2}$$

数学式 2

【 数 4 】

$$b = \frac{\sum_{i=S}^E (y_i - mx_i)}{n}$$

数学式 3

(前記数学式 2 及び 3 において、

10

20

30

40

【数 5】

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=S}^E x_i}{n}, \quad \bar{y} = \frac{\sum_{i=S}^E y_i}{n}$$

であり、 m は、最適ラインの傾きであって、 b は、 y 軸切片であり、 x_i は、 i 番目サイクルのサイクル番号であって、 y_i は、 i 番目サイクルで測定された信号値であり、 S は、ベースライン領域のスタートポイントサイクルであって、 E は、ベースライン領域のエンドポイントサイクルであり、 n は、 $E - S + 1$ である。）

10

【0285】

段階(d)：補正されたデータセットの取得(S140)

補正されたデータセットは、生データセットの信号値から最適信号関数の値を差し引いて得られる。前記得られたデータセットは、(i)増幅反応の増幅信号値及び(ii)減算された結果を含む。

【0286】

本発明の一具現例によると、前記段階(a)は、第1増幅曲線を得るために、生データセットをプロットする段階をさらに含み、前記段階(d)は、補正された増幅曲線を得るために、補正されたデータセットをプロットする段階をさらに含む。

【0287】

20

補正された増幅曲線(第2増幅曲線)は、補正前の増幅曲線(第1増幅曲線)から最適ラインを差し引いて得ることができる。図5に示したように、生データセットの信号値から、最適ライン関数から計算された値を差し引いて、補正されたデータセット及び補正された増幅曲線を取得する。

【0288】

本発明の一具現例によると、生データセットの補正は、最適ライン関数で算出された値を、ベースライン領域だけでなく、ベースライン領域ではないその他の領域でも差し引くことを含む。例えば、すべてのサイクルに対して生データセットを得て、生データセットの信号値から最適ライン関数の値を差し引いて補正されたデータセットを求め、続いて前記補正されたデータセットをプロットし、補正された増幅曲線を得ることができる。または、ベースライン領域に属するサイクルの生データセットを得て、最適ライン関数及び補正されたデータセットを得て、他のサイクルに対しては、サイクルから信号発生の度に生データセットを得て、前記生データセットから最適ライン関数による該サイクルに対応する値を差し引いて、補正されたデータセットを得て、これをプロットし、補正された増幅曲線を得ることができる。

30

【0289】

III. 記録媒体、装置及びコンピュータプログラム

以下、記載された本発明の記録媒体、装置およびコンピュータプログラムは、本発明の方法をコンピュータで実行するためのものであるため、その共通する内容は、明細書の複雑性を避けるために省く。

40

【0290】

本発明の一様態によると、本発明は、以下の段階を含む、試料を分析する方法を実行させるためのプロセッサを具現する指示を含む、コンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供する；

(a) サイクルにおける信号値を提供するために、前記試料を使用する信号発生反応のそれぞれのサイクルにおける信号値を取得する段階と、

(b) それぞれのサイクルに閾値を適用し、複数の閾値をサイクルに適用する段階(前記サイクルの少なくとも二つのサイクルの閾値は、互いに異なっている)と、

(c) 閾値のそれぞれにより定められる閾値基準を満足する一つ以上のサイクルを確認する段階と、

50

(d) 前記段階(c)で確認されたサイクルを使用して試料を分析する段階。

【0291】

本発明の一具現例によると、前記信号発生反応は、試料内の分析物質の存在に依存的に信号を発生する。この際、前記分析物質は、標的核酸分子であり、前記信号発生反応は、標的核酸分子の増幅を伴うか、あるいは伴わない反応であって、前記標的核酸分子の増幅を伴う反応は、リアルタイムPCR(real-time polymerase chain reaction)である。

【0292】

本発明の一具現例によると、前記信号発生反応は、リアルタイムPCRであって、信号値は、前記リアルタイムPCRにより発生された信号値が数学的に変形された値であり、前記数学的に変形された値は、サイクルに対して信号値を微分した値である。

10

【0293】

本発明の一具現例によると、前記閾値は、閾値変化サイクル(threshold-change cycle、TCC)を基準に、前記TCC以前のサイクル及びこれらに適用される閾値の集合によって形成された関数と、前記TCC以後のサイクル及びこれらに適用される閾値の集合によって形成された関数とが互いに異なるように決定される。

【0294】

本発明の他の一様態によると、本発明は、以下の段階を含む、信号発生手段の存在下で行われた増幅反応から得た生データセット(raw data set)を補正する方法を実行させるためのプロセッサを具現する指示を含む、コンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供する；

20

(a)(i) 前記増幅反応における増幅サイクル及び(ii) 前記信号発生手段から得た前記増幅サイクルにおける信号値を含む生データセットを収得する段階と、

(b) 前記生データセットからベースラインスタートポイントサイクルとエンドポイントサイクルを決定して、ベースライン領域を決定する段階と、

(c) 前記決定されたベースライン領域内生データセットの二つ以上のデータポイントからベースライン領域の最適ライン関数を算出する段階と、

(d) 前記生データセットの信号値から前記ベースライン領域の最適ライン関数により計算された関数値を差し引き、補正されたデータセットを収得する段階(前記補正されたデータセットは、(i) 増幅反応の増幅サイクル及び(ii) 前記差し引いた結果を含む)。

30

【0295】

本発明の一具現例によると、前記段階(b)においてベースライン領域のエンドポイントサイクルは、以下の段階を含む方法により決定される；

(b1) それぞれの増幅サイクルにベースライン閾値を適用して、複数の閾値をサイクルに適用する段階(前記サイクルの少なくとも二つのサイクルのベースライン閾値は、互いに異なっている)、(b2) ベースライン閾値のそれぞれによって決定される閾値基準を満足する一つ以上のサイクルを確認する段階と、(b3) 前記段階(b2)で確認されたサイクルを使用してベースライン領域のエンドポイントサイクルを決定する段階。

【0296】

40

本発明の一具現例によると、前記段階(b1)の傾きは、特定サイクルにおけるデータポイント及び前記特定サイクルの以前および/または以後のサイクルの少なくとも一つのデータポイントを利用した最小二乗法によって計算することができる。

【0297】

本発明の一具現例によると、本発明は、以下の段階を含む、試料を分析する方法を実行するためのプロセッサを具現する、コンピュータ読み取り可能な記録媒体に格納されたコンピュータプログラムを提供する；

(a) サイクルにおける信号値を提供するために、前記試料を使用する信号発生反応のそれぞれのサイクルにおける信号値を収得する段階と、

(b) それぞれのサイクルに閾値を適用し、複数の閾値をサイクルに適用する段階(前

50

記サイクルの少なくとも二つのサイクルの閾値は、互いに異なっている」と、

(c) 閾値のそれぞれによって定められる閾値基準を満足する一つ以上のサイクルを確認する段階と、

(d) 前記段階(c)で確認されたサイクルを使用して試料を分析する段階。

【0298】

本発明の一具現例によると、前記信号発生反応は、試料内の分析物質の存在に依存的に信号を発生させ、前記の分析物質は、標的核酸分子であり、前記信号発生反応は、標的核酸分子の増幅を伴うかあるいは伴わない反応であって、前記標的核酸分子の増幅を伴う反応は、リアルタイムPCR(real-time polymerase chain reaction)である。

10

【0299】

本発明の一具現例によると、前記信号発生反応は、リアルタイムPCRであり、信号値は、前記リアルタイムPCRにより発生された信号値が数学的に変形された値であって、前記数学的に変形された値は、サイクルに対して信号値を微分した値である。

【0300】

本発明の一具現例によると、前記閾値は、閾値変化サイクル(threshold-changed cycle、TCC)を基準に、前記TCC以前のサイクル及びこれらに適用される閾値の集合によって形成された関数と、前記TCC以後のサイクル及びこれらに適用される閾値の集合によって形成された関数とが互いに異なるように決定される。

【0301】

20

本発明の他の一様態によると、本発明は、以下の段階を含む、信号発生手段の存在下で行われた増幅反応から得た生データセットを補正する方法を実行するためのプロセッサを具現する、コンピュータ読み取り可能な記録媒体に格納されたコンピュータプログラムを提供する；

(a) (i) 前記増幅反応における増幅サイクル及び(ii) 前記信号発生手段から得た前記増幅サイクルにおける信号値を含む生データセットを収得する段階と、

(b) 前記生データセットからベースラインスタートポイントサイクルとエンドポイントサイクルを決定して、ベースライン領域を決定する段階と、

(c) 前記決定されたベースライン領域内生データセットの二つ以上のデータポイントからベースライン領域の最適ライン関数を算出する段階と、

30

(d) 前記生データセットの信号値から前記ベースライン領域の最適ライン関数により計算された関数値を差し引き、補正されたデータセットを収得する段階(前記補正されたデータセットは、(i) 増幅反応の増幅サイクル及び(ii) 前記差し引いた結果を含む)。

【0302】

本発明の一具現例によると、前記信号発生手段の存在下で行われた増幅反応から得た生データセットを補正する方法を実行するためのプロセッサを具現する、コンピュータ読み取り可能な記録媒体に格納されたコンピュータプログラムを提供する。

【0303】

本発明の一具現例によると、前記段階(b)においてベースライン領域のエンドポイントサイクルは、以下の段階を含む方法により決定される；

40

(b1) それぞれの増幅サイクルにベースライン閾値を適用して、複数の閾値をサイクルに適用する段階(前記サイクルの少なくとも二つのサイクルのベースライン閾値は、互いに異なっている)、(b2) ベースライン閾値のそれぞれによって決定される閾値基準を満足する一つ以上のサイクルを確認する段階と、(b3) 前記段階(b2)で確認されたサイクルを使用してベースライン領域のエンドポイントサイクルを決定する段階。

【0304】

本発明の一具現例によると、前記段階(b1)の傾きは、特定サイクルにおけるデータポイント及び前記特定サイクルの以前および/または以後のサイクルの少なくとも一つの

50

データポイントを利用した最小二乗法によって計算することができる。

【0305】

前記プログラム指示は、プロセッサによって実行される場合、プロセッサが上述の本発明の方法を実行するように運営できる。試料分析方法を実行するためのプログラム指示は、サイクルにおける信号値を提供するために、前記試料を使用する信号発生反応のそれぞれのサイクルにおける信号値を収得する指示と、それぞれのサイクルに閾値を適用して、閾値のそれぞれによって決定される閾値基準を満足する一つ以上のサイクルを確認する指示と、前記確認されたサイクルを使用して試料を分析する指示とを含む。増幅反応から得られた生データセットを補正する方法を実行するためのプログラム指示は、生データセットを収得する指示と、前記生データセットから、ベースラインスタートポイントサイクルとエンドポイントサイクルを決定してベースライン領域を決定し、前記ベースライン領域の最適ライン関数を算出する指示と、前記生データセットの信号値から、前記ベースライン領域の最適ライン関数によって計算された関数値を差し引いて、補正されたデータセットを収得する指示とを含む。

10

【0306】

本発明の方法は、プロセッサで実行され、前記プロセッサは、スタンドアロンコンピュータ、ネットワーク付きコンピュータまたはリアルタイムPCR装置のようなデータ取得装置のプロセッサである。

【0307】

コンピュータ読み取り可能な記録媒体は、当業界に公知された様々な記憶媒体、例えば、CD-R、CD-ROM、DVD、フラッシュメモリ、フロッピー（登録商標）ディスク、ハードディスクドライブ、ポータブルHDD、USB、磁気テープ、MINIDISC、不揮発性のメモ리카ード、EEPROM、光学ディスク、光学記憶媒体、RAM、ROM、システムメモリ、およびウェブサーバーを含むが、これらに限定されるものではない。

20

【0308】

データポイント（例えば、信号強度及び増幅サイクル）は、多様な方式で収集することができる。たとえば、データポイントは、PCRデータ収集装置にあるプロセッサによって収集できる。データポイントは、収得され次第実時間でプロセッサに提供でき、または、メモリユニットまたはバッファに格納され、実験終了後、プロセッサに提供することができる。同様に、データセットは、前記収集装置とのネットワーク接続（例えば、LAN、VPN、インターネットおよびイントラネット）または直接接続（例えば、USBまたは他の直接有線接続または無線接続）によってデスクトップコンピュータシステムなどの別のシステムに提供でき、またはCD、DVD、フロッピー（登録商標）ディスクおよびポータブルHDDのようなポータブルメディア上に提供することができる。同様に、データセットは、ノートブックまたはデスクトップコンピュータシステムなどのクライアントにネットワーク接続（例えば、LAN、VPN、インターネット、イントラネットおよび無線通信ネットワーク）を介してサーバシステムに提供することができる。

30

【0309】

データポイントが受信されるか得られた後、試料を分析するか、増幅反応の補正されたデータセットを得るためのデータ分析プロセスが進行される。例えば、試料分析のためのプロセッサは、各閾値によって決定された閾値基準を満足する一つまたはそれ以上のサイクルを確認するために、受信されたデータポイントを分析する。増幅反応の補正されたデータセットを得るためのプロセッサは、ベースライン領域を決定し、ベースライン領域の最適ライン関数を算出して、生データセットの信号値から、最適ライン関数によって計算された関数値を差し引き、補正されたデータセットを収得するために、受信されたデータポイントを分析する。

40

【0310】

本発明を実行するためのプロセッサを具現する指示は、ロジックシステムに含まれる。前記指示は、たとえばポータブルHDD、USB、フロッピー（登録商標）ディスク、CD

50

及びDVDのようなソフトウェア記録媒体に提供できるが、メモリモジュール（例えば、ハードドライブ、またはローカルまたは付着RAMまたはROMのような他のメモリ）にダウンロード及び格納できる。本発明を実行するコンピュータコードは、C、C++、Java（登録商標）、Visual Basic、VBScript、JavaScript（登録商標）、Perl及びXMLのような多様なコーディング言語で実行できる。また、多様な言語及びプロトコルは、本発明によるデータと命令の外部及び内部記憶と伝達に利用できる。

【0311】

本発明のまた他の様態によると、本発明は、（a）コンピュータプロセッサ、および（b）前記コンピュータプロセッサにカップリングされた前記本発明のコンピュータ読み取り可能な記録媒体を含む、試料を分析する装置を提供する。

10

【0312】

本発明のまた他の様態によると、本発明は、（a）コンピュータプロセッサ、および（b）前記コンピュータプロセッサにカップリングされた前記本発明のコンピュータ読み取り可能な記録媒体を含む、信号発生手段の存在下で行われた増幅反応の生データセットを補正する装置を提供する。

【0313】

本発明の一具現例によると、前記装置は、試料及び信号発生手段を収容できる反応容器、前記反応容器の温度を調節する温度調節手段及び／または増幅サイクルにおける信号を検出する検出器をさらに含むことができる。

20

【0314】

本発明の一具現例によると、前記コンピュータのプロセッサは、サイクルにおける信号値を受信するだけでなく、試料を分析するか、増幅反応の補正されたデータセットを得る。

【0315】

前記プロセッサは、一つのプロセッサが下記二つのパフォーマンスを実行するように構築することができる：データポイントの受信及び試料の分析や補正されたデータセットを収得。

【0316】

または、プロセッサユニットは、二つのプロセッサが前記二つのパフォーマンスをそれぞれ実行するように構築することができる。

30

【0317】

本発明の一具現例によると、プロセッサは、標的分析物質（例えば、標的核酸分子）の検出に用いられる従来の装置（例えば、リアルタイムPCR装置）にソフトウェアをインストールして具現することができる。

【0318】

図6は、増幅反応の生データセットを補正するための本発明の一実施例に最適化されたリアルタイムPCRシステムを示している。前記システムは、リアルタイムPCR増幅を実行するためのリアルタイムPCR装置110、生データセットを補正し、補正された結果をディスプレイするために、ケーブル130を介して前記リアルタイムPCR装置110に連結されたロジックシステムのコンピュータシステム120を含む。前記コンピュータシステム120は、補正結果をユーザーのニーズに応じてグラフ、テーブル（表）及びワードなど、様々な形でディスプレイすることができる。前記コンピュータシステムは、増幅反応の増幅曲線を補正するための本発明の方法を実行するための、コンピュータ読み取り可能な記録媒体を含む。前記リアルタイムPCR装置110及び前記コンピュータシステム120は、システムに統合することができる。

40

【0319】

増幅曲線に関するデータポイント（例えば、信号強度及び増幅サイクル）は、多様な方法で収集できる。たとえば、データポイントは、リアルタイムPCR装置110のデータ収集装置内のプロセッサによって受信し収集することができる。データセットは、実時間

50

でプロセッサに提供されるか、またはメモリユニットまたはバッファに格納されて、実験終了後、プロセッサに提供される。

【0320】

同様に、データセットは、ネットワーク接続（例えば、LAN、VPN、インターネット及びイントラネット）または直接接続（例えば、USBまたは他の直接有線接続または無線接続）によって、またはCD、DVD、フロッピー（登録商標）ディスクおよびポータブルHDDのようなポータブルメディアを介して、リアルタイムPCR装置110からデスクトップコンピュータシステムのようなコンピュータシステム120に提供できる。同様に、データセットは、ノートブックまたはデスクトップコンピュータシステムのようなクライアントにネットワーク接続（例えば、LAN、VPN、インターネット、イントラネット、および無線通信ネットワーク）を介してサーバシステムに提供できる。

10

【0321】

データセットが受信されて得られた後、データ分析プロセッサは、補正された増幅曲線を反映するデータセットを準備する。

【0322】

増幅曲線の補正は、コンピュータシステム120にインストールされているアプリケーション（つまり、プログラム）によって実行できる。択一的に、増幅曲線の補正は、コンピュータシステム120の運営システムにおいて、前記アプリケーションが運営できるコンピュータシステム120にアプリケーションストアサーバまたはアプリケーションプロバイダサーバを介して直接インストールされたアプリケーションによって作られる。前記運営システムは、Window、Macintoshおよびスマートフォンや、タブレットPCのようなモバイル端末にインストールされるiOS及びアンドロイドのようなモバイル運営システムを含む。

20

【0323】

上述のように、本発明の増幅曲線補正方法は、供給者がインストールした、またはユーザーが直接インストールしたアプリケーション（即ち、プログラム）によってコンピュータシステム120に具現でき、コンピュータ読み取り可能な記録媒体122に記録される。

【0324】

本発明の増幅曲線を補正するための方法が具現されたコンピュータプログラム124は、前記補正のためのすべての機能を具現することができる。前記コンピュータプログラム124は、本発明の方法を実行するように具現されたコンピュータ読み取り可能な記録媒体に格納されたプログラム指示を含めたプログラムである。

30

【0325】

コンピュータプログラム124は、C、C++、JAVA（登録商標）、Visual basic、VBScript、JavaScript（登録商標）、Perl、XML及び機械語などの適切なコンピュータ言語を使用してコードすることができる。前記プログラムコードは、前記言及された数学的関数に対する関数コード及びコンピュータシステム120のプロセッサによって順番にプロセスを移行するための制御コードを含む。

【0326】

前記コードは、プロセッサによって、上述した機能の移行に必要な追加情報またはメディアが、コンピュータシステム120の内蔵または外付けメモリのどの位置（アドレス）で参照されるかに対するメモリ参照コードをさらに含む。

40

【0327】

コンピュータシステム120がプロセッサの機能の実行のために、他のコンピュータまたはサーバとリモートで通信が必要な場合、前記コードは、プロセッサがどのように通信モジュール（例えば、有線および/または無線通信モジュール）を使用して他のコンピュータまたはサーバとリモートで通信するか、または通信時、どのような情報またはメディアを伝達するかに対する通信関連コードをさらに含むことができる。

【0328】

50

本発明の具現のための機能的プログラム及びコード（コードセグメント）は、コンピュータが読み取るストレージメディア及び実行プログラムなど、システム環境を考慮して、当業界のプログラマによって容易に推論または修正できる。

【0329】

記録媒体122が配布されて、コンピュータで読み取り可能なコードが記憶されて、配布形式で実行される。このような場合、複数の配布されたコンピュータのうち、少なくとも一つのコンピュータに、前記記録媒体122は、ネットワークで接続されたコンピュータシステムに分散でき、噴射方式で、コンピュータ読み取り可能なコードが保存されて、実行できる。このような場合、複数の分散されたコンピュータのうち、少なくとも一つのコンピュータは、前記機能の一部を実行して、その実行結果を少なくとも一つのコンピュータに伝達し、結果が伝達されたコンピュータも前記機能の一部を実行して、その結果を少なくとも一つの他のコンピュータに提供する。

10

【0330】

本発明の実行のためのアプリケーション（つまり、プログラム）の記録された記録媒体122は、アプリケーションストアサーバーまたはアプリケーションプロバイダサーバーに含まれた記録媒体（例えば、ハードディスク）、またはアプリケーションプロバイダサーバーそのものであるか、プログラムを記録した別のコンピュータ及びその記録媒体でありえる。

【0331】

記録媒体122を読み取り可能なコンピュータシステム120は、一般的なデスクトップやノート型パソコンなどの一般PCだけではなく、スマートフォン、タブレットPC、PCA（Personal Digital Assistants）及び移動通信端末などのモバイル端末を含み、コンピューティング可能なあらゆるデバイスを含む。

20

【0332】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳細に説明するが、これら実施例は、本発明をより具体的に説明するためのものであって、本発明の範囲がこれら実施例に限定されないことは、本発明の属する技術分野で通常の知識を有する者にとっては自明なことであろう。

【実施例】

【0333】

実施例1：増幅曲線の補正

30

図6に示されたリアルタイムPCRシステムを使用して、増幅曲線の傾き曲線及びベースライン閾値から得たベースライン領域の最適ラインによって増幅曲線を補正することができるかを確認した。

【0334】

生データセット（補正前の増幅曲線）の取得（S110）

アップストリームプライマーとダウンストリームプライマーの伸長およびTaqManプローブの切断のために、5'ヌクレアーゼ活性を有するTaq DNA重合酵素を使用した。Neisseria gonorrhoeae（NG）のゲノムDNAを標的核酸配列として使用した。

【0335】

40

NGの検出のために、TaqManリアルタイムPCRを使用した。標的核酸が存在すると、TaqManプローブが切断されて、標識された断片（fragment）が放出される。増幅曲線は、標識された断片からの信号を測定して得られる。

【0336】

NGに対するTaqManプローブは、5'末端に蛍光レポーター分子（Cal Fluor Red 610）を標識して、3'末端にクエンチャー分子（BHQ-2）を標識した（配列番号：3）。

【0337】

本実施例で使用されてアップストリームプライマー、ダウンストリームプライマー、およびプローブの配列は、以下の通りである：

50

NG - F 5' - T A C G C C T G C T A C T T T C A C G C T I I I I I G T A A T
C A G A T G - 3' (配列番号: 1)

NG - R 5' - C A A T G G A T C G G T A T C A C T C G C I I I I I C G A G C
A A G A A C - 3' (配列番号: 2)

NG - P 5' - [C a l F l u o r R e d 6 1 0] T G C C C C T C A T T G
G C G T G T T T C G [B H Q - 2] - 3' (配列番号: 3)

(I : D e o x y i n o s i n e、B H Q - 2 : B l a c k h o l e q u e n c h
e r - 2)

【0338】

リアルタイムPCRは、標的核酸(10 pg、1 pg、100 fg、10 fg、または1 fgのNGゲノムDNA)、NG標的増幅のための5 pmoleのアップストリームプライマー(配列番号: 1)と5 pmoleのダウンストリームプライマー(配列番号: 2)、3 pmoleのTaqManプロブ(配列番号: 3)、および5 µlの4×マスターミックス(Master Mix)[最終、200 µM dNTPs、2 mM MgCl₂、2 UのTaq DNA重合酵素]を含む最終的な容量20 µlの反応混合液で行った。前記反応混合液を含むチューブをリアルタイムPCR装置(CFX96TM、Bio-Rad)で、50℃で5分間放置して、次いで95℃で15分間変性させた後、95℃で30秒間、60℃で60秒間および72℃で30秒間行われるサイクルを50回繰り返し続けた。信号検出は、各サイクルごとに60℃で行った。

【0339】

生データセットは、リアルタイムPCR増幅によって得て、補正前の増幅曲線は、生データセットを使用してプロットした(図2参照)。

【0340】

補正前の増幅曲線は、以下のように補正した。

【0341】

ベースライン領域の決定(S120)

増幅反応の3番目のサイクルをベースライン領域のスタートポイントサイクル(5)に設定した。

【0342】

ベースライン領域のエンドポイントサイクル(E)を決定するために、数学式1で表される最小二乗法(Least Square Method)を使用した線形回帰分析(Linear Regression Analysis、LRA)を生データに対して行い、傾き曲線を得た。この際、i番目のサイクルにおける傾き値を算出するために、i-1、i、i+1の3つのサイクルに対応するデータを使用した(つまり、a=1及びb=1)。

【0343】

傾き曲線でピークが生成される前の初期サイクルにおける背景信号(Background signal)と交差しないように、ベースライン閾値(Baseline threshold)を'20'に設定した。ベースライン閾値と傾き曲線との最初のクロスポイント(cross-point、CP)のサイクルをエンドポイントサイクル(E)に決定して、最終的にベースライン領域を決定した(図3参照)。

【0344】

ベースライン領域の最適ライン関数の算出(S130)

前記決定されたベースライン領域のスタートポイントサイクル(S)からエンドポイントサイクル(E)まで各サイクルのデータを利用し、最小二乗法により回帰直線の1次線形方程式形態の最適ライン関数を算出した(図4A参照)。

【0345】

算出される線形回帰線1次線形方程式の一般式は、'y = mx + b'であり、ここで傾きを示す'm'は、上述の数学式2によって算出し、y軸切片を示す'b'は、上述の数学式3によって算出した。その結果、算出された線形回帰線の1次線形方程式形態の最適

10

20

30

40

50

ライン関数は、 $y = 2.512x + 2396.4$ である。

【0346】

補正されたデータセット（補正された増幅曲線）の取得（S140）

補正前の増幅曲線全体1～50サイクルから前記算出した最適ライン関数値を差し引いて、補正されたデータセットを取得し、補正された増幅曲線を得するために、前記補正されたデータセットをプロット（plotting）した。

【0347】

図4Bは、図2のベースライン領域の生データセットの各サイクルのデータ（測定された信号値）からベースライン領域の最適ライン関数によるデータ（関数値）を差し引いて得られた、補正されたデータセットを示す。

10

【0348】

図5は、前記補正されたデータセットをプロットして得られた、補正された増幅曲線を示す。

【0349】

本発明の方法は、単純なアルゴリズムを使用して増幅曲線の補正を行うことができるため、本発明は、測定された試料及び測定機器に対する特定条件をさらに簡単な方法で最適化することが可能である。

【0350】

実施例：増幅曲線の補正（II）

リアルタイム重合酵素連鎖反応を行って得られた増幅曲線を補正するためのベースライン領域決定における誤りを除去することができるかどうか確認した。

20

【0351】

アップストリームプライマーとダウンストリームプライマーの伸長およびTaqManプローブの切断のために、5'ヌクレアーゼ活性を有するTaq DNA重合酵素を使用した。インフルエンザAウイルス（Flu A）のゲノムDNAを標的核酸配列として使用した。

【0352】

TaqManリアルタイムPCRを使用してFlu Aを検出した。標的核酸が存在すると、TaqManプローブが切断されて、標識された断片が放出される。増幅曲線は、標識された断片からの信号を測定して得ることができる。

30

【0353】

Flu Aに対するTaqManプローブは、5'末端に蛍光レポーター分子（FAM）を標識して、3'末端にクエンチャー分子（BHQ-1）を標識した（配列番号：6）。

【0354】

本実施例で使用されたアップストリームプライマー、ダウンストリームプライマー、およびプローブの配列は、以下の通りである：

Flu A - F 5' - TGG AATGGCTAAAGACAAGACCIIIIITGTCACCTCT - 3'（配列番号：4）

Flu A - R 5' - CATCCTGTTGTATATGAGGCCCATIIIICTGGCAAG - 3'（配列番号：5）

40

Flu A - P 5' - [FAM]CTCACTGGGCAACGGTGAGCGTGABHQ-1] - 3'（配列番号：6）

（I：Deoxyinosine、BHQ-1：Black hole quencher-1）

【0355】

リアルタイムPCRは、標的核酸（抽出したFlu AゲノムRNAの 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、または 10^{-6} 希釈）、Flu A標的増幅のための5 pmoleのアップストリームプライマー（配列番号：4）及び5 pmoleのダウンストリームプライマー（配列番号：5）、3 pmoleのTaqManプローブ（配列番号：6）、及び5

50

μl の5×RT-PCR緩衝液[75mM Tris-HCl (pH 8.3)、50mM KCl、2.5mM MgCl_2 、0.2mM dNTP]及び2 μl の酵素混合物[最終、3.5UのTaq DNA重合酵素、25UのMMLV逆転写酵素、5UのRNase抑制剤]を含む最終容量25 μl の反応混合液で行った。前記反応混合液を含むチューブをリアルタイムPCR装置(CFX96TM、Bio-Rad)で、50℃で20分間放置し、次いで95℃で15分間変性させた後、95℃で10秒間、60℃で60秒間および72℃で10秒間行われるサイクルを45回繰り返した。信号検出は、各サイクルごとに60℃で行った。

【0356】

ベースライン領域の決定段階(S120)での誤りの確認

10

ベースライン領域のエンドポイントサイクル(E)は、増幅反応で、実際標的信号強度の増加が始まるサイクルまたはこのサイクルに近接したサイクルに決定することができる。

【0357】

ベースライン領域のエンドポイントサイクルは、各サイクルで計算される傾き及び各サイクルにおける閾値を全部考慮して決定することができる。この場合、ベースライン閾値は、実施例1のように、すべての増幅サイクルに対して適用することができる。しかし、このような接近法は、ベースライン領域を決定する際、誤りを発生させるおそれがある(図7参照)。

【0358】

20

例えば、ベースライン閾値を‘30’のように低く設定する場合、実際標的信号強度が増加し始めるポイントではなく、初期ノイズ信号が発生したポイントがベースライン領域のエンドポイントサイクルに決定されることがあって、ベースライン領域決定誤りが発生する可能性がある。一方、このような誤りを回避するために、ベースライン閾値を‘300’のように高く設定すると、低濃度の標的配列を含む試料(すなわち、傾き値が低い試料)からは、実際標的信号強度が増加し始めるポイントが検出されず、これも同様にベースライン領域決定に誤りが発生するおそれがある。

【0359】

このように、ベースライン領域決定誤りにより、正確な実際増幅産物の量が反映されていない、補正された増幅曲線が得られる可能性がある。

30

【0360】

MBE C方法によるエンドポイントのサイクルの決定

増幅反応の3番目のサイクルをベースライン領域のスタートポイントサイクル(S)に設定した。

【0361】

図8A及び図8Bに示すように、傾き曲線でエンドポイントサイクルは、最小ベースラインエンドポイントサイクル(minimum baseline end-point cycle、MBE C)以後のサイクルに決定できる。実施例2において、10番目のサイクルがMBE Cに決定された。

【0362】

40

図8A(高濃度試料)及び図8B(低濃度試料)で示されたように、MBE Cを適用しないと、エンドポイントサイクルがベースライン閾値と傾き曲線間の最初のクロスポイント(CP₁)のサイクルに指定されて、ベースライン領域(B₁)は、3~7サイクル領域(高濃度試料)または3~4サイクル領域(低濃度試料)に決定される。一方、MBE Cを適用すると、MBE Cを超える領域における最初のクロスポイント(CP₂)のサイクルがエンドポイントサイクルに指定されて、ベースライン領域(B₂)は、3~29サイクル領域(高濃度試料)または3~38サイクル領域(低濃度試料)に決定される。

【0363】

図8Cに示されたように、ベースライン閾値を‘30’に決定して、MBE Cを適用しないと、補正された増幅曲線から増幅産物の量を不正確に反映するか、偽陰性結果と解釈

50

される。しかし、ベースライン閾値を「30」に決定して、M B E Cを適用すると、補正された増幅曲線は、増幅産物の量を正確に反映するようになる。

【0364】

このように、増幅反応の初期サイクルで頻繁に発見されるノイズ信号により、このような初期ノイズ信号が発生するポイントがベースライン領域のエンドポイントサイクルに誤って決定されることがあり、ベースライン決定誤りが発生する。

【0365】

前記結果によって、ベースライン領域の決定(S120)誤りは、本発明の方法により成功的に除去できることを確認した。

【0366】

V B T (V a r i a b l e B a s e l i n e T h r e s h o l d) 方法によるエンドポイントサイクルの決定

実施例2で使用したV B T (可変ベースライン閾値)方法は、ベースライン閾値 - 変化サイクル(baseline threshold - changed cycle、B T C C)を決定し、互いに異なるベースライン閾値を前記B T C C前と後のサイクルにそれぞれ適用する方式で行う。

【0367】

B T C Cを20サイクルに決定し、第1のB T (ベースライン閾値)を1~20サイクルに適用し、第2のB Tを21~45サイクルにそれぞれ相異に適用した。第1のB Tは「300」に決定し、第2のB Tは「30」に決定した。

【0368】

図10A(高濃度試料)及び図10B(低濃度試料)に示されたように、V B Tを適用せずに、固定ベースライン閾値を「30」にして、全てのサイクルに適用したとき、高濃度試料の場合、エンドポイントサイクル(E_1)は、7サイクルに決定されるか、または低濃度試料の場合、エンドポイントサイクル(E_1)は、4サイクルに決定された。

【0369】

増幅反応の3番目のサイクルをベースライン領域のスタートポイントサイクル(S)に決定すると、ベースライン領域(B_1)は、3~7サイクル領域(高濃度試料)または3~4サイクル領域(低濃度試料)に決定された。一方、V B Tを適用すると、エンドポイントサイクル(E_1)は、高濃度試料の場合、29サイクルに決定されるか、または低濃度試料の場合、38サイクルに決定された。したがって、ベースライン領域(B_2)は、3~29サイクル(高濃度試料)または3~38サイクル(低濃度試料)に決定された。

【0370】

図10Cに示されたように、V B Tを適用しなかった場合、補正された増幅曲線は、増幅産物の量を不正確に反映するか、偽陰性結果を示した。しかし、V B Tを適用したとき、補正された増幅曲線は、増幅産物の量を正確に反映し、偽陰性結果は表れなかった。

【0371】

したがって、前記結果によると、可変的なベースライン閾値を異なって設定するV B T方法を通じて、初期増幅サイクルで初期ノイズ信号を発生させるポイントをベースライン領域のエンドポイントサイクル(E)に誤って設定する誤りを除去することができることを確認した。また、V B T方法は、増幅サイクルの後半部において、信号増加が始まるポイントをより正確に決定することができ、ベースライン領域の決定(S120)誤りを除去することができた。

【0372】

実施例2の結果によると、ベースライン領域は、初期サイクルにおける背景信号の干渉無しに決定できることを確認した。

【0373】

上述のように、本発明は、ベースライン領域決定誤りを除去して増幅曲線を補正することにより、より信頼性の高い正確な方式で増幅曲線を分析することができる。

【0374】

10

20

30

40

50

実施例 3：正確な C t 値決定による標的核酸の検出及び定量

増幅曲線から C t 値を決定する段階における誤りを除去することができるかどうかを確認した。

【0375】

アップストリームプライマーとダウンストリームプライマーの伸長および T a q M a n プローブの切断のために、5'ヌクレアーゼ活性を有する T a q DNA 重合酵素を使用した。インフルエンザ A ウイルス (F l u A) のゲノム DNA を標的核酸配列として使用した。

【0376】

F l u A 検出のために、T a q M a n リアルタイム PCR を使用した。標的核酸が存在すると、T a q M a n プローブが切断されて、標識された断片が放出される。増幅曲線は、標識された断片からの信号を測定して得ることができる。

【0377】

F l u A に対する T a q M a n プローブは、5'末端に蛍光レポーター分子 (F A M) を標識して、3'末端にクエンチャー分子 (B H Q - 1) を標識した (配列番号：6)。

【0378】

本実施例で使用されてアップストリームプライマー、ダウンストリームプライマー、およびプローブの配列は、以下の通りである：

F l u A - F 5' - T G G A A T G G C T A A A G A C A A G A C C I I I I I T G T C A C C T C T - 3' (配列番号：4)

F l u A - R 5' - C A T C C T G T T G T A T A T G A G G C C C A T I I I I C T G G C A A G - 3' (配列番号：5)

F l u A - P 5' - [F A M] C T C A C T G G G C A C G G T G A G C G T G A [B H Q - 1] - 3' (配列番号：6)

(I : D e o x y i n o s i n e 、 B H Q - 1 : B l a c k h o l e q u e n c h e r - 1)

【0379】

リアルタイム PCR は、標的核酸 (抽出した F l u A ゲノム RNA の 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、または 10^{-7} 希釈)、F l u A 標的増幅のための 5 p m o l e のアップストリームプライマー (配列番号：4) 及び 5 p m o l e のダウンストリームプライマー (配列番号：5)、3 p m o l e の T a q M a n プローブ (配列番号：6)、及び 5 μ l の 5 \times R T - P C R 緩衝液 [75 m M T r i s - H C l (p H 8 . 3) 、 50 m M K C l 、 2 . 5 m M M g C l ₂ 、 0 . 2 m M d N T P] 及び 2 μ l の酵素混合物 [最終、3 . 5 U の T a q DNA 重合酵素、25 U の M M L V 逆転写酵素、5 U の R N a s e 抑制剤] を含む最終容量 25 μ l の反応混合液で行った。前記反応混合液を含むチューブをリアルタイム PCR 装置 (C F X 96 ^T M 、 B i o - R a d) で、50 で 20 分間放置し、次いで 95 で 15 分間変性させた後、95 で 10 秒間、60 で 60 秒間および 72 で 10 秒間行われるサイクルを 45 回繰り返した。信号検出は、各サイクルごとに 60 で行った。

【0380】

C t 値決定誤りの確認

増幅曲線から標的核酸の正確な量を得るための伝統的なサイクル閾値 (C t) 方法は、信号閾値を使用する。C t 値は、蛍光反応が背景信号水準以上に増加して、あらかじめ決定された信号閾値と交差する、増幅曲線の指数期内のポイントに基づいて決定される。このような場合、固定信号閾値 (f i x e d s i g n a l t h r e s h o l d 、 F S T) の使用は、C t 値の決定に誤りを発生させるおそれがある。

【0381】

図 11 A は、抽出した F l u A ゲノム RNA の希釈 (10^{-3}) から得た、補正された増幅曲線を示す。

【0382】

図11Aに示されたように、FST値が‘200’RFUのように低い値に決定されると、実際標的信号が指数的に増加するポイントではなく、初期ノイズ信号を発生させるポイントがCt値に決定されることがあり、これによって、標的核酸濃度の決定における誤りが発生するようになる。

【0383】

図11Bは、抽出されたFlu AゲノムRNAの希釈($10^{-7} \sim 10^{-3}$)から得た、補正された増幅曲線を示す。図11Bに示されたように、FST値が‘500’RFUのように高い値に決定されると、低い濃度の標的配列を含む試料は、実際標的核酸の量より少ない量に決定されることがある。

10

【0384】

このように、固定信号閾値を設定する伝統的なCt方法は、標的核酸の濃度決定における誤りを除去することができないことを確認した。

【0385】

VST(Variable Signal Threshold)方法によるCt値の決定

実施例3で使用したVST(可変信号閾値)方法は、信号閾値 - 変化サイクル(signal threshold-changed cycle、STCC)を決定し、互いに異なる信号ベースライン閾値を、前記STCC前及び後のサイクルにそれぞれ適用する方式で行う。

20

【0386】

図11Aにおいて、STCCを10サイクルに決定し、第1のST(信号閾値)を1~10サイクルに、第2のSTを11~45サイクルにそれぞれ相異に適用した。図11B及び図11Cにおいて、STCCを38サイクルに決定し、第1のST(信号閾値)を1~38サイクルに適用して、第2のSTを39~45サイクルにそれぞれ相異に適用した。前記第1のSTは、‘500’RFUに決定し、第2のSTは、‘200’RFUにそれぞれ決定した。

【0387】

図11Aに示されたように、FSTを‘200’RFUで適用したとき、FSTと増幅曲線間の最初のクロスポイント(CP₁)におけるCt値は、1.24に決定された。一方、VSTを適用したとき、VSTに対する最初のクロスポイント(CP₂)におけるCt値は、32.02に決定された。

30

【0388】

図11B及び図11Cに示されたように、標的核酸の存在または不存在を区分するカット - オフ値は、Ct < 40に設定した。FSTを‘500’RFUに設定して適用したとき、 10^{-6} 希釈されたRNAの結果は、Ct 43.41を示したが、この値は、標的核酸の量を不正確に反映したものである。

【0389】

また、標的核酸の存在または不存在を区分するカット - オフ値がCt < 40に設定されたため、Ct 43.41は、標的核酸の不存在を示すが、これは、偽陰性結果に当たる。VSTを適用する場合、 10^{-6} 希釈されたRNAの結果は、Ct 39.82を示すが、これは、標的核酸の量を正確に反映したものであって、陽性の結果を示す。

40

【0390】

したがって、可変的な信号閾値を互いに異なるように設定するVST方法は、初期増幅曲線における初期ノイズ信号を発生させるポイントをCt値として誤って解釈する誤りを除去することができる。また、VST方法は、Ct値をより正確に決定することができる。標的核酸の濃度決定誤りを除去することができる。

【0391】

上述のように、本発明は、適切な信号閾値の設定を通じて、正確なCt値を決定することにより、さらに信頼性の高い正確な方式で標的核酸を検出して、定量することができる

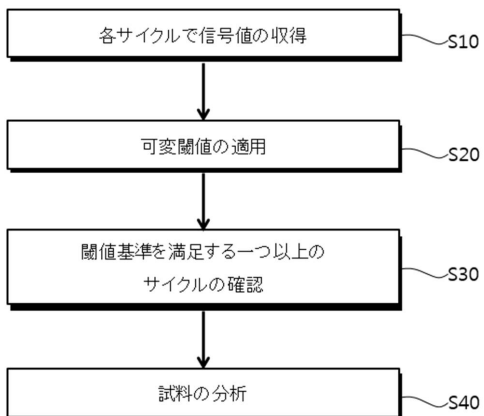
50

。

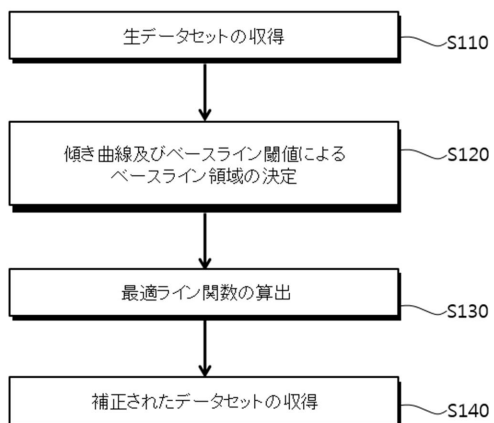
【 0 3 9 2 】

以上、本発明の特定な部分を詳細に記述したが、当業界の通常の知識を有する者にとっては、このような具体的な記述はただ望ましい具現例に過ぎなく、これに本発明の範囲が限定されないことは明らかである。従って、本発明の実質的な範囲は、添付の請求項とその等価物により定義されると言える。

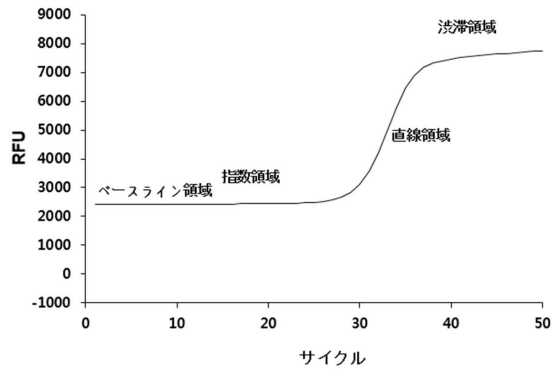
【 図 1 A 】

10

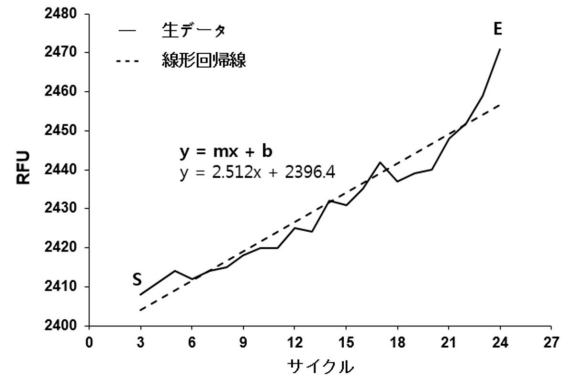
【 図 1 B 】

100

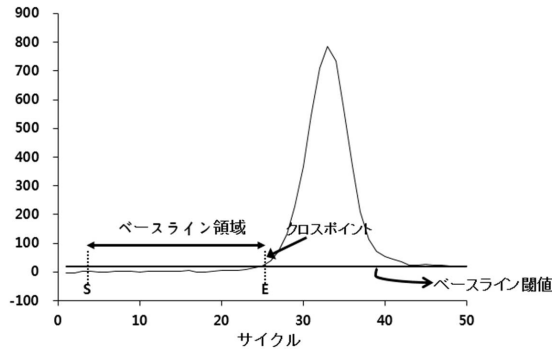
【図 2】



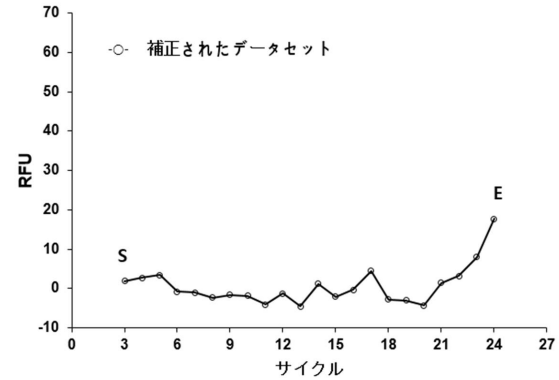
【図 4 A】



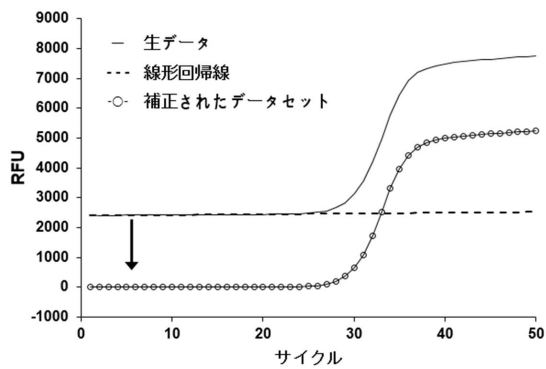
【図 3】



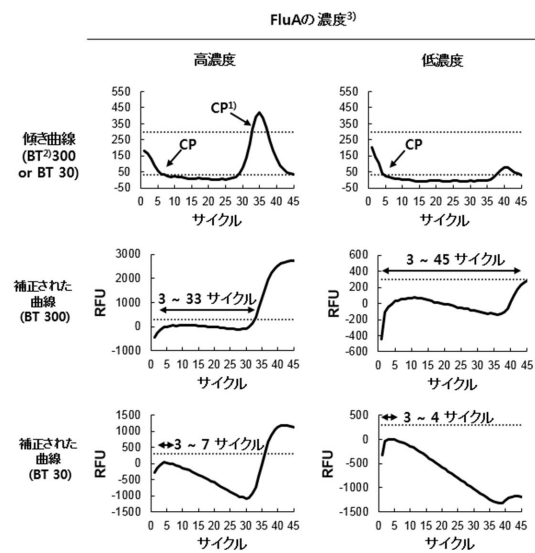
【図 4 B】



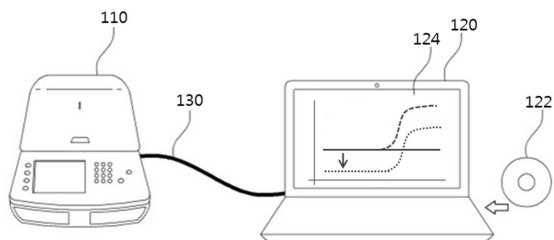
【図 5】



【図 7】

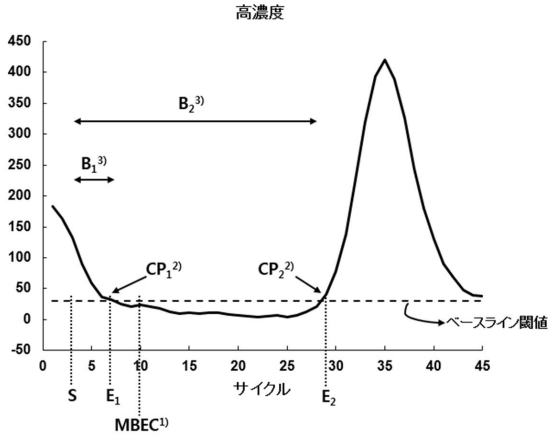


【図 6】



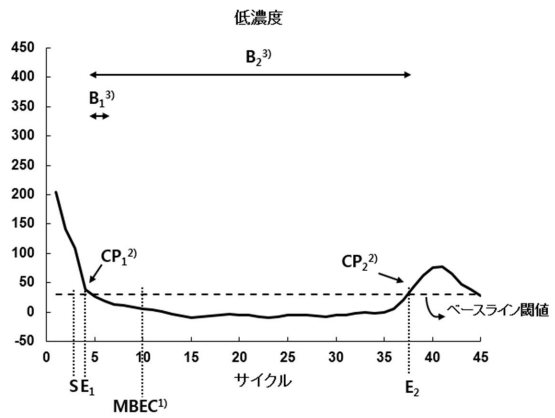
- 1) CPは、傾き曲線及びベースライン閾値間の最初のクロスポイントを示す。
- 2) BT(ベースライン閾値)は、ベースライン領域のエンドポイントサイクルを決定するために使用される。
- 3) 鋳型は、ヒトインフルエンザAウイルス(Flu A)のゲノムRNAである。

【図 8 A】



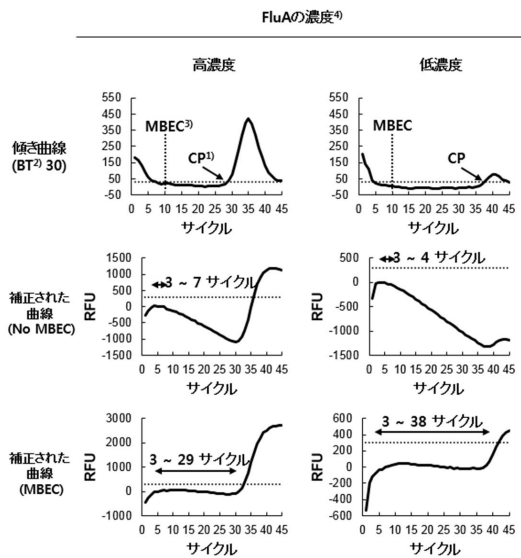
- 1) MBECは、最小ベースラインエンドポイントサイクルを示す。
 2) CP₁ は、MBECが適用されない場合、傾き曲線及びベースライン閾値間の最初のクロスポイントを示す。CP₂ は、MBECが適用される場合、傾き曲線及びベースライン閾値間の最初のクロスポイントを示す。
 3) B₁ は、MBECが適用されない場合、スタートポイントサイクル(S)からエンドポイントサイクル(E₁)までのベースライン領域を示す。B₂ は、MBECが適用される場合、スタートポイントサイクル(S)からエンドポイントサイクル(E₂)までのベースライン領域を示す。

【図 8 B】



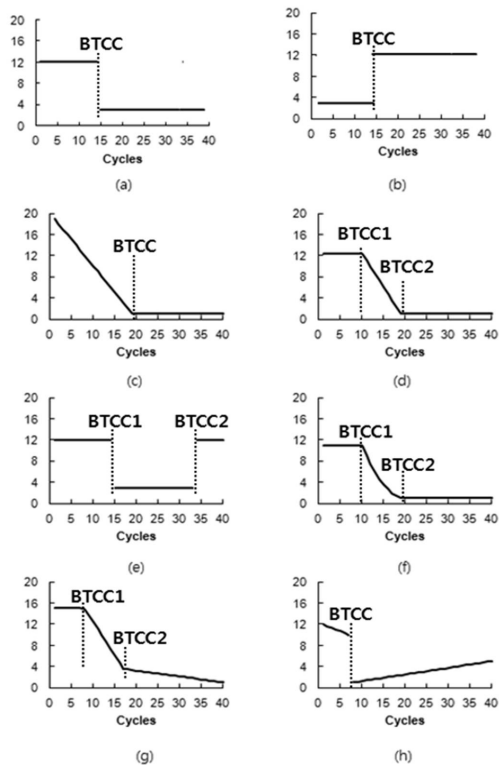
- 1) MBECは、最小ベースラインエンドポイントサイクルを示す。
 2) CP₁ は、MBECが適用されない場合、傾き曲線及びベースライン閾値間の最初のクロスポイントを示す。CP₂ は、MBECが適用される場合、傾き曲線及びベースライン閾値間の最初のクロスポイントを示す。
 3) B₁ は、MBECが適用されない場合、スタートポイントサイクル(S)からエンドポイントサイクル(E₁)までのベースライン領域を示す。B₂ は、MBECが適用される場合、スタートポイントサイクル(S)からエンドポイントサイクル(E₂)までのベースライン領域を示す。

【図 8 C】

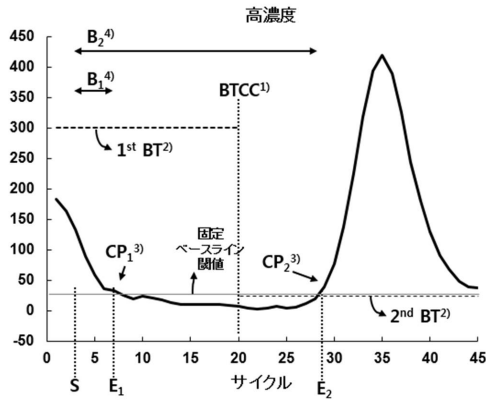


- 1) MBECが適用される場合、傾き曲線及びベースライン閾値間の最初のクロスポイントを示す。
 2) BT (ベースライン閾値)は、ベースライン領域のエンドポイントサイクルを決定するために使用される。
 3) MBECは、最小ベースラインエンドポイントサイクルを示す。
 4) 病原体は、ヒトインフルエンザAウイルス(Flu A)のゲノムRNAである。

【図 9】

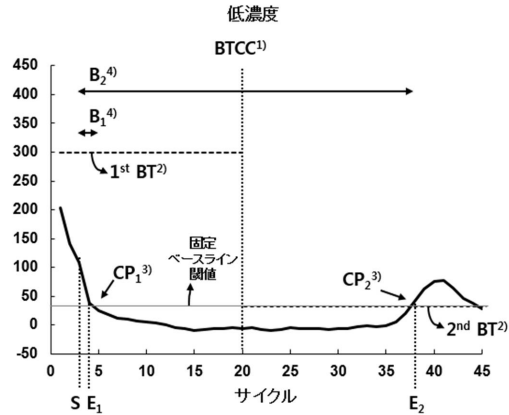


【図 10 A】



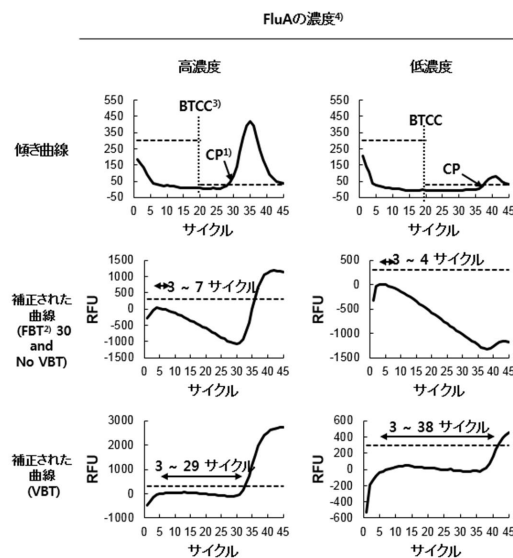
- 1) BTCC は、ベースライン閾値変化サイクルを示す。
- 2) 1st BT は、BTCC 以前のサイクルにおけるベースライン閾値(BT)を示し、2nd BT は、BTCC 以後のサイクルにおけるベースライン閾値(BT)を示す。
- 3) CP₁ は、VBT が適用されない場合、横き曲線及びベースライン閾値間の最初のクロスポイントを示す。CP₂ は、VBT が適用される場合、横き曲線及び第1BT及び第2BT間の最初のクロスポイントを示す。
- 4) B₂ は、VBT が適用されない場合、スタートポイントサイクル(S)からエンドポイントサイクル(E₂)までのベースライン領域を示す。B₂ は、VBT が適用される場合、スタートポイントサイクル(S)からエンドポイントサイクル(E₂)までのベースライン領域を示す。

【図 10 B】



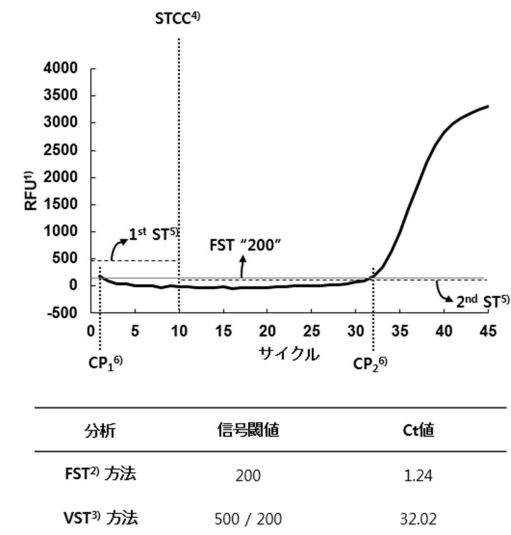
- 1) BTCC は、ベースライン閾値変化サイクルを示す。
- 2) 1st BT は、BTCC 以前のサイクルにおけるベースライン閾値(BT)を示し、2nd BT は、BTCC 以後のサイクルにおけるベースライン閾値(BT)を示す。
- 3) CP₁ は、VBT が適用されない場合、横き曲線及びベースライン閾値間の最初のクロスポイントを示す。CP₂ は、VBT が適用される場合、横き曲線及び第1BT及び第2BT間の最初のクロスポイントを示す。
- 4) B₂ は、VBT が適用されない場合、スタートポイントサイクル(S)からエンドポイントサイクル(E₂)までのベースライン領域を示す。B₂ は、VBT が適用される場合、スタートポイントサイクル(S)からエンドポイントサイクル(E₂)までのベースライン領域を示す。

【図 10 C】



- 1) CP1 は、傾き曲線及びベースライン閾値間の最初のクロスポイントを示す。
- 2) FBT は、固定ベースライン閾値を示す。
- 3) BTCC は、ベースライン閾値変化サイクルを示す。
- 4) 鋳型は、ヒトインフルエンザAウイルス(Flu A)のゲノムRNAである。

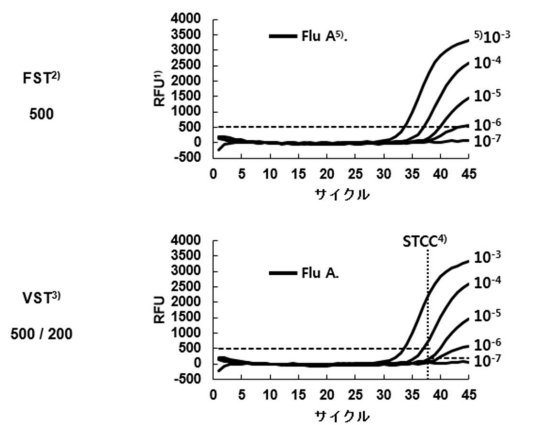
【図 11 A】



分析	信号閾値	Ct値
FST ²⁾ 方法	200	1.24
VST ³⁾ 方法	500 / 200	32.02

- 1) RFU は、相対蛍光単位を示す。
- 2) FST は、固定信号閾値を示す。
- 3) VST は、可変信号閾値を示す。
- 4) STCC は、信号閾値変化サイクルを示す。
- 5) 1st ST は、STCC 以前のサイクルにおけるST(信号閾値)を示し、2nd ST は、STCC 以後のサイクルにおけるST(信号閾値)を示す。
- 6) CP₁ は、RFU曲線及びFST間の最初のクロスポイントを示し、CP₂ は、RFU曲線及びVST間の最初のクロスポイントを示す。

【図 1 1 B】



- 1) RFUは、相対蛍光単位を示す。
- 2) FSTは、固定信号閾値を示す。
- 3) VSTは、可変信号閾値を示す。
- 4) STCCは、信号閾値変化サイクルを示す。
- 5) 鑄型は、ヒトインフルエンザAウイルス(Flu A)のゲノムRNAを順に希釈したものである。

【図 1 1 C】

希釈された RNA ⁴⁾	Ct 値			Flu A結果	
	FST ²⁾ 500	VST ³⁾ 500/200	カットオフ値 ¹⁾	FST 500	VST 500/200
10^{-3}	33.56	33.56		陽性	陽性
10^{-4}	37.01	37.01		陽性	陽性
10^{-5}	39.93	38.21	< 40.00	陽性	陽性
10^{-6}	43.41	39.82		陰性	陽性
10^{-7}	N/A	N/A		陰性	陰性

- 1) カット オフ値によりFlu Aの存在または不存在を区別する。。
- 2) FSTは、固定信号閾値を示す。
- 3) VSTは、可変信号閾値を示す。
- 4) 鑄型は、ヒトインフルエンザAウイルス(Flu A)のゲノムRNAを順に希釈したものである。

【配列表】

0006602374000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 10-2015-0051080

(32)優先日 平成27年4月10日(2015.4.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)

(72)発明者 ジョン ユーン・チュン

大韓民国 06075 ソウル カンナム - グ ヨンドン - デロ 142ギル 21 チョンドム
マークヒルズ 1チャ ルーム 1901

(72)発明者 ヨン チョ・リ

大韓民国 05507 ソウル ソンパ - グ オリンピック - ロ 435 パーク リオ アパー
ト 115 - 1301

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 米国特許出願公開第2012/0231458(US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00 - 15/90

G16B 25/20

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)