



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02821239.8

[43] 公开日 2005 年 2 月 2 日

[11] 公开号 CN 1575342A

[22] 申请日 2002.8.24 [21] 申请号 02821239.8

[30] 优先权

[32] 2001.8.28 [33] EP [31] 01120466.6

[86] 国际申请 PCT/EP2002/009496 2002.8.24

[87] 国际公布 WO2003/020967 英 2003.3.13

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.26

[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 K·魏因德尔 S·克赖斯

F·贝格曼 H·-P·约瑟尔

D·海因德尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 韦欣华 徐雁漪

权利要求书 3 页 说明书 26 页 附图 11 页

[54] 发明名称 测定多重分析物的方法

[57] 摘要

本发明涉及利用特异的结合配偶体测定至少 3 种分析物的方法。将可检测标记物的组合偶联到结合配偶体上以保证每个结合配偶体分子只偶联于一种可检测标记物。这就容许不必限制可用标记物的范围而测定多于不同标记物的不同分析物。本发明也涉及试剂盒, 物质组合物及其用途。

1. 一种测定至少3种分析物的方法，包括步骤：
 - a) 提供含有至少3种分析物或怀疑含有一种或多种分析物，和至少3种不同的结合配偶体的样品混合物，在容许该结合配偶体与所述分析物特异结合的条件下，其中
 - 至少3种结合配偶体中的第一结合配偶体特异于至少3种分析物中的第一分析物，并且与第一标记物偶联，
 - 至少3种结合配偶体中的第二结合配偶体特异于至少3种分析物中的第二分析物，并与第二标记物偶联，且该第二标记物与偶联于第一结合配偶体的第一标记物是可独立检测的，以及
 - 至少3种结合配偶体中的第三结合配偶体特异于至少3种分析物中的第三分析物，其中第一含量的该第三结合配偶体与偶联于第一结合配偶体的相同标记物偶联，第二含量的第三结合配偶体与偶联于第二结合配偶体的相同标记物偶联，并且
 - 该第一含量的第三结合配偶体不与偶联于第二结合配偶体的相同标记物偶联，第二含量的第三结合配偶体不与偶联于第一结合配偶体的相同标记物偶联，
 - b) 检测指示第一和第二标记物的信号强度，
 - c) 利用步骤b)中测得的信号强度确定样品中存在的分析物，其特征在于所述的分析物是扩增的核酸。
2. 权利要求1的方法，其特征在于不同的结合配偶体是核酸序列特异性探针。
3. 权利要求1或2的方法，其特征在于所述的核酸是利用PCR扩增的。
4. 权利要求1至3任一项的方法，其特征在于所述的标记物是均相检测的。
5. 权利要求4的方法，其特征在于所述的标记物是利用荧光能量转移检测的。
6. 权利要求1至5任一项的方法，其特征在于所述第一、第二和第三结合配偶体中的第一结合配偶体特异于HIV，第二结合配偶体特异于HCV，第三结合配偶体特异于HBV。
7. 权利要求1至5任一项的方法，其特征在于第一结合配偶体特异

于HIV-1-M, 第二结合配偶体特异于HIV-1-0, 第三结合配偶体特异于HIV-2, 第四结合配偶体特异于HCV, 第五结合配偶体特异于HBV, 并且第六结合配偶体特异于HAV。

8. 一种组合物, 包含

- 5 -特异于第一分析物, 偶联于第一标记物的第一结合配偶体,
 -特异于第二分析物, 偶联于第二标记物的第二结合配偶体, 其中该第二标记物与偶联于第一结合配偶体的第一标记物是可独立检测的, 和

- 特异于第三分析物的第三结合配偶体, 其中第一含量的该第三结合配偶体与偶联于第一结合配偶体的相同标记物偶联, 第二含量的第三结合配偶体与偶联于第二结合配偶体的相同标记物偶联, 并且
- 10

 该第一含量的第三结合配偶体不与偶联于第二结合配偶体的相同标记物偶联, 第二含量的第三结合配偶体不与偶联于第一结合配偶体的相同标记物偶联,

- 15 其特征在于所述的分析物是扩增的核酸。

9. 一种测定至少3种分析物的试剂盒, 在一个或多个容器中包含

- 特异于第一分析物, 偶联于第一标记物的第一结合配偶体,
 -特异于第二分析物, 偶联于第二标记物的第二结合配偶体, 其中该第二标记物与偶联于第一结合配偶体的第一标记物是可独立检测的, 和
- 20

 -特异于第三分析物的第三结合配偶体, 其中第一含量的该第三结合配偶体与偶联于第一结合配偶体的相同标记物偶联, 第二含量的第三结合配偶体与偶联于第二结合配偶体的相同标记物偶联,

 其特征在于所述的分析物是扩增的核酸。

- 25 10. 权利要求9的试剂盒进一步包含在所述容器或一个或多个其它容器中的用于所述结合配偶体与所述分析物特异结合的工具。

 11. 权利要求9或10的试剂盒进一步包含在所述一个容器或一个或多个其它容器中的用于核酸扩增的试剂。

- 30 12. 用于测定样品中至少3种分析物的至少3种结合配偶体的用途, 其中

 -特异于第一分析物的第一结合配偶体偶联于第一标记物,
 -特异于第二分析物的第二结合配偶体偶联于第二标记物, 其中该

第二标记物与偶联于第一结合配偶体的第一标记物是可独立检测的，
以及

- 特异于第三分析物的第三结合配偶体，其中第一含量的该第三结合配偶体与偶联于第一结合配偶体的相同标记物偶联，第二含量的第三结合配偶体与偶联于第二结合配偶体的相同标记物偶联，并且
- 5

该第一含量的第三结合配偶体不与偶联于第二结合配偶体的相同标记物偶联，第二含量的第三结合配偶体不与偶联于第一结合配偶体的相同标记物偶联，

其特征在于所述的分析物是扩增的核酸。

测定多重分析物的方法

5 本发明涉及利用分析物特异的结合配偶体测定多重分析物的方法，其中该结合配偶体地使用不同结合配偶体时更少不同标记物标记。此外，本发明涉及包含不同标记的结合配偶体的物质组合物和该组合物用于测定多重分析物的用途以及适合的试剂盒。

发明背景

10 测定样品中的一种分析物，特别是在卫生保健、营养学和生态学领域已经变得尤为重要。根据分析物可使用不同的测定方法。如金属离子、糖类单体、氨基酸的小分子经常利用其化学或物理特性进行测定。如蛋白质和核酸多聚体的具有高分子量的分析物也可以利用与其具有特异亲和性的结合配偶体进行测定。有用的结合配偶体对是抗体-抗原、底物-酶、核酸-互补核酸、糖类-凝集素。在想要测定一种已知
15 呈现抗原特性的特定蛋白质的情况下，可以使用特异的抗体进行测定。对于特定核酸序列的测定，可以使用具有互补序列的核酸探针。这些结合鉴定和适合的方案在本领域是公知的，并在文献中有充分的说明，例如参见Sambrook等，1985，分子克隆-实验室手册，冷泉港实验室，冷泉港，纽约；核酸杂交（B.D. Hames and S.J. Higgins, eds. 1984）和酶学的系列方法（Academic Press, Inc.）。
20

为了容许测定特异的结合配偶体-分析物复合物，标记结合配偶体是很普遍的，其中可以利用与标记物结合的附加试剂（例如使用能通过抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶共轭物和适合的酶-底物反应进行测定的生物素作为标记物）直接或间接的测定这些标记物。适合的标记物是本领域公知的。
25

在许多情况下，特别在诊断领域，测定两种或多种分析物以获得特殊情形的完整了解是很必要的。例如对于一名可能的沙眼衣原体感染患者，通常医生不仅要检查沙眼衣原体而且要检查淋病奈瑟球菌感染。当建立患者的人白细胞抗原HLA模型时，也需要测定几个不同的HLA
30 基因座的等位基因。

当进行多重分析物的结合鉴定时，必须注意使用的标记物。在最初的情况下，对所有的不同结合配偶体使用相同的标记物。此时这样

两种可供选择的形式必须区别开来。如果所有的结合反应都在一个反应中一起进行,则阳性结果只能显示样品中至少存在一种分析物,但是不能显示是哪一种。作为选择,通过进行顺序反应或采用平行反应的形式就能区分每个结合反应。适合的形式有例如微量滴定板鉴定或点杂交鉴定。利用这种形式的方法是本领域公知的。这种形式耗费时间并需要大量处理步骤,还会导致成本增加和污染风险。使用生物芯片的方法更先进但很昂贵,并且特别是在核酸扩增领域涉及到污染就很难处理。

为了容许只在一个结合和/或检测反应中分别测定几种分析物,可以将不同的特异结合配偶体用不同的并且是分别检测的标记物标记。这些标记物和进行检测的方法是本领域公知的。例如使用通过光学发射光谱检测的标记物,借此每个标记物都具有不同发射光谱。但是必须注意到这种检测事实上只限于很少种类的分析物的测定,因为不存在无限多具有高灵敏性和足够稳定性的分别测定的适合标记物。使用适宜的稀土金属标记物时,用于时间-分辨荧光测定法的昂贵和高度先进的检测器是必需的。涉及到均相检测方法时这些限制尤为重要。这些形式通常由于缺少洗涤步骤没有去除未特异附着于分析物的结合配偶体,造成较高的信号背景而受到损害,这也使得很难正确地解读多重检测信号。

将多重标记与具有多个光通道的检测器结合已被许多研究者采用。例如, Vet等人(PNAS 96, 6394-6399(1999))使用的方法中,用4种不同的报告染料标记互补于4种不同靶物的4种特异探针(分子信标),一种染料标记一种探针。每种染料的完整荧光光谱储存到计算机中以用来解读复杂的多重结果。这就需要非常先进的软件以满足借助光学供量分析分辨共感染的需求。包括针对每种特定染料(光通道)基于最大增益对分别来自不同染料的荧光信号进行归一化,即不是参照染料跨越不同的光通道,而是相关于相应平台的通道特异性增长曲线的归一化,以使得能够基于共同的基础分析信号分布。其它例子包括 Josephsson等人(J. Clin. Microbiol. 37/3, 490-496(1999); 每个检测中多至3种不同标记的分子信标对应于多至3种靶物)和 Mercier等人(J. Virol. Methods 77, 1-9(1999); 每个检测中2种不同标记的探针对应于2种靶物)。

为了在标记物数量一定时增加被测分析物的种数，也使用标记结合配偶体的组合标记物。除了已附着一种特定标记物的结合配偶体外，也使用与两种或多种标记物偶联的结合配偶体，且所使用的标记物与也与单标记结合配偶体偶联的标记物是相同类型的。例如使用3种不同标记物的7种组合标记物就可以检测7种不同的分析物。原位杂交方法中就使用了类似原理，参见T. Ried等，Proc. Natl. Acad. Sci USA, 卷89, 第1388-1392页 (1992)。在Samiotaki等，Analytical Biochemistry 卷253, 第156-161页 (1997) 中描述了利用PCR和随后的探针杂交检测确定一个样品中7种不同的人乳头状瘤病毒类型的相似方法。为此，寡核苷酸的5'末端用多个螯合物部分修饰。各个螯合物单元随后用同一种类型的稀土金属离子或最多3种稀土金属离子的精配混合物填补。这样，在通过络合作用多于一种的离子被固定的情况下，多重荧光稀土金属螯合物（“染料混合物”）就偶联于同一种探针分子。这种探针不易合成，并在均相扩增/检测形式中应用效果很差（即使有的话）。

还有很多其他组合标记的技术途径。Ballard等 (US5, 759, 781), Speicher等 (Nat. Genetics 12, 368-375 (1996)) 和Ried等 (PNAS 89, 1388-1392 (1992)) 已开发了这样的检测形式，其中每个特异探针由其标记特征而表征，因为给定探针的所有拷贝以组合的形式带上一个或多个独特的荧光团。标记通过切口平移的方式进行，从引入每个探针分子上的标记物数目而言，它不如寡核苷酸的化学合成法准确，即该方法不能精确的分析离散分布。因此专家不会在核酸扩增方法，尤其在均相扩增方法中使用这样的探针。

Tong等人 (Nat. Biotechnology 19, 756-759 (2001)) 描述的所谓CFET探针具有完全不同的设计和使用模式。1至3种染料偶联到每个探针分子的5'末端，其间散插有准确调节数目的间隔物单元。寡核苷酸部分跟随在朝向3'末端的最后一个染料或间隔物之后。这就如Ballard等人描述的不同探针类型的混合物。间隔物的功能是作为电泳迁移率和共振强度的调节体。后者影响特定探针的荧光特征。探针在共同的波长被激发，通过毛细电泳图的位置并且通过在该特定位置覆盖整个发射光谱并直接以数字比率的形式计算来自标记物组各个成分的相对贡献，由此分辨记录的信号。同样，该方法没有经过校正和归

一化的信号自身的信号分布分析,没有沿反应坐标动态分析,没有“相同序列/不同标记物”的寡核苷酸设计,也没有由改变探针构型或构造的生化反应带来的信号形成。

以每个结合配偶体分子携带多于一种标记物的方式来标记结合配偶体是有一些缺陷的。这些多重标记的结合配偶体在合成上相当苛求(昂贵的)并可能对标记物产生空间位阻,导致结合配偶体与其分析物的结合效率或附着的标记物的检测效率降低。结合配偶体附着的标记物之间也可能发生相互作用而导致错误的结果。例如当使用光学标记物时就很相关。当利用荧光能量转移标记物进行均相检测方法,如 TaqMan检测(US5210015, EP0543942)中所用的标记物,这当然是至关重要的。

因此本发明的目的是改进测定多重分析物的方法,避免现有方法全部或部分的缺陷。

发明概述

本发明的主要方面涉及使用少于被测分析物的标记物测定多重分析物的方法。针对一些靶物用特定的染料标记整套特异探针分子,同时对于其他一些靶物用给定的染料标记该套特异探针分子的一部分,而该套特异探针分子的其余部分用不同的染料(相同序列/不同标记寡核苷酸混合物)标记。优选通过均相(溶液相)实时扩增检测(例如 PCR或TMA),对所有类型的相关噪音校正结果信号,以参考染料归一化来自不同标记物的信号,以多通道检测器收集的处理信号的分布推导靶物。为此使用组合标记物。

例如测定3种分析物时,只需两种不同的可检测标记物。第一种标记物附着到特异于第一分析物的第一结合配偶体上。第二种标记物附着到特异于第二分析物的第二结合配偶体上。对于标记特异于第三分析物的第三结合配偶体可使用与已经偶联到第一和第二结合配偶体上相同种类的标记物。一部分含量的第三结合配偶体偶联于第一标记物。在有三种分析物的情况下,优选以此方式标记一半第三结合配偶体。另一部分含量的第三结合配偶体偶联于第二标记物,如果是在有三种分析物的情况下,优选它是那剩余的一半第三结合配偶体。因此每个特异于该分析物的结合配偶体含有第一或第二标记物。这导致标记的每个结合配偶体分子只含有一种标记物,优选实现多色分析以分

辨基于源自生化反应的信号产生的多重结果，该信号产生提供了动态响应记录手段，同时实现简单的探针设计和先进的检测仪器。与此不同的探针是文献中描述的在一个探针分子上结合多个标记物的探针（Samiotaki, M. 等, Analytical Biochemistry 253, 156-161 (1997)），这样的探针比本发明的结合配偶体的合成要难的多。

附着于第三结合配偶体的不同标记物可能造成的不同检测效率可用2种方式补偿。在第一标记物信号输出高于第二标记物的情况下，可将偶联于第一标记物的第三结合配偶体和偶联于第二标记物的第三结合配偶体以规定的非1:1的比率混来化学调节这一差别，或将输出信号经给定的选择作为标准的标记物进行归一化而按数学方式调节差别。这种检测效率的差别可能归咎于标记物的内在特性，如吸收率或量子场，不过也可能归咎于不同的偶联效率或对溶剂影响的敏感性。在后者的情况中，偶联反应后混合不同含量的第三结合配偶体提供了良好的适应这种差异的可能性。

避免了当两种或多种可检测探针附着到一种结合配偶体分子上时可能发生的另外干扰。因此，本发明的结合配偶体适合较宽光谱的标记物，该标记物包含荧光团和荧光团组合，如经典的Förster型标记物（Styer and Haugland, Proc Natl. Acad. Sci. USA 98, 719 (1967)），可用于如测定低浓缩核酸分析物的TaqMan法的均相检验测定。

必须注意到也可以利用三种甚至更多的标记物以如上面两种标记物所显示的相同的方式组合起来测定更多数目的分析物。当使用三种标记物时可测定多达七种的分析物。如果单个、双重、三重和四重组都应用得同样好，使用四种不同的标记物甚至可测定15种分析物。如果只应用单个或双重组（从实用观点来说可能很有益处），使用一套4种标记物就可鉴别多达10种不同的分析物。

因此本发明涉及一种测定至少3种分析物的方法，包括步骤：

a) 提供含有至少3种分析物或怀疑含有一种或多种分析物，和至少3种不同的结合配偶体的样品混合物，在容许该结合配偶体与所述分析物特异结合的条件下，其中

-至少3种结合配偶体中的第一结合配偶体特异于至少3种分析物中的第一分析物，并且与第一标记物偶联，

-至少3种结合配偶体中的第二结合配偶体特异于至少3种分析物中的第二分析物，并与第二标记物偶联，且该第二标记物与偶联于第一结合配偶体的第一标记物是可以单独检测出来的，以及

- 5 -至少3种结合配偶体中的第三结合配偶体特异于至少3种分析物中的第三分析物，其中第一含量的该第三结合配偶体与偶联于第一结合配偶体的相同标记物偶联，第二含量的第三结合配偶体与偶联于第二结合配偶体的相同标记物偶联，并且

10 该第一含量的第三结合配偶体不与偶联于第二结合配偶体的相同标记物偶联，第二含量的第三结合配偶体不与偶联于第一结合配偶体的相同标记物偶联，

b) 检测指示第一和第二标记物的信号强度，

c) 利用步骤b) 中测得的信号强度确定样品中存在的分析物。

优选的分析物是可利用序列特异性探针进行测定的核酸分析物。该核酸分析物也可以是利用本领域公知的一种或几种核酸扩增方法扩
15 增的核酸，如LCR（美国专利5,185,243、5,679,524和5,573,907；EP0320308B1；W090/01069；W089/12696和W089/09835），循环探针技术（美国专利5,011,769、5,403,711、5,660,988和4,876,187，以及PCT公开的申请W095/05480，W095/1416和W095/00667），Invader
20 TM技术（美国专利5,846,717、5,614,402、5,719,028、5,541,311和5,843,669），Q-Beta复制酶技术（美国专利4,786,600），NASBA（美国专利5,409,818、EP0329822），TMA（美国专利5,399,491、5,888,779、5,705,365、5,710,029），SDA（美国专利5,455,166和5,130,238）和PCR（US-A-4,683,202），其中PCR法是最优选的。

本发明也涉及一种物质组合物包含

- 25 -特异于第一分析物，偶联于第一标记物的第一结合配偶体，

-特异于第二分析物，偶联于第二标记物的第二结合配偶体，其中该第二标记物与偶联于第一结合配偶体的记物是可以单独检测出来的，和

- 30 -特异于第三分析物的第三结合配偶体，其中第一含量的该第三结合配偶体与偶联于第一结合配偶体的相同标记物偶联，第二含量的第三结合配偶体与偶联于第二结合配偶体的相同标记物偶联，并且

该第一含量的第三结合配偶体不与偶联于第二结合配偶体的相同

标记物偶联，第二含量的第三结合配偶体不与偶联于第一结合配偶体的相同标记物偶联。

以及该组合物用于测定样品中的至少3种分析物的用途。

本发明进一步涉及测定至少3种分析物的试剂盒。

5 附图简述

图1显示了利用所描述的测定方法进行多重分析物自动化检测分析的可能的数据处理流程图解。见实施例2。

发明详述

10 根据本发明的分析物是可通过本领域公知的结合检测法测定的分析物。该分析物优选为医学诊断或其他生物学分析样品的成分，即特别是例如抗原、抗体、细胞或核酸的机体构成成分。这样的检测可被用于比如测定传染性媒介，例如衣原体、奈瑟球菌和分枝杆菌的细菌，以及如HBV，HCV和HIV的病毒。根据检测目的可确定样品中存在的一种分析物的含量以及分析物的构型，例如对核酸分析物可分析其等位基
15 因形式或患者是否携带其突变形式。

本发明的样品含有待测定的分析物。就医学诊断而言，分离自人或动物的样品是优选的，例如可使用全血、组织切片、尿、唾液、血清、血浆、血沉棕黄层和涂片。根据分析物和样品有必要对样品进行预处理以容许进行分析物测定，例如对于大多数样品需要在第一步进
20 行核酸提取。这些预处理的样品也是本发明的样品。

根据本发明至少3种分析物被测定。例如患者的传染性媒介的模式，如病毒HIV，HBV和HCV，必须测试血库中的每个血液样品。另一个例子是测定由几个基因座和独特的等位基因型组成的组织相容性抗原基因座模式。

25 分析物与特异的结合配偶体结合。必须根据分析物选择特异的结合配偶体。具有抗原性质的分析物可用特异的抗体结合。样品中的抗体可通过使用特异的抗原作为结合配偶体进行测定。如果必须测定核酸分析物，可使用与分析物互补的核酸序列作为特异的探针。其它特异的结合对如底物-酶或糖类-凝集素是本领域公知的，也可用于所述
30 的方法。

核酸分析物通常要经过不同方法之一处理原始样品才能成为适用的形式。包括例如pH的变化（碱性的），加热，温度的循环变化（冻/

融)，生理生长条件的变化，去污剂、离液盐或酶（如蛋白酶或脂酶）的单独或组合使用。例如可以使用能够在特定条件下结合核酸的磁性玻璃颗粒。适合的颗粒和方案在W096/41811和W001/37291中有描述。

- 选择促进结合配偶体与分析物特异结合的反应条件是很重要的，
- 5 该条件容许特异结合复合物的产生但使结合配偶体与不相关反应和样品成分的结合最小化，以免导致背景信号增强。这样的反应条件和适合的方案是本领域公知的。

- 用于测定核酸分析物或扩增的核酸分析物的特异核酸结合配偶体，也称为探针，优选为寡核苷酸，但也可以使用例如肽骨架替代了
- 10 天然的磷酸酯-糖酯骨架的类似物（PNA，W092/20702）。为了容许探针与分析物的特异结合，探针优选长于10个核苷酸，更优选长度为10至40个核苷酸。进一步要求探针与分析物序列充分互补。因此探针优选至少80%的互补性，更优选至少90%的互补性。在最优选的情况下探针与分析物完全互补。对互补性和同源性的精确测定可使用如FastA
- 15 （Person 和 Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 卷85，第2444-2448页(88)）的计算机程序进行测定。

- 根据核酸分析物的最初浓度，有必要扩增分析物以进行测定。为此的几种扩增方法是本领域公知的（参见上文）。特别当使用基于引物的扩增方法时，对核酸分析物的特异扩增是可能的。在与探针结合
- 20 检测法的组合使用时可获得增强的检测特异性。使用标记的引物以测定分析物的方法如LCR是本领域公知的。根据本发明这些方法也可进行修饰。

- 本发明的引物是可被延伸或修饰的分子，优选用酶，更优选在与核酸模板杂交时使用原核生物来源的聚合酶。当用到PCR方法学时，耐
- 25 热的聚合酶如水生栖热菌（*T. Aquaticus*）或嗜热栖热菌（*T. Thermophilus*）DNA聚合酶是优选的。引物延伸是通过将来自三磷酸单脱氧核糖核苷的单核苷酸单位加至所述引物的3'-OH末端进行的。引物的全长和碱基序列取决于所需的扩增反应的特异性。优选的进行PCR的引物长度是10至40，最优选15至30个含有选自单核苷酸和/或核酸类
- 30 似单体的亚单位的碱基。一般，这一长度的引物也可用于其他扩增方法。如果扩增中使用了多于一种的引物，例如当利用PCR或在一个反应中扩增多个靶核酸时，优选使用相互间不会杂交的引物，因为它们不

含有任何多于5个连续互补碱基的序列段。

通常本领域的技术人员知道哪一类标记物是可检测的或可制备成可检测的以用于测定分析物的存在。众所周知的标记物是如荧光素和镧系螯合物的荧光标记物，如钌系络合物的电化学发光标记物，或能被其他分子实体识别的部分，如能通过与抗体隆起反应而识别的半抗原，或可被固定的部分，如可以与涂有链酶亲和素的固相如珠或管结合的生物素。特别是从均相形式出发，最优选的标记物是生色团。这些生色团可单独使用或与其他生色团或例如与非荧光淬灭剂组合使用。

10 在使用均相检测形式的情况下，特别是用于核酸分析物测定的几种形式是本领域公知的。如TaqMan检测（美国专利5,210,015和5,487,972）和相吻探针-检测的方法是基于荧光染料（FET, Styer和Haughl的Proc. Natl. Acad. Sci. USA 卷98, 第719-(67)）的荧光能量转移。当相互之间紧密邻近时，第一荧光团会与第二荧光团或非
15 荧光淬灭剂相互作用。例如，电磁发射或振动激发第一荧光染料可能引起第二荧光染料的共振。根据使用的形式可以检测例如第一荧光染料降低的光发射或第二荧光染料增加的光发射，以作为一种分析物存在的指示。以此为目的的荧光染料的组合使用是本领域公知的。具体实例是如五甲炔-吡啶二羧花青（Cy5）组合6-羧基荧光素（6-FAM）的
20 适于Forster型共振能量转移的经典染料。

本文的标记物指在本发明的方法被检测的信号生成实体。涉及所述的均相形式，可使用相互产生共振，并且在这些方法中以单独的检测信号被检测到的成对荧光色素。尽管包括了例如两种荧光色素的两种不同的分子，它们还是起一个单独标记物的作用。此外，术语标记
25 应被理解为它也指一种特定标记物的多于一个标记分子偶联到结合配偶体分子上。

根据使用的标记物必须使用不同的探测器检测标记物信号。除其他仪器外，尤其是荧光计被广泛使用。荧光标记与均相PCR协同使用是最有益的，因为与酶或化学发光标记技术相比不必加入化学触发试剂
30 以形成信号。这就容许封闭管方法，是避免与扩增物质交叉污染的最有效方式。当测定多重标记物信号时，每个信号之间能相互区别是很重要的。为避免交叉干扰，当使用光标记物时优选每个标记物具有不

同的发射和/或消光光谱。但是在多重分析物检测中使用多数商业上购买的标记物时至少一些交叉干扰是不能避免的。当只测定少数分析物时这种交叉干扰可通过用计算机程序处理测得的信号或使用更贵的光谱荧光计代替基于滤光片荧光计而加以补偿。涉及均相形式特别是使用基于荧光能量转移的方法时，必须使用附加生色团更增加了干扰的可能性。因此实际上多重分析中一起使用的适合标记物的数目是受限的。

根据本发明至少所使用的一种结合配偶体偶联于可探测标记物的组合，其中每个结合配偶体分子只偶联一种可探测标记物。与此相反，Samiotaki等人（参考上文）描述的探针是用多重标记物标记的（例如每个寡核苷酸5'末端偶联10-20个）。由于偶联到相同探针分子上的可检测标记物紧密邻近，标记物之间相互干扰的风险很高，并且不是所有类型的标记物尤其荧光染料都可使用。

本发明的方法可被用于在多重分析物检测中测定更多数目的分析物，并且适合较宽范围的标记物。

通过减少多重分析中所需标记物的数目可避免引入外来标记物的需要，并且可使用如基于滤光片的荧光计的较便宜的探测器以代替昂贵得多的光谱荧光计。这进一步容许在商业诊断检测中使用污染风险有限且处理步骤较少的均相形式，这些是尤为重要的。

如上所述，按不同方式组合的三种标记物可偶联于多达七种不同的特异结合配偶体而容许六种不同分析物的分别测定。这在下表中呈现出来。P代表参量=分析物，通道相应于光道，它是优化捕捉特定检测的标记物信号的探测器的一部分。表格显示了对所有三个通道的信号的预期百分数分布，并通过化学或数学方法进行归一化。设想的情况是P1至P7的分析物中同一时刻只有一种分析物存在于样品中。不同结合配偶体的标记是：类型P1-标记物1（通道1的信号），P2-标记物2（通道2的信号），P3-标记物3（通道3的信号），P4-半含量标记物1，半含量标记物2，P5-半含量标记物1，半含量标记物3，P6-半含量标记物2，半含量标记物3以及P7-1/3含量标记物1，1/3含量标记物2，1/3含量标记物3。

参量	通道		
	1	2	3
P1	100		
P2		100	
P3			100
P4	50	50	
P5	50		50
P6		50	50
P7	33	33	33

如果只能在一个通道中测量到一种信号，就清楚说明存在参量1，2或3中的一种分析物（见表）。如果信号以50:50的比率出现于两个通道，就如表中所指示的，强烈说明存在参量4，5或6中的一种分析物。

5 比率为33:33:33的信号说明样品中存在分析物P7。但这只反映了一种理想化的情况。实际信号可能偏离并必须进行归一化以便补偿例如标记物，背景和交叉干扰信号的不同检测效率。

50:50的信号比可能在存在两种分析物的情况下发生。但这可能是极为罕见的，因为这种发生依赖于从起始分子数目而言发生了1:1的共感染并且提取/扩增/检测效率相同而使50:50的信号生成于2个通道

10 中，或者起始分子的数目不同但同时提取/扩增/检测效率精确地抵消了滴定度的差别并且也服从50:50的分布。因此2个参量的共感染使用单独的标记探针分别指示，例如P1和P2，结果应为不均等的

>>50:<<50:0或<<50:>>50:0分布，而与例如以50:50:0的均等分布显示

15 的P4区别开来。但这种结果也可得自被例如P4和P1的两种试剂共感染的样品。

为了进一步减少不明确结果的风险和检测信号解读中的可能错误，可以如实施例1中所说明，以两个或多个通道产生的信号可明确地指定为样品中一种可能的分析物分布的方式安排参量。另外，特别为

20 检测可能存在于样品中的剩余分析物的分布，可以进行一个附加的检测。该顺序型方法很经济，容许在第一次检测中测定多数样品中一种单独的分析物的分布，同时不明确的样品可通过比如分析物数目减少

的多重分析物检测（其中确定的一个标记对应一个结合配偶体的组合应是可能的）在第二次检测中进行再评价。另外，对于核酸分析物和扩增的核酸分析物，可以测定例如分析物-探针杂交复合物或扩增的核酸复合物的熔融曲线，从而区别不同的分析物并得到明确的结果

5 测定至少3种分析物的试剂盒也是本发明的主题。该试剂盒在一个或多个容器中包含

 -特异于第一分析物，偶联于第一标记物的第一结合配偶体，

 -特异于第二分析物，偶联于第二标记物的第二结合配偶体，其中该第二标记物与偶联于第一结合配偶体的第一标记物是可以独立检测的，和

10

 -特异于第三分析物的第三结合配偶体，其中第一含量的该第三结合配偶体与偶联于第一结合配偶体的相同标记物偶联，第二含量的第三结合配偶体与偶联于第二结合配偶体的相同标记物偶联，并且

 该第一含量的第三结合配偶体不与偶联于第二结合配偶体的相同标记物偶联，第二含量的第三结合配偶体不与偶联于第一结合配偶体的相同标记物偶联，

15

 此外该试剂盒也包含使该结合配偶体与其分析物特异结合的工具，包括缓冲液，封闭反应剂和其他本领域公知的反应成分。测定核酸分析物的试剂盒也可包含如上所述的用于核酸扩增方法的反应成分。例如PCR反应试剂盒也可包含聚合酶、缓冲液、三磷酸核苷酸和/或引物。

20

 本发明用以下实施例举例说明：

 实施例

 实施例1

25 根据本发明的多色分析可通过使用建立在“经典的”荧光色素化合物和“经典的”共振能量转移原理基础上的Roche Cobas Taqman扩增/检测技术和5'-核酸酶检测技术（EP0543942和US5210015）进行。Roche Cobas Taqman仪器装备了多达4对滤光片（见EP0953379, EP0953837, US6134000和US6084669）。一套推定指示剂可由4种报告染料和优选1或2种任选的非荧光淬灭剂组成。跨越Cobas Taqman检测器设置的光谱范围，即约420nm-约710nm的候选化合物可包括：

30

 -在红光有宽波段吸收的淬灭（Q）染料，如聚甲炔-花青染料（例

如 $n=5$ ，即4个共轭烯本体构成内消旋结构），或与参与共轭外消旋 $\pi-e^{(-)}$ 系统的不饱和N-杂环部分在侧面对称稠合的若丹明衍生物，都可优选作为非荧光的硝基苯衍生物。

- 5 -报告(R)染料荧光分子，如香豆素染料，如FAM或氯化衍生物的荧光素型染料，若丹明型染料，噻嗪或邻联吡啶型化合物。三种这样的染料被用于靶参量，一种用于监测IC。

通常对于候选染料的相关要求包括：在储液中的良好化学稳定性和在主要混合试剂中居于作为有效成份的使用水平；在合成、纯化和试剂盒生产过程中当受到周围环境中光照时稳定；在PCR中当受到多个10 加热/冷却循环（如 $n=60$ ）时稳定；足够的光谱叠加和相应RQ共振对之间有效的能量转移；高消光系数（即吸光率）；以及尤其对于报告染料在水溶液和Taqman-PCR使用的pH范围（如pH7-8.5）中的高量子产率。

15 新方案容许检测3种报告染料及其二元组合在相应的3个Cobas Taqman光通道范围内的交叉干扰和背景校正归一化信号，而非固定指配特定染料（代表特定的检测参量）和相应的通道。该原理将提供对6-参量多重检测获得的阳性结果的完整解析（通过报告染料R1, R2, R3, R1+2, R1+3, R2+3），并考虑到最大极限的复杂性。

20 理论上来说，在使用单标记物的情况下，在给定的通道中得到100%的各自的处理信号；在使用二元标记物的情况下，处理信号将平均分布于2个相应的通道（50%+50%）。

对阳性/阴性集合体（捐赠物）的辨别将基于检测极限循环的优化运算法则（ct值，即反应坐标上荧光信号强度显著突出于背景水平的点）进行，以指示信号时间曲线的斜率分布图。

25 对感染类型的分辨（检测参量，即产生可检测产物的病原体种类，）可通过分析信号/时间曲线（AUC）下的总面积或总的标准化平台信号强度的通道特异性贡献进行。就这些判据而言，没有严格的剂量响应关系，不必如血液筛选需要强制进行定性检测。

30 适合的6-参量（P1至P6）多重检测包含以下探针（Q=淬灭剂，R=报告染料以及 N_i =四种核苷酸之一）：

参量1-探针= $5'-Q-(N_i)_x-R1-(N_i)_y-3'-PO_4+5'-Q-(N_i)_x-R2-(N_i)_y-3'-PO_4$

各5pmol/100μl反应混合物

参量2-探针=5'-Q-(N_i)_a-R1-(N_i)_b-3'-P0₄

10pmol/100μl反应混合物

参量3-探针=5'-Q-(N_i)_c-R2-(N_i)_d-3'-P0₄

5

10pmol/100μl反应混合物

参量4-探针=5'-Q-(N_i)_e-R3-(N_i)_f-3'-P0₄

10pmol/100μl反应混合物

参量5-探针=5'-Q-(N_i)_g-R1-(N_i)_h-3'-P0₄+5'-Q-(N_i)_k-R3-(N_i)_l-3'-P0₄

10

各5pmol/100μl反应混合物

参量6-探针=5'-Q-(N_i)_n-R2-(N_i)_m-3'-P0₄+5'-Q-(N_i)_o-R3-(N_i)_p-3'-P0₄

各5pmol/100μl反应混合物

换句话说:

15

在2-4的情况下, 每个参量有大约 $1 \cdot 6^{12}$ 个均一标记的探针分子(相同的寡核苷酸/相同的报告染料)将被引入PCR; 在1, 5和6的情况下, 每个参量又有大约 $1 \cdot 6^{12}$ 个均一标记的探针分子将被引入PCR, 大约 $1/2 \cdot 6^{12}$ 个分子具有一种标签, 而大约 $1/2 \cdot 6^{12}$ 个分子具有另一种标签(相同的寡核苷酸/不同的报告染料), 它们将按统计平均的方式消耗; 在所有的情况中, 都存在着10pmol的参量特异性探针。

20

考虑到不明确结果的风险, 并只关注一元标记物和其二元组合的使用, 有人可能会说, 不明确结果在由单个标记探针分别指示的2个参量共感染的情况下可能是极为少见的, 例如 $P2 \Leftrightarrow R1 + P4 \Leftrightarrow R3$ 。起始分子按照1:1的数目共感染并且提取/扩增/检测效率相同而在2个通道中产生50:50的信号分布, 或者起始分子共感染的数目不同而同时提取/扩增/检测效率精确地抵消了滴定度的差别并且再次产生50:50分布的可能性被认为是低得可忽略不计。因此 $>(>) 50: <(<) 50: 0$ 或 $<(<) 50: >(>) 50: 0$ 的不均等分布将产生(情况I), 而与例如以50: 0: 50的均等分布显示的 $P5 \Leftrightarrow R1R3$ 区别开来。

25

30

以2个双重标记的探针的1:1混合物指示的2个参量的共感染(情况II), 例如 $P1 \Leftrightarrow R1R2$ 和 $P5 \Leftrightarrow R1R3$, 也由于信号分布于3个通道应该是明显的(例如假定相等的提取/扩增/检测效率, 约为50: 25: 25)。

2个参量的共感染，一个参量用一种报告染料表示，另一种用两种报告染料表示，可通过信号分布于3个通道而被识别 $\approx 33:33:33$ (情况III，例如R1R2+R3)，或产生 $\approx 75:\approx 25:0$ 的模式 (情况IV，例如R1R2+R1)，再次假定相等的提取物/扩增/检测效率。对于情况II和
 5 III，共同的特征是没有靶物相关的光通道并且基本上为“零信号”。换句话说，将“零+X”的阈值区别于“实零”是很重要的。情况IV可能是最关键的一种情况，其分辨的确依赖于检测的总体效率，后者决定了结果分布是完全区别于50:50的情形，还是没有区别。最可能的，尤其是在后一种情形中必须考虑到附加的数学判据以解析不明确结果。
 10 有益的是实时Taqman-PCR提供了这样的“辅助算法”。下面就一些细节说明该主题。

不明确结果的低发生，即共感染中发生50:50信号分布的情形，可进一步通过将极少发现的和低扩增效率的参量指定于单标记的探针而被最小化，考虑到地域分布，它有可能得到补偿。

15 报告染料 (R=标记物) 的推定指定和检测HIV-1-M, HIV-1-0, HIV-2, HCV, HBV和HAV的测定法如下所示:

P1	⇔	HIV-1-M	⇔	R1 / R2	扩增和检测效率:	高
P2	⇔	HIV-1-O	⇔	R1		低
P3	⇔	HIV-2	⇔	R2		低
P4	⇔	HCV	⇔	R3		高
P5	⇔	HBV	⇔	R1 / R3		高
P6	⇔	HAV	⇔	R2 / R3		中

IC (内参) ⇔ R4

20 为了安全原因和尤其涉及到商业检测，也可以加入内参，该内参可以通过例如偶联于第四种标记物 (R4) 的探针被检测到。

这里，HIV-1-0和HIV-2的共感染是非常不可能的，两者都很少见并且地域上是分离的 (但是可能随时间改变)，即使在这种非预期情况下总体结果也可以是“HIV阳性”。

25 另一方面，根据现有的扩增效率 (HIV-1-0和HIV-2很低)，HIV-1-0和HCV或HIV-2和HCV的共感染不会导致50:0:50或0:50:50的相等分布，并且不会被误认为HBV或HAV各自的单感染。因此可以使用标准的四通道荧光计进行包括一个单独测定的内参的六参量检测，该检测

可用于例如Roche Cobas TaqMan设备。

因此，根据检测参量的6参量多重测定的完全分辨的理念就成为相比于现有化学系统和设备平台的必要而适中的附加成果。同样如下所示，对于更先进的分析软件的要求就不是很苛求。在一些细节上包括：

5 -3种探针的双重对数迹线（相同的寡核苷酸，不同的荧光标签）

 -标准化程序以建立来自单标签探针的各个报告染料的信号输出和归一化因子（考虑来自各个寡核苷酸序列环境，以例如Em(R/Q)比率指示的纯化级别，与波长有关的含能量和CTM ASICS光谱灵敏度的影响）

10 -最可靠输出判据或成套判据的详细说明，以100%有效分布模式变差的测定，以及预期值的容许范围边界的设定

 -软件算法的开发，用于分析3个靶物通道中校正归一化信号的分布，该算法引入了所有前述的参量。

 实施例2

15 针对用于如Roche Cobas TaqMan™ 仪器的自动化测试设备的检测方案,适合的方法流程如下所示(也见图1)。

 由于使用了给定的新试剂，自动化检测主要的数据收集和数据处理的流程如下所示：

-数据收集			状态
20	1. 暗均值（=仪器噪音）	DM	已完成
	2. 暗漂移（=f(t) 漂移校正因子）	DD	已完成
	3. 交叉干扰和预设校正因子	XT	已完成
	4. 报告染料的信号输出归一化因子	NF _{ri}	另外进行
	（=校正量子场，微环境效应，光谱灵敏度,...的预设因子）		
25	5. 背景强度（=化学噪音，累积自混合物中所有的探针）	BG	已完成
	6. 随时间推移测量的总信号	TFI	已完成

 优选就Cobas Taqman仪器上光通道1，2，3和4而言，所有步骤都独立进行。

30 -数据处理：

 1) 对于每个通道，并且作为信号一时间图，
 计算 {TFI_{f(t)} - {(DM*DD_{f(t)}) + BG}} * XT * NF_{ri} = NFI，即通道特异性归一

化校正荧光强度

2) 如果通道1, 2, 3相应于报告染料, 而通道4相应于IC染料, 则 $NFI_4=100\%$ IC响应强度

$NFI_{1+2+3}=100\%$ 靶物响应强度,

- 5 3) 根据这些通道中的分布进行分析, 即通道1中x%, 通道2中y%, 和通道3中z%。

所得的信号分布数将与上述的预先计算的值进行比较, 并且被测病原体的同一性通过光通道特异性增益和相应的报告染料的相关性, 加上辅助因子而推导出来。

- 10 因此换句话说, 该检测不是相对于靶物的滴定度校准 (即其仍是定性的筛选检测, 在例如血库筛选应用中产生阳性/阴性的结果), 而是相对于给定浓度下参量特异性探针的信号输出校准 (为了鉴别多重扩增阳性结果的缘由)。

单个样品的分析可如图1的指示进行。

- 15 为了理解这个处理算法的逻辑性, 让我们来考虑下面的检测原理。

- 在5'-核酸酶技术中 (Taqman-PCR, 在此作为本发明的优选实施方案阐述) 各自的扩增和检测反应是紧密交叉的。为此, 具有2个特定化学修饰的检测探针被加入到PCR主混合物中。一种修饰是将荧光报告基团 (R, 例如6-羧基-荧光素的衍生物) 共价连接到探针的骨架上, 另一种修饰是能够吸收报告染料的荧光并淬灭之 (淬灭剂, Q) 的染料 (例如聚甲炔-花青衍生物)。淬灭剂典型的连接到探针的5'末端骨架上, 其中报告染料定位在寡序列中, 与淬灭剂间隔一定数目的核苷酸结构单元。探针结合到靶核酸上 (有义或反义链) 靠近引物的3'末端 (反向或正向)。
- 25 当引物退火形成靶物上, 并且DNA聚合酶结合到引物: 靶物杂交体上, 延伸开始。由于酶的5'核酸酶活性, 在拷贝链合成的同时, 当聚合酶到达探针结合位点, 探针断开, 报告染料和淬灭剂分开, 就可检测到荧光信号。该过程在每个循环中重复, 越来越多的荧光报告染料在溶液中累积直至在反应终点试剂耗尽。因此在信号一时间曲线
- 30 图中, 就形成了S形增长曲线。任意荧光强度 (AFI, 也被称为相对光单位, RLU) 可从背景信号中显著区分出来时的时间轴上的点被称为阈值循环 (ct)。ct是分析物滴定度的衡量标准: ct值越小, 起始分子

的数目越多和/或提取或扩增/检测的效率越高。ct值可通过不同的数学算式计算。例如，可使用截点逼近（平均背景信号强度乘以常量因子产生截点信号强度以从阳性中辨别阴性结果），或在曲线拟合后自动检测信号一时间曲线（即斜度或斜率分布型）第一或第二导数最大值的位

5 置的方法。斜率分布型方法不同于信号阈值的方法，其基本上不依赖背景强度水平，因此考虑到来自反应混合物中存在的所有探针的累积背景，该方法在多重检测中更有吸引力。

基于这些原理并根据上述的处理流程，可以使用不同的方式产生初级结果（即阳性或阴性？），和次级结果（即何种感染致使样品阳

10 性？）。

与使用一种共同标记物进行多重分析相比较，由于信号分散于几个光通道中造成灵敏度的潜在损失，因此减少了特定通道中特异信号的增长曲线。因此为了形成初级结果，可任选使用复合的信号一时间曲线。通过这种方式，全部的特异信号产量都被收集入一个信号一时间

15 曲线，该曲线随后被用于确定阈值循环（ct）和样品的主状态（阳性/阴性）。利用斜率分布型方法，背景强度的加入不会有害，反而可以充分利用自动检测特异信号增益的更为显著的增长特性的潜在优点。

另一方面，为了形成次级结果，可参考归一化信号的通道特异性分布（NFI强度），并通过将结果分布模式与上述的预先计算的矩阵模式比较推导出感染的种类。此外，为了增强鉴别能力，也可以考虑非归一化的特异信号强度以分析归一化信号约50:约50或约75:约25的分布，即真正关键的那些。

20

-在以1:1的探针混合物表示单感染的情况下，非归一化但背景校正的信号R1/R2的比率仍将在整个的扩增/检测过程中恒定，例如为40/50。这必须与得自相等含量的纯化染料的归一化因子（0，80）的值准确相当，因为两类的标记探针（相同的寡核苷酸序列！）都要以同样的速率断裂。背景（BG）校正是必需的，因为根据于此提供的概念解析6参量多重分析，每个通道特异性背景由用相同标记物标签的3

25

30 种不同探针的信号输出组成。因此BG强度不仅是标记物光特性的函数也是探针结构特性的函数，即线性或发夹式结构，或（更普遍的）通过自我补偿程度的，和测量过程中影响二级结构构象平衡的温度的函

数。因此相对于BG强度，必须考虑非杂交探针的二级结构，并且必须基于特异性荧光强度SFI进行辅助计算，其中

$$SFI = TFI_{f(t)} - [(DM * DD_{f(t)}) + BG] * XT_i = AFI - BG$$

- 相比较而言，特异性信号依赖于探针与靶物基本完全的杂交，即
- 5 探针寡核苷酸的线性化以聚合酶的5'-核酸酶活性的方式形成，因此基本上不依赖探针的结构。这也适用于由于 T_m （融化温度）随之下降在从靶链断裂并解离后的截短探针。剩余探针寡体之间短的内杂交在PCR退火/延伸使用的高温下是不稳定的。为补偿量子产率或溶剂影响易感性的差别而进行归一化后，通道1和2的信号分布将是50:50。发现NFI
- 10 和SFI比率如预期一样是单感染的双重证据。

- 在经2种特异探针分别标记的R1和R2指示的双重感染的情况下（情况I），很可能信号动态（即增长随时间的函数）在2种不同的检测中有差别，不管是最初的分析物滴定度，或整个的检测效率，或两者都可能不同。因此，除了NFI水平的 $>50: <50$ 情形的可能性外，反应的
- 15 极早期、中期和晚期中的R1/R2的SFI比率也必定不同，即SFI比率是变化的。该比率会有一些的趋势，并且与得自纯化染料，优选偶联于模型探针（为了说明无法避免的微环境因子，例如连接物，局部电荷）的等效混合物的各自的归一化因子不同，例如不会通过其结构构型调节信号输出的 T_3-R-T_{16} 寡核苷酸。

- 20 -在经R1+R1R2表示的双重感染以及就2种检测而言基本上不同的总体回收的情况下（情况IV），可能在通道1和2中观察到与50:50差别不大，如55:45的归一化信号分布。根据非归一化信号强度，比率R1/R2将是例如44/50（0, 88），即大于归一化因子。因此，归一化和非归一化水平的“大于预期”的双重偏离指示了双重感染。更甚者，例如
- 25 经AUC示踪的比率R1/R2，很可能在整个检测中并不恒定，这是由于不同的扩增效率导致信号动态差别，这会增强辨别力。

- 如果是在双重感染，用R1+R2或R1+R1R2标记的情况下（情况I或情况IV？），两个检测具有大约相等的效率并且起始于显著不同或大约相等的分析物滴定度，75:25:0的NFI模式是近似的或甚至超过之。
- 30 于此，情况IV和强偏离情况I型共感染之间的识别可能通过绝对特异信号强度（R1强度在情况I的情形中必是很低的）或任选校正的通道特异SFI值的绝对差的方式获得。在一些情况中结果可能完全不明确。

除此以外，对复合的AFI/t曲线可考虑其曲线形状的特性加以分析。在单感染的情况中，期望只有一个回折点的单S型曲线。但是在双重感染的情况中，从提取自2种传染剂的2种类型的核酸靶物中各自形成2种增长曲线，很可能其ct（即曲线向上弯曲并从背景和漂移水平线突出时在时间轴上的点），形状，和特异性信号强度都不相同。因此，可能形成具有2个回折点的双S型曲线形状。所以单或双S型曲线可以在检查中指示样品中存在单或双感染。但是在不利的情况中，2或更多曲线的重叠可能导致不规则形状，没有清楚的斜率最大值，并且噪音（即曲线的粗糙度）增加。另一可能性是当2个几乎同样的曲线重叠时复合曲线只有一个回折点。

概括起来，有很多数学方法适用于获得阳性多重分析的解析，得到的是感染类型。这些包括，但不只限于此：

基本方法-在靶物相关的光通道2或3中信号强度显著的情形下，参考NFI分布模式和偏差类型。来自参考模式的容许偏差范围可通过基于精确数据的绝对值，与各自NFI值相关的带百分率或它们的组合进行设置。

辅助方法-共同偏离下特定光通道相关的NFI和SFI比率的分析；

作为循环数函数的NFI或SFI比率的分析，即沿反应坐标（恒定或变化的）是动态的；

NFI比率和相应绝对SFI值的关系，或任何2个光通道之间的绝对SFI差（任选通过相关标准剂量差校正），其中应考虑检查中不同感染剂已知的检测特异性总体效率（提取/扩增/检测）；

复合的AFI一时间曲线形状的分析（如果适用）

这套标准的推定应用模式在图1+2中阐明。

更甚者，为了监测整个过程，可在所有样品中加入优选包裹（封装）于修饰的病毒颗粒的与天然靶物共提取并共扩增的人工核酸结构体。该内参（IC）的特征在于具有针对IC检测探针的独特的探针结合域，该IC检测探针通过携带区别性发射特征的不同报告基团而区别于靶物特异性探针。因此IC信号可以从靶物信号中辨别出来，并且既然已知IC存在于样品中，它就可以用作监测试剂。如果没有IC响应，必须认为各自的反应是无效的，然后重复之。

除了将共提取/扩增/检测内参（IC）加入每个被处理样品（即未

- 知物和外加的对照或校准物)并以R4指示外,外加的阳性对照也将是检测的一部分。这些是已知物并且相对于未知物必须是显示阳性的,还可被设计为在所有的靶物相关光通道都给出信号的混合对照样品。结合内参,除了整个提取/扩增/检测处理的功能性以外,整个光系统的效用都可被监测。对于血库中以核酸为基础的筛选应用,只要技术可行就需要利用例如高灵敏度却是定性的检测识别每个阳性捐赠物。因此外加阳性对照的滴定度要设置在低范围浓度。

实施例3

- 基于实施例1给出的参量列表分析下面所示的信号分布。对于被测6参量中的每个参量,都有分配给靶物检测的3个光通道中的信号分布参考模型。每个参考模型用伴随的容许范围补足,例如,

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	50	50	0
P2	100	0	0
P3	0	100	0
P4	0	0	100
P5	50	0	50
P6	0	50	50

NFI参考模型

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	10	10	9,17
P2	10	1,67	6,25
P3	7,08	10	7,92
P4	4,17	1,67	10
P5	10	4,17	10
P6	5,83	10	10

- 假定10%/20%偏移带相关于100%和50%平均值,以及5倍值几乎为零,其转化成参考模型如下面所示的容许范围

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	40-60	40-60	0-9
P2	90-100	0-2	0-6
P3	0-7	90-100	0-8
P4	0-4	0-2	90-100
P5	40-60	0-8	40-60
P6	0-8	40-60	40-60

- 偏差的容许范围是可计算的,例如作为百分值(%)、绝对值,简单标准偏差的倍数或其组合。对于每个样品(参量),通道1(报告染料R1),通道2(报告染料R2)和通道3(报告染料R3)的信号分布通

过基于每个6倍测定值的6个平行的模拟数据组给出，如表（右侧）所示。表左侧显示了评估信号数据的随后步骤。

模拟分布				模拟数据组:				
	Ch1	Ch2	Ch3		Ch1	Ch2	Ch3	总值
P1	49,33	48,83	1,83	P1	52	48	0	100
P2	98,42	0,33	1,25		49	48	3	100
P3	1,42	97,00	1,58		47	52	1	100
P4	0,83	0,33	98,83		50	46	4	100
P5	48,17	1,67	50,17		48	49	3	100
P6	1,17	50,33	48,50		50	50	0	100
平均值 (算术)				P2	98	0	2	100
根据参考模型 (偏离)					97,5	0	2,5	100
					99	0	1	100
					100	0	0	100
P1	5,25	6,12	5,17		96	2	2	100
P2	4,69	2,45	3,25		100	0	0	100
P3	2,75	5,02	3,34	P3	1	96	3	100
P4	3,51	1,55	4,81		2	96	2	100
P5	7,92	6,75	7,92		2	97	1	100
P6	3,51	6,48	7,29		1	99	0	100
三倍标准偏差					0	99	0	100
根据参考模型 (偏离)					2,5	95	2,5	100
				P4	0	0	100	100
					0	0	100	100
P1	50	50	0		3	1	96	100
P2	100	0	0		1	0	99	100
P3	0	100	0		0	0	100	100
P4	0	0	100		1	1	98	100
P5	50	0	50	P5	46	6	48	100
P6	0	50	50		50	1	49	100
NFI参考模型					45	0	55	100
					52	0	48	100
					49	1	50	100
					47	2	51	100
P1	10,00	10,00	9,17	P6	0	50	50	100
P2	10,00	1,67	6,25		1	49	50	100
P3	7,08	10,00	7,92		1	53	46	100
P4	4,17	1,67	10,00		2	47	51	100
P5	10,00	8,33	10,00		3	52	45	100
P6	7,50	10,00	10,00		0	51	49	100

10%/20%偏移带相关于100%和50%的平均值，

因子5相关于0%的值，即参考模型的容许范围

- 对于P5，发现Ch1: Ch2: Ch3的分布接近50: 0: 50，平均值和分散值
5 都在容许范围内。这导致“P5-阳性”结果，意味着HBV单感染。

实施例4

如以上实施例1和2描述的主要考虑方面，50: 50的分布并不总是单

感染的有效指示。尽管已提到在几种应用中这些不明确结果不会发生，在许多其它情况下尤其是诊断应用中经常需要进一步的分析。为了容许进一步的分析，可使用例如从均相扩增方法中获得的附加曲线特性。这在图5所示的流程中反应出来，其中用到附加曲线特性如Ry染料的绝对SFI水平和NFI迹线特性（NFI比率恒定/变化；终分布的早期/晚期近似；偏移 $<1/>1$ ；等）来解析感染参量。

很显然在该实施例中分辨率会通过动态分析沿反应坐标的实时检测数据，而不是只考虑终点条件而显著增强。尤其对于样品S4-S6，单纯的终点分析只会造成诊断出单感染的风险，而全套的分析工具容许更准确的指定。例如在S5的情况中，终点NFI的分布类似HBV单感染，如实施例3，其中通过动态分析沿反应坐标的NFI分布，就可轻易的将错误指定“HBV单感染”排除，而以正确的指定“共感染，HIV-1-0+HCV”代替之，因为被有效扩增并以R3表示的HCV比扩增不如其有效并以R1表示的HIV-1-0更早得多给出了特异荧光强度（SFI）。因此，R1/R3图像迅速跌落低于50:50的基线，继续伴以阳性偏移，同时R1的产生有一些延迟，接近终分布。

实施例5

HBV单感染的实验数据

基因组靶物（HBV亚型A），剂量为25-5000拷贝/ml，利用PCT/EP00/11459中描述的磁性玻璃珠技术从血浆样品中提取内参结构体。洗提的核酸在AmpliLink®2.1版（Roche Molecular System）下操作的COBAS TaqMan™仪器上经均相实时Taqman-PCR进行特异扩增和检测。对于这里报告的基础研究，HBV特异性探针（编号JW144）的使用量为7.5pmol/100 μl，以FAM标记（ $\lambda_{EX} \approx 494\text{nm}$ ； $\lambda_{EM} \approx 518\text{nm}$ ），和7.5pmol/100 μl，以JA274标记（ $\lambda_{EX} \approx 580\text{nm}$ ； $\lambda_{EM} \approx 609\text{nm}$ ）。根据本发明结果被输出到MS Excel®7.0版进行进一步的数据分析（例如计算特异信号增益的有效循环范围[SFI>>AFI-BG噪音]，归一化信号强度，NFI比率和沿反应坐标的NFI迹线，NFI迹线图分类为恒定/偏移/正斜率变化/负斜率变化，以及结果的图像化表示）。

均相多重PCR反应利用特异于HIV-1M，HIV-10，HIV2，HCV和HBV的引物对和探针在标准的PCR条件下进行。

如图3，a-d₂所示，根据本发明的概念在同一个生化反应中（即

HBV-DNA的提取和扩增)形成的FAM和JA274信号表现为偶联的方式,即只要SFI水平显著突出于背景之上该信号就回摆于50:50的分布线。HBV剂量越高,越早产生该现象,并且保持恒定直至反应终点。这是最值得注意的,因为FAM和JA274在COBAS TaqMan™上测得的信号输出是非常不同的,就导入约11.5:1的归一化因子 $NF_{(JA274/FAM)}$ 。通过与FAM指示的相似反应相比,这进而会导致JA274指示的反应增强的分析灵敏度,即使使用该染料对在可测HBV剂量的下限获得50:50的NFI分布是很关键的(最差情况模型)!

利用实验建立的 $NF_{(JA274/FAM)}$ 将SFI转化为NFI,这些以由共同的生化反应生成的方式偶联的染料服从具有相当精确度的50:50的分布(见图4, b)。

实施例6

不同共感染的实验数据(类型I和类型IV)

步骤和试剂组如实施例5中所描述的,除了在此根据提取自共感染样品的靶物,在扩增/检测反应中消耗特异于HBV, HCV或HIV-1-0的探针。HBV探针以等量的FAM或JA274标记的寡核苷酸混合物被使用, HCV探针全部以FAM标记,而HIV-1-0探针全部以JA274标记。HBV+HCV阳性血浆样品和HBV+HIV-1-0阳性血浆样品是类型IV的共感染, HCV+HIV-1-0阳性是类型I的共感染。注意:对于HIV-1-0,由X倍稀释的培养物上清液给出滴定度;对于其他参量,精确定量[cp/ml]和标准化的材料都是可获得的。

从图4, a-d₂的标绘可以看出, NFI分布本身和沿反应坐标的NFI迹线与来自单感染的的结果是非常不同的。例如,图4, a中的反应#1-12显示HBV(扩增得很好;未包括逆转录步骤)和HCV(扩增得好,比HBV稍慢,经过逆转录PCR;HCV靶物由于显著的二级结构而不易进入)具有低且接近相等的滴定度。因此,在特异反应开始之后很快 $SFI_{(FAM)}$ 和 $SFI_{(JA274)}$ 经HBV反应大量产生,并且 $NFI_{(JA274/FAM)}$ 比率趋向于接近50:50的分布线(=1)。随着循环进行, HCV稍延迟起反应,附加的 $SFI_{(FAM)}$ 形成,使 $NFI_{(JA274/FAM)}$ 比率在平衡线以下且图像具有负斜率。图4, a的反应#13-24显示低剂量HBV感染加上HCV剂量100倍过量的特征,导致有效循环范围的转移提前开始, $NFI_{(JA274/FAM)}$ 比率图像急速冲下平衡线然后缓慢以正斜率上升,随之高剂量HCV反应形成的 $SFI_{(FAM)}$ 超过低剂量HBV反应

的 $SFI_{(FAM)}$ 和 $SFI_{(JA274)}$ 的“偶联”形成,这使得 $NFI_{(JA274/FAM)}$ 比率逐渐升高。

因此,以图1+2所说明的有序方式应用来自实施例2(第25-26页)的标准,分析将产生“共感染HBV+HCV”。这甚至在大多数利用高剂量HBV和低剂量HCV(高水平的 $SFI_{(FAM)}$ 和 $SFI_{(JA274)}$ 加少量附加的单独的 $SFI_{(FAM)}$,见图4, d)或高剂量HBV和低剂量HIV-1-0(高水平的 $SFI_{(FAM)}$ 和 $SFI_{(JA274)}$ 加极少量附加的单独的 $SFI_{(JA274)}$,见图4, c; 反应#7-24)的组合的反应中保持正确。在一些情况中,尤其在采用后一设置时,目测的NFI曲线形状和初步数学描述符(NFI终点比率, NFI迹线特性, 绝对SFI水平等)与指示单感染的那些很接近。这可以通过化学的(使用发射强度大约相似的染料,即NFI比率更稳定而不依赖于靶物剂量和绝对信号形成的伴随水平), 数学的(分别适于分析初级生长和次级NFI曲线的更先进的统计工具), 以及技术的方式(针对快速循环而特别设计的TC阻断和操作系统配置, 如这里所用的TC分布曲线; 这有助于使初级生长曲线平滑, 进而稳定NFI比率迹线图像)改善。

更甚者, 图4, b(反应#13-24)和图4, c(反应#1-6)显示类型I的共感染实例, 即HCV加HIV-1-0的情况, 其导致“非偶联的” $SFI_{(FAM)}$ 和 $SFI_{(JA274)}$ 形成。随后, NFI比率迹线图延伸, 并保持远平衡线之下, 因为HCV扩增比HIV-0-1好得多(尤其是内多态性影响引物/探针结合位点的后果)。此外, HIV-1-0单独形成的JA274特异信号强度远低于HBV单感染形成的信号这再一次与理论相吻合。这有助于进一步区别共感染和单感染。

总之, 类型IV共感染更难从单感染中区别开来, 尤其当高剂量的参量5(针对R1[Ry]和R3[Rx]产生高SFI水平)与非常低剂量的参量2(只形成很少的附加R1)组合时, 但在多数情况下, 就像在初步检测系统中即使使用相当简单的数学标准和“最坏情况模型”染料对时也是可能发生的。在类型IV共感染中组合2种很好扩增的靶物, 比如参量5[用R1+R3指示]和参量4[用R3指示]因为非同步且不对称地加入高含量的R3强度, 就显出较少不明确。如果参量4相对于参量5的相对丰度可以忽略不计, 则可以观察到类似的分辨率极限。与包含参量2的(如预期的)的类型IV共感染相反, 类型I共感染更易从通过相同的但经过生化偶联染料对指示的单感染中区别出来。这明显体现在NFI比率的终点水平和沿反应坐标的NFI迹线上, 以及显著较低的R1[Ry]染料信号强

度。是由于大部分R3强度通过参量4形成，既使其剂量很低，同时产生自参量2特异探针断裂的R1强度大多很低并且在60个循环的过程中形成的相当晚。所以，由于几乎不可避免的初始滴定度，或提取/洗提/扩增效率的差异，在整个反应中不可能产生50:50的信号分布。

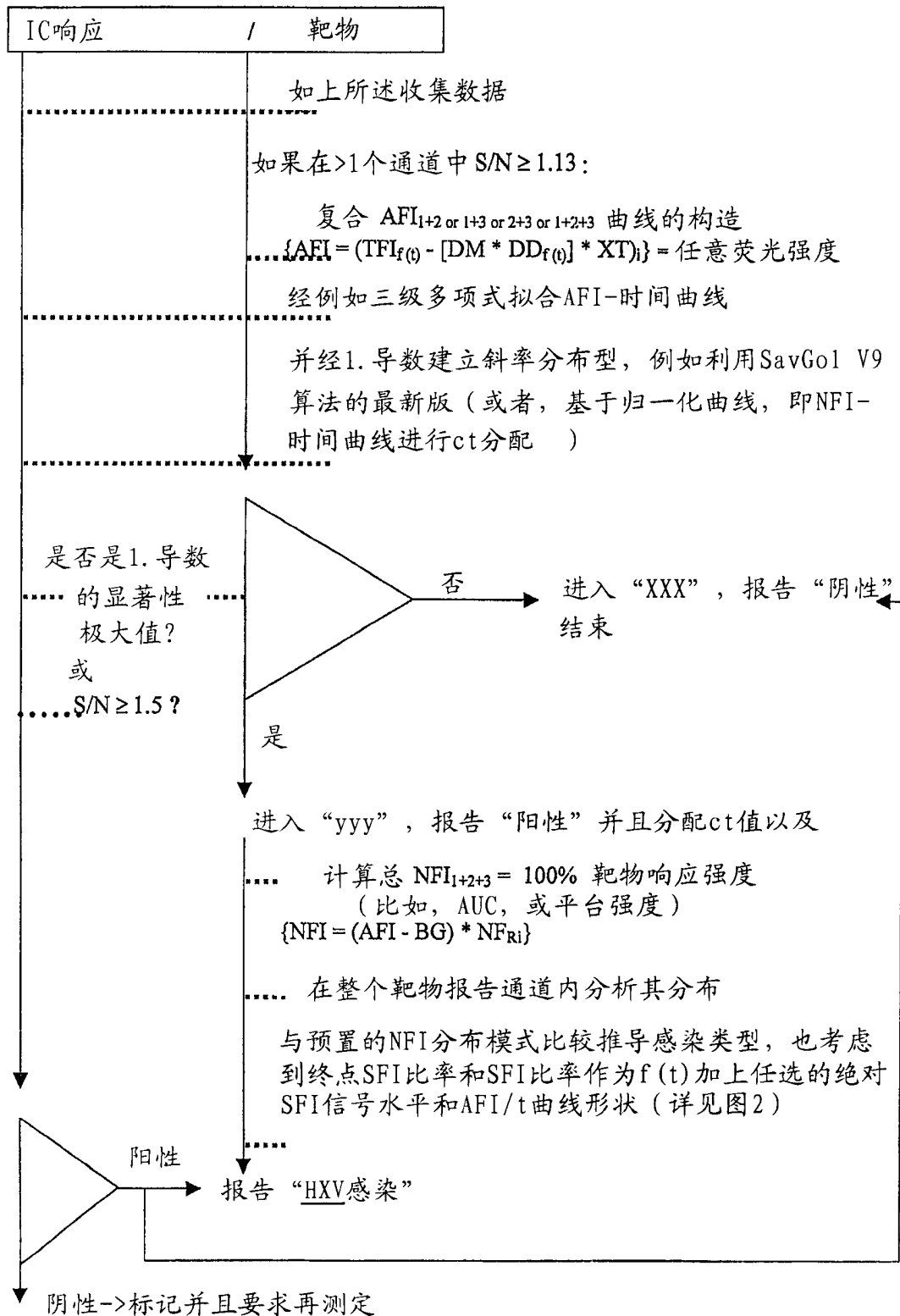
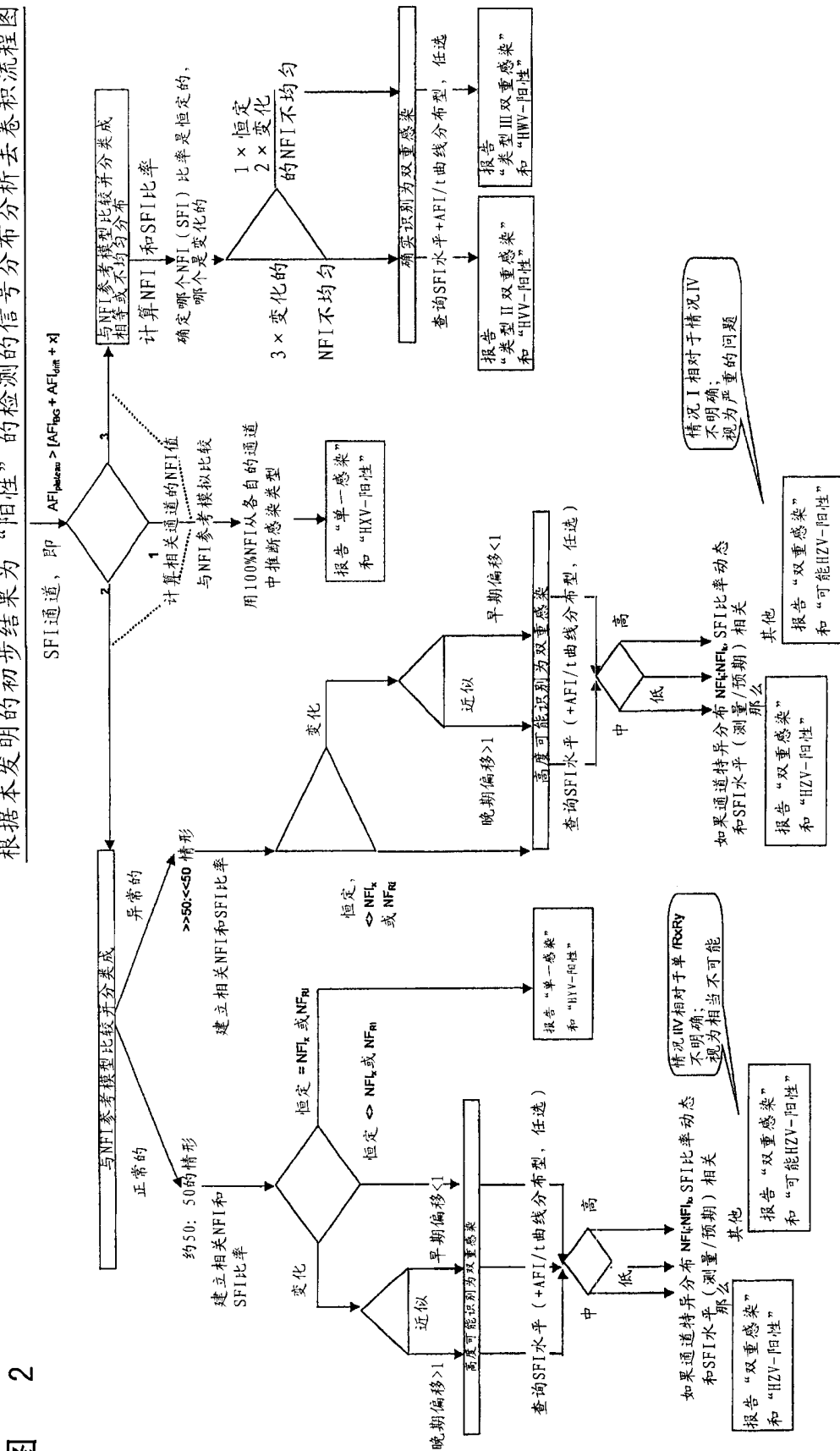
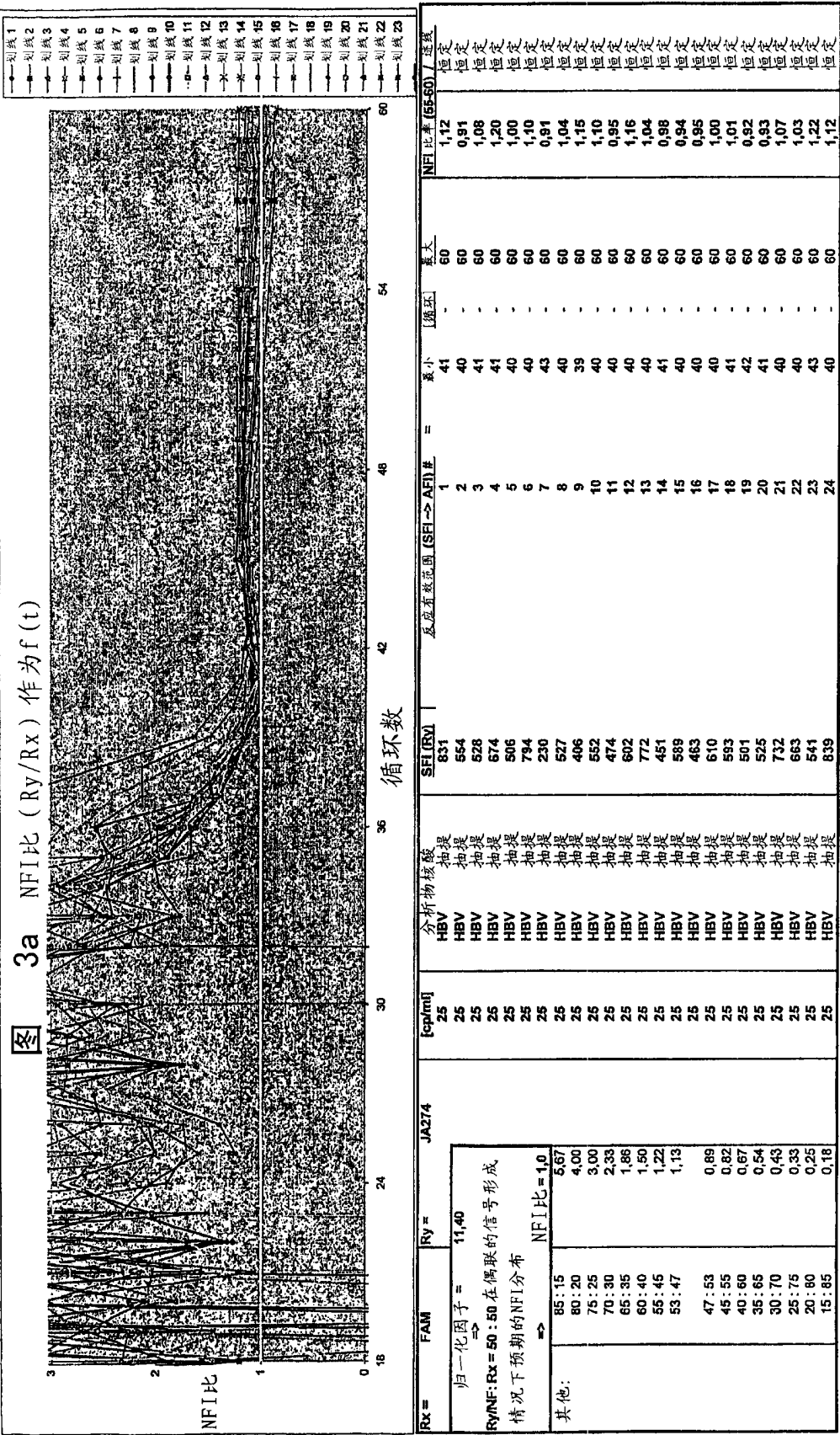
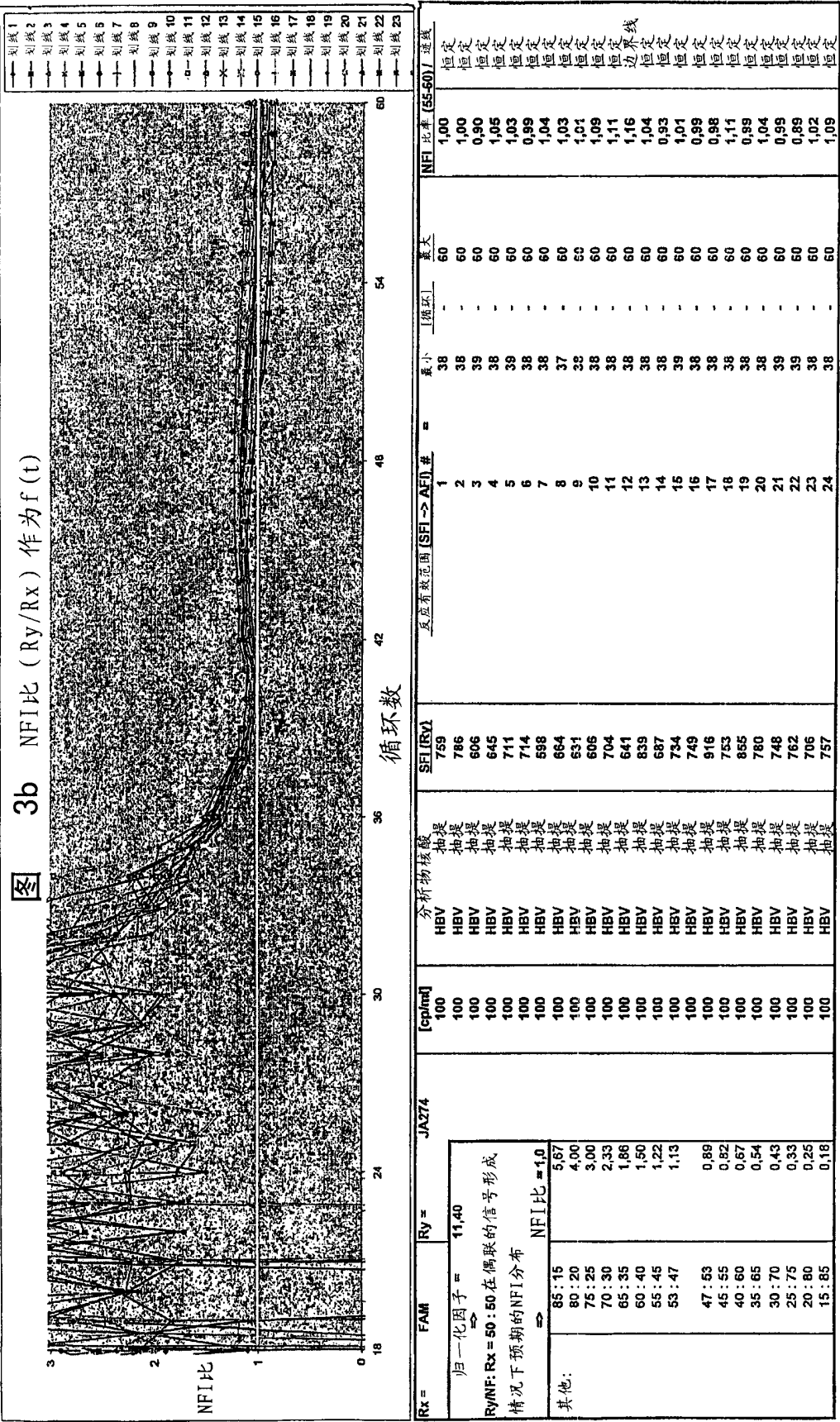


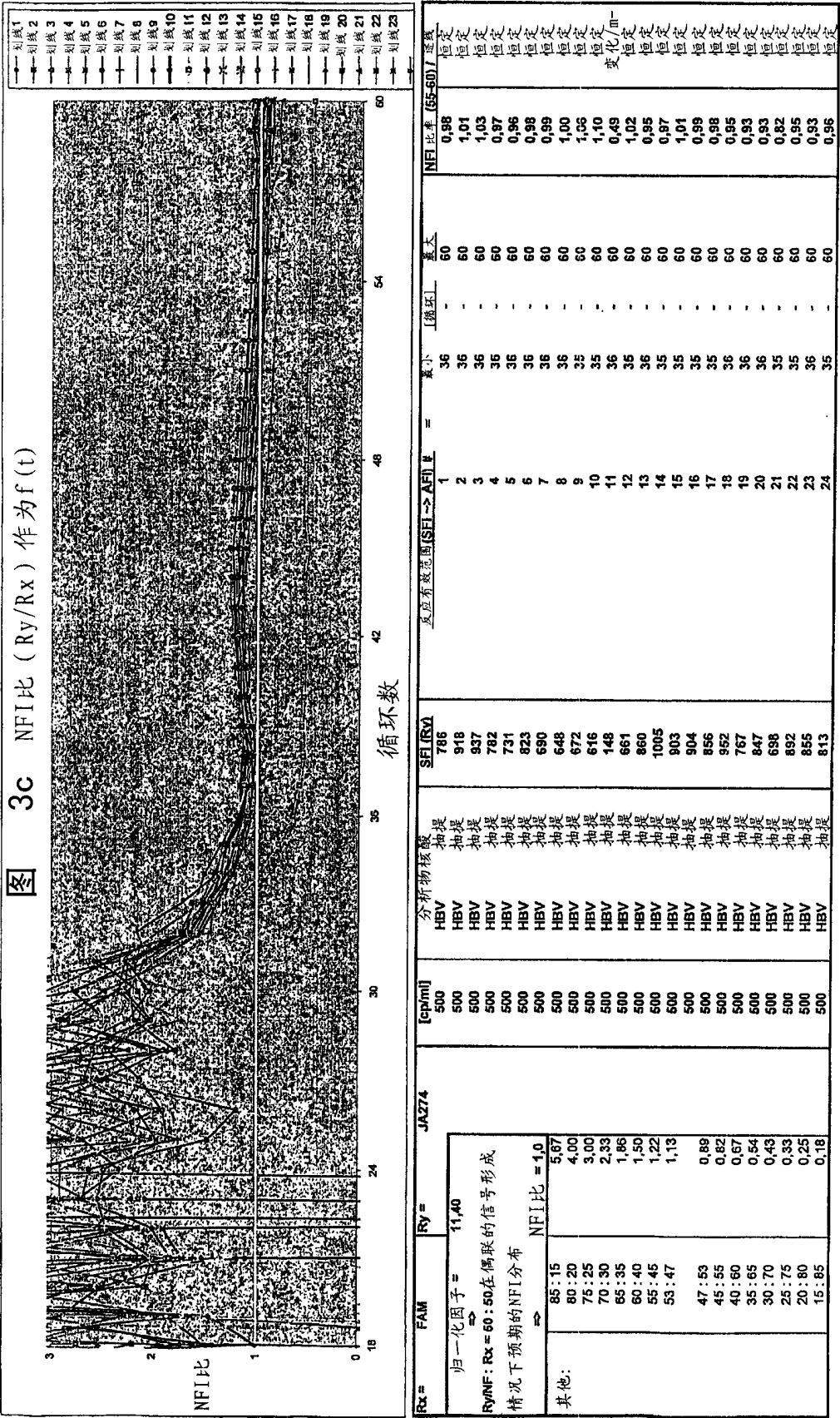
图 1

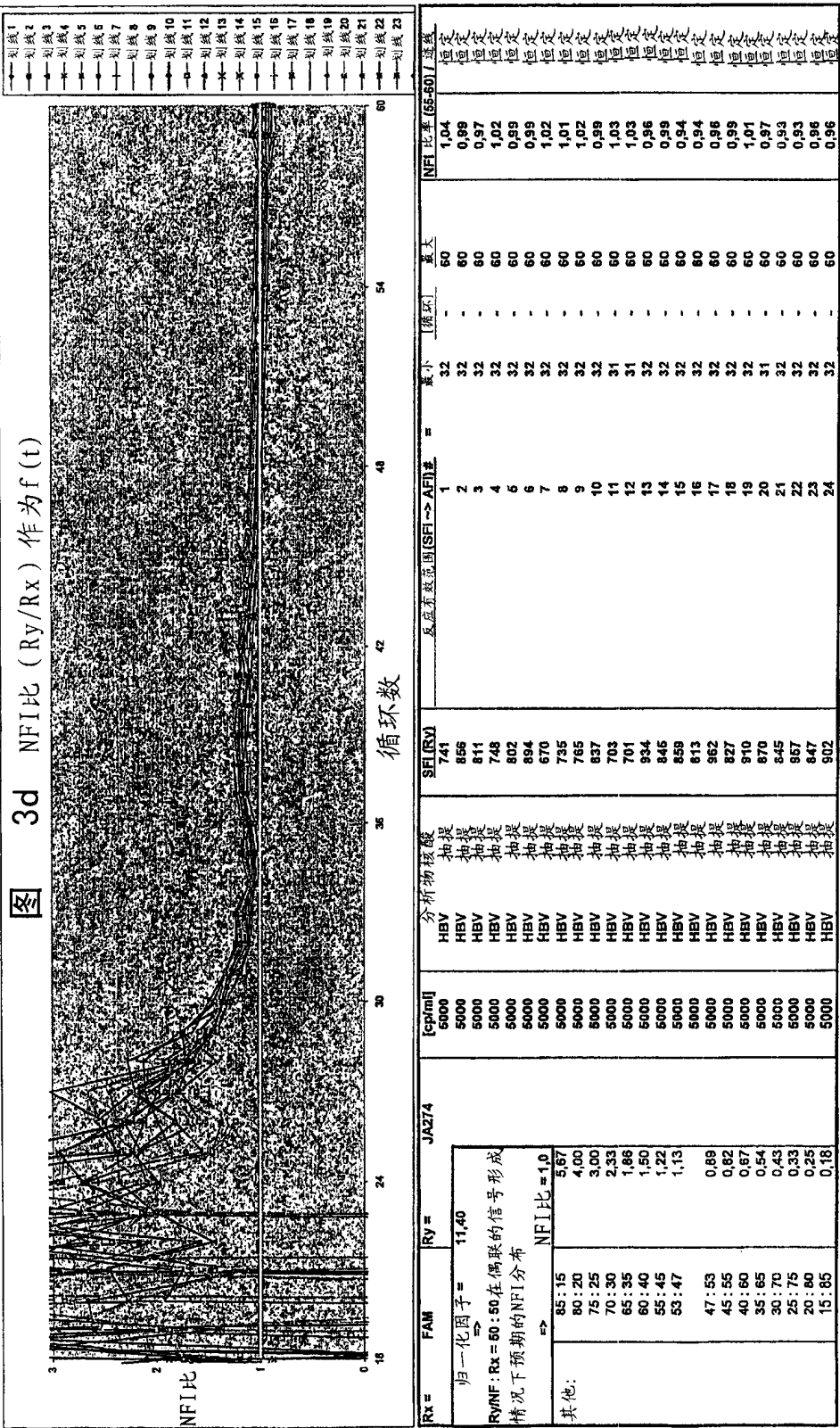
根据本发明的初步结果为“阳性”的检测的信号分布分析去卷积流程图

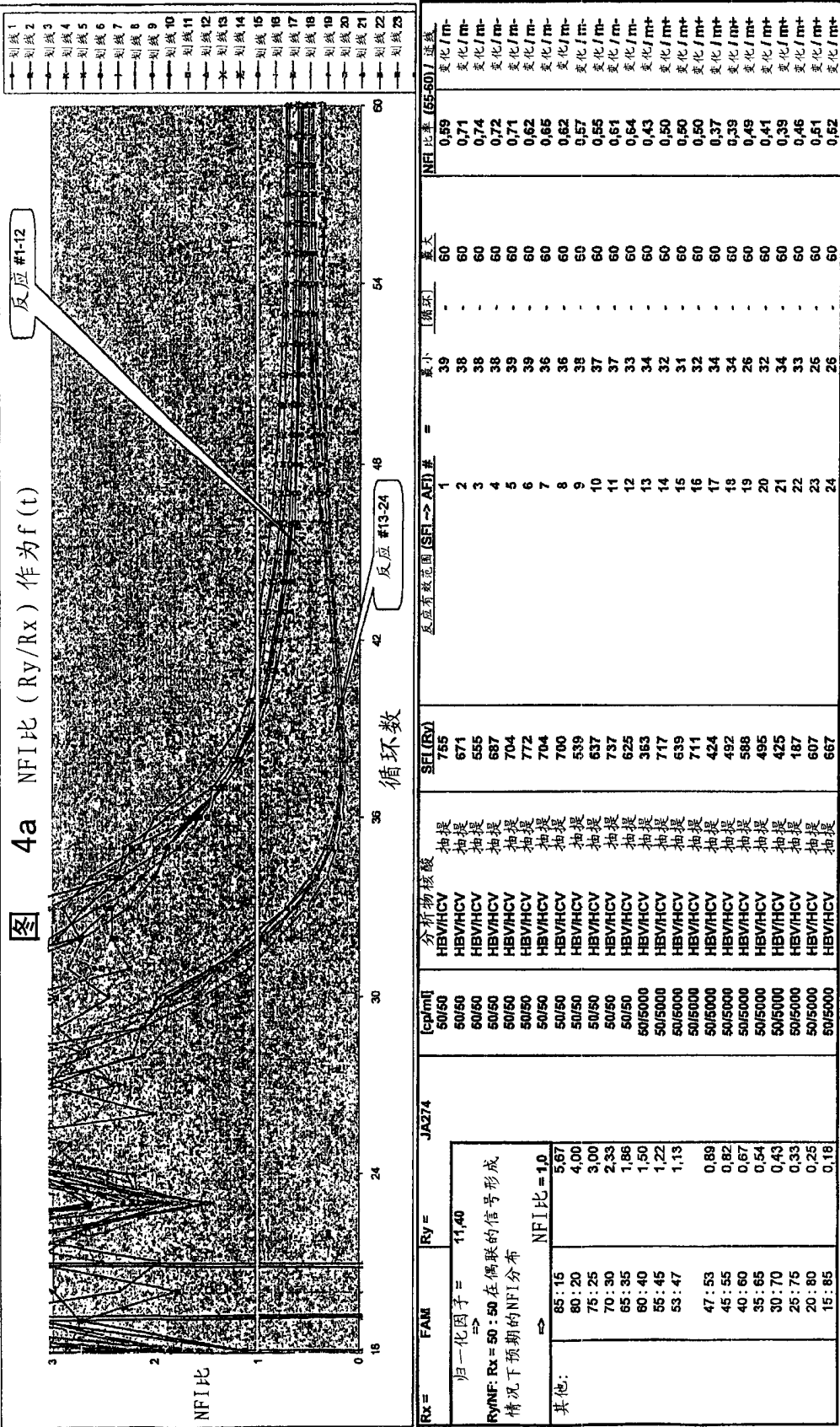


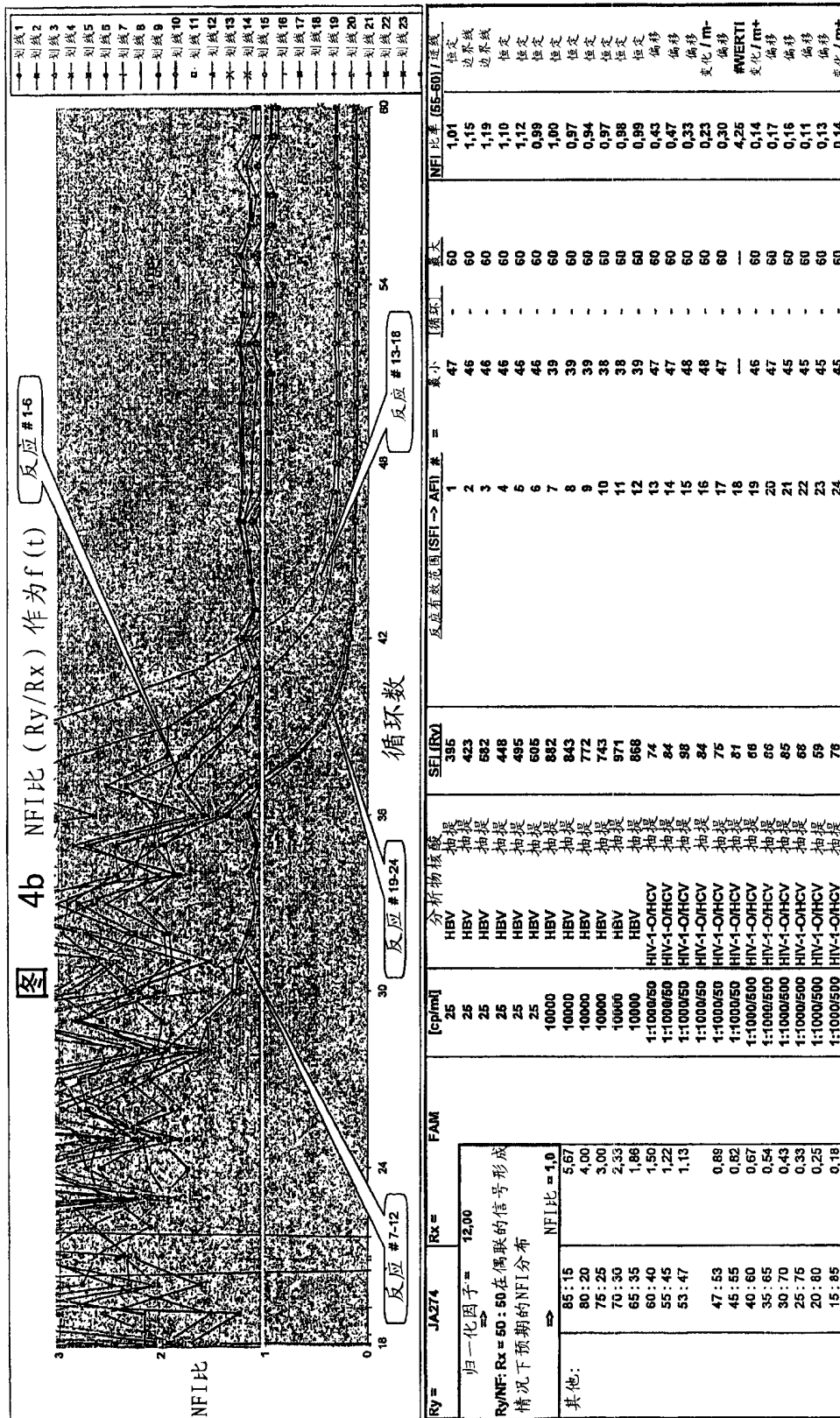


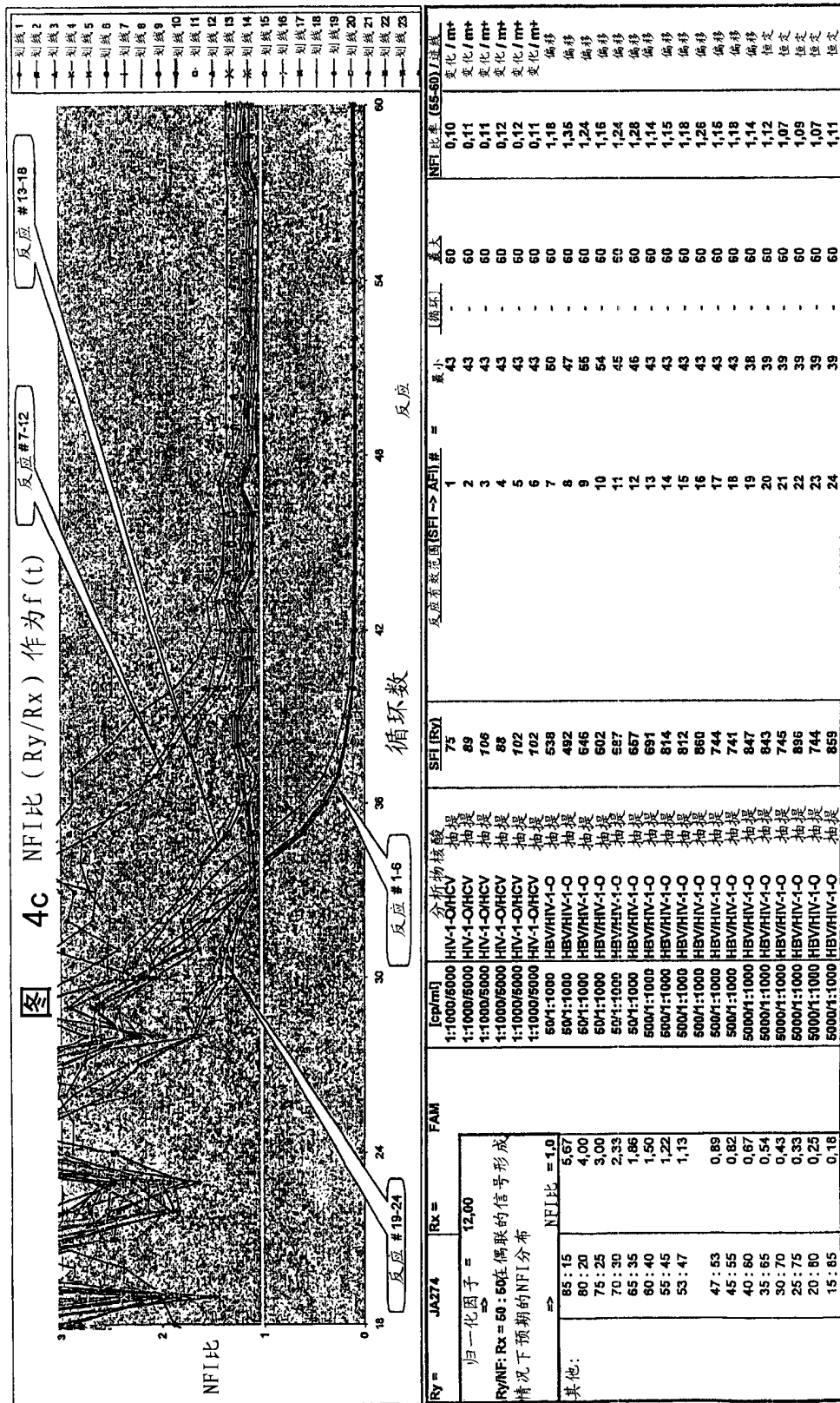












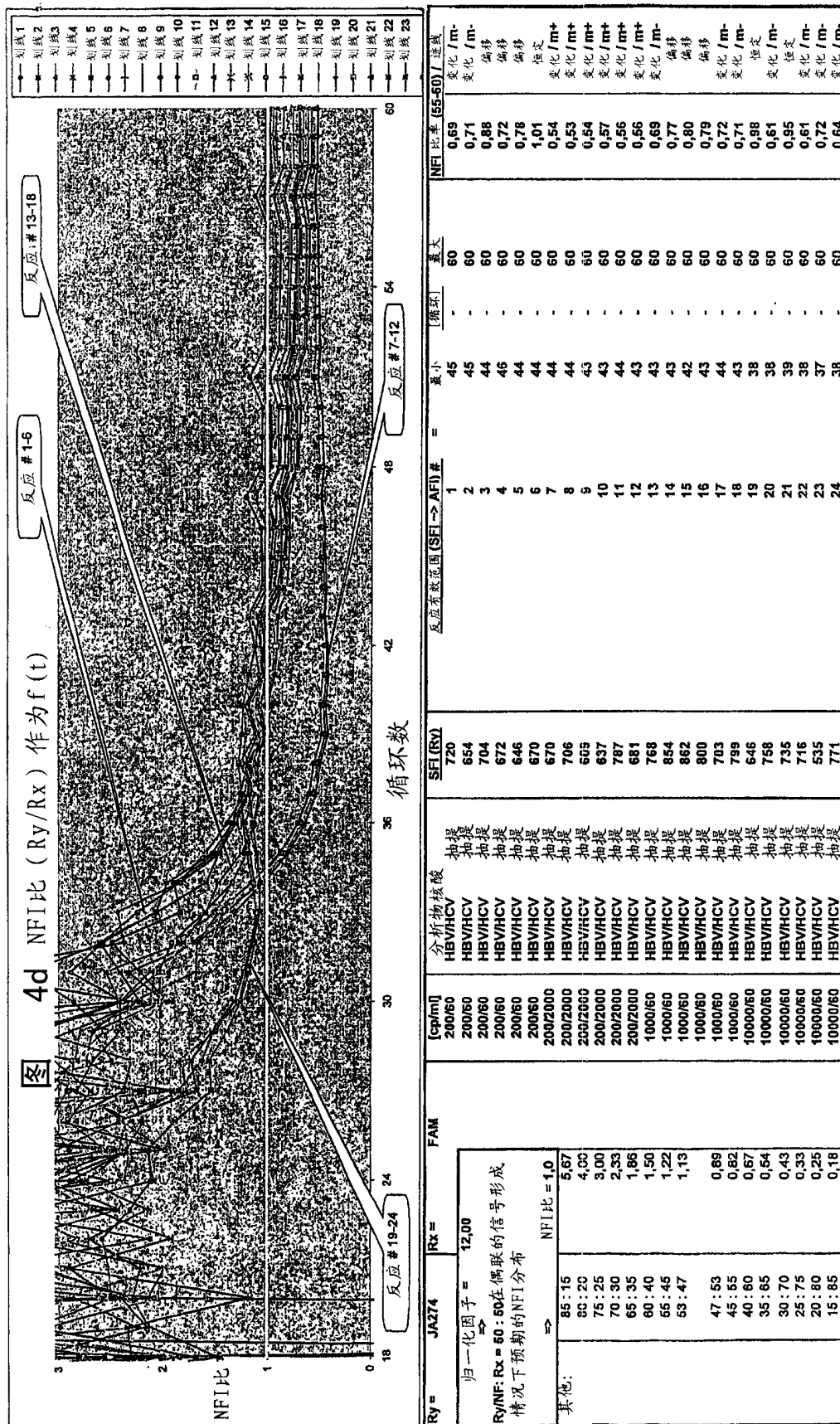


图 5 我们考虑了有可能模糊的样品的表格

