



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112424377 A

(43) 申请公布日 2021.02.26

(21) 申请号 201980040830.8

(22) 申请日 2019.04.16

(30) 优先权数据

62/659,025 2018.04.17 US

62/659,027 2018.04.17 US

62/693,754 2018.07.03 US

62/753,782 2018.10.31 US

62/804,574 2019.02.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/027751 2019.04.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/204357 EN 2019.10.24

(71) 申请人 克罗玛科德公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 克里斯多佛·麦克唐纳

阿迪蒂亚·拉贾戈帕

多米尼克·尤尔克

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 陆扬 韦昌金

(51) Int.Cl.

G12Q 1/6851 (2006.01)

G12Q 1/686 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

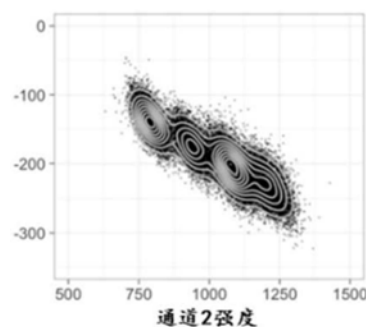
权利要求书7页 说明书27页 附图27页

(54) 发明名称

用于多重分析的方法和系统

(57) 摘要

本公开提供了用于多重定量的方法和组合物。在一些方面,提供了用于对来自生物样品的核酸靶标进行定量的方法和组合物。所公开的方法可用于鉴别或检测受试者的遗传异常。



1. 一种对样品中的核酸靶标进行定量的方法,该方法包括:
 - (a) 提供混合物,其包含:
 - i. 衍生自和/或对应于所述核酸靶标的多个核酸分子;以及
 - ii. 多个寡核苷酸探针,每个寡核苷酸探针对应于所述核酸靶标的不同区域;
 - (b) 将所述混合物分配到多个分区中;
 - (c) 在所述多个分区中生成多个信号,其中所述多个信号在一个颜色通道中是可检测的,并且其中所述多个信号中的至少一个信号对应于所述多个分区的分区中所述多个核酸分子中的两个或更多个核酸分子的独特组合;
 - (d) 在所述颜色通道中从所述多个分区的多分区中检测所述多个信号;以及
 - (e) 基于所述检测,对所述样品中的所述核酸靶标进行定量。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多个信号的至少一部分是由所述多个寡核苷酸探针生成的。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品进一步包含 (iii) 衍生自和/或对应于另外的核酸靶标的另外的多个核酸分子,以及 (iv) 另外的多个寡核苷酸探针,其中每一个对应于所述另外的核酸靶标的不同区域。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述多个信号的至少一部分是由所述多个寡核苷酸探针和所述另外的多个寡核苷酸探针生成的。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品来源于生物样品。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述生物样品是血液或血浆。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述核酸靶标是染色体。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述染色体是21号染色体、18号染色体、15号染色体、13号染色体、X染色体或Y染色体。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中 (c) 包括扩增所述多个核酸分子,从而生成所述多个信号。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述扩增包括聚合酶链反应。
11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述扩增使所述多个寡核苷酸探针降解,从而生成所述多个信号。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多个寡核苷酸探针被核酸酶降解,从而从所述多个寡核苷酸探针中的每一个释放信号标签,并生成所述多个信号。
13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多个信号是多个荧光信号或多个化学发光信号。
14. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多个寡核苷酸探针各自与所述核酸靶标的不同区域结合。
15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多个信号中的所述至少一个唯一地对应于在所述分区中存在所述多个核酸分子中的恰好两个。
16. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多个信号中的至少一个信号对应于所述多个核酸分子的两个或更多个独特组合。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述多个信号中的所述至少一个信号 (A) 对应于

所述多个核酸分子之一的存在,并且(B)对应于所述多个核酸分子中的两个核酸分子的存在。

18.根据权利要求3-17中任一项所述的方法,其中所述多个信号的至少一部分是由所述多个寡核苷酸探针生成的。

19.根据权利要求18所述的方法,其中所述样品进一步包含(iii)衍生自和/或对应于另外的核酸靶标的另外的多个核酸分子,以及(iv)另外的多个寡核苷酸探针,其中每一个对应于所述另外的核酸靶标的不同区域。

20.根据权利要求19所述的方法,其中所述多个信号的至少一部分是由所述多个寡核苷酸探针和所述另外的多个寡核苷酸探针生成的。

21.根据权利要求18-20中任一项所述的方法,其中所述样品来源于生物样品。

22.根据权利要求21所述的方法,其中所述生物样品是血液或血浆。

23.根据权利要求18-22中任一项所述的方法,其中所述核酸靶标是染色体。

24.根据权利要求23所述的方法,其中所述染色体是21号染色体、18号染色体、15号染色体、13号染色体、X染色体或Y染色体。

25.根据权利要求18-24中任一项所述的方法,其中(c)包括扩增所述多个核酸分子,从而生成所述多个信号。

26.根据权利要求25所述的方法,其中所述扩增包括聚合酶链反应。

27.根据权利要求25所述的方法,其中所述扩增使所述多个寡核苷酸探针降解,从而生成所述多个信号。

28.根据权利要求18-27中任一项所述的方法,其中所述多个寡核苷酸探针被核酸酶降解,从而从所述多个寡核苷酸探针中的每一个释放信号标签,并生成所述多个信号。

29.根据权利要求18-28中任一项所述的方法,其中所述多个信号是多个荧光信号或多个化学发光信号。

30.根据权利要求18-29中任一项所述的方法,其中所述多个寡核苷酸探针各自与所述核酸靶标的不同区域结合。

31.根据权利要求18-30中任一项所述的方法,其中所述多个信号中的所述至少一个唯一地对应于在所述分区中存在所述多个核酸分子中的恰好两个。

32.根据权利要求18-31中任一项所述的方法,其中所述多个信号中的至少一个信号对应于所述多个核酸分子的两个或更多个独特组合。

33.根据权利要求32所述的方法,其中所述多个信号中的所述至少一个信号(A)对应于所述多个核酸分子之一的存在,并且(B)对应于所述多个核酸分子中的两个核酸分子的存在。

34.一种对样品中的第一核酸靶标和第二核酸靶标进行定量的方法,该方法包括:

(a)提供混合物,其包含:

- i.衍生自和/或对应于所述第一核酸靶标的第一多个核酸分子;
- ii.衍生自和/或对应于所述第二核酸靶标的第二多个核酸分子;
- iii.第一多个寡核苷酸探针,每个探针对应于所述第一核酸靶标的不同区域;以及
- iv.第二多个寡核苷酸探针,每个探针对应于所述第二核酸靶标的不同区域;

(b)将所述混合物分配到多个分区中;

(c) 在所述多个分区中生成多个信号,其中所述多个信号在一个颜色通道中是可检测的;

(d) 在所述颜色通道中从所述多个分区的多分区中检测所述多个信号;以及

(e) 基于所述检测,对所述样品中的所述第一核酸靶标和所述第二核酸靶标进行定量。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述多个信号是由所述第一多个寡核苷酸探针和所述第二多个寡核苷酸探针生成的。

36. 根据权利要求34或35所述的方法,其中所述多个信号中的至少一个对应于所述多个分区的分区中所述多个第一核酸分子和/或所述多个第二核酸分子中的两个或更多个的独特组合。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述多个信号中的所述至少一个唯一地对应于在所述分区中存在所述第一多个核酸分子或所述第二多个核酸分子中的恰好两个。

38. 根据权利要求34-37中任一项所述的方法,其中所述定量包括确定所述样品中所述第一核酸靶标与所述第二核酸靶标之比。

39. 根据权利要求34-38中任一项所述的方法,其中所述定量包括确定所述样品中所述第一核酸靶标和所述第二核酸靶标的绝对量。

40. 根据权利要求34-39中任一项所述的方法,其中所述定量包括确定所述样品中所述第一核酸靶标和所述第二核酸靶标的相对量,其中所述相对量是相对于参考值的量。

41. 根据权利要求34-40中任一项所述的方法,其中所述样品来源于生物样品。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述生物样品是血液或血浆。

43. 根据权利要求34-42中任一项所述的方法,其中所述核酸靶标是染色体。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述染色体是21号染色体、18号染色体、15号染色体、13号染色体、X染色体或Y染色体。

45. 根据权利要求34-44中任一项所述的方法,其中(c)包括扩增所述多个核酸分子,从而生成所述多个信号。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述扩增包括聚合酶链反应。

47. 根据权利要求45所述的方法,其中所述扩增使所述多个寡核苷酸探针降解,从而生成所述多个信号。

48. 根据权利要求34-47中任一项所述的方法,其中所述多个寡核苷酸探针被核酸酶降解,从而从所述多个寡核苷酸探针中的每一个释放信号标签,并生成所述多个信号。

49. 根据权利要求34-48中任一项所述的方法,其中所述多个信号是多个荧光信号或多个化学发光信号。

50. 根据权利要求34-49中任一项所述的方法,其中所述多个寡核苷酸探针各自与所述核酸靶标的不同区域结合。

51. 根据权利要求34-50中任一项所述的方法,其中所述多个信号中的至少一个信号对应于所述第一多个核酸分子和/或所述第二多个核酸分子的两个或更多个独特组合。

52. 一种对样品中的靶核酸分子进行定量的方法,该方法包括:

(a) 将多个核酸分子分配到多个分区中;

(b) 在所述多个分区中扩增所述多个核酸分子,从而生成多个信号;

(c) 检测所述多个信号;

(d) 基于所述检测,对所述多个分区中的每个分区确定所述多个核酸分子中的一个或多个核酸分子存在于所述分区中的概率,从而生成多个概率;以及

(e) 基于所述多个概率的函数,对所述样品中的所述靶核酸分子进行定量。

53. 根据权利要求52所述的方法,其中所述方法不包括确定所述多个分区的任何单个成员中的核酸分子数目的步骤。

54. 根据权利要求52或53所述的方法,其中所述方法不包括确定包含与所述靶核酸分子相对应的核酸序列的分区数目的步骤。

55. 根据权利要求52-54中任一项所述的方法,其中所述函数是和。

56. 根据权利要求52-55中任一项所述的方法,其中所述多个核酸分子衍生自、对应于所述靶核酸分子,或者是所述靶核酸分子的成员。

57. 根据权利要求52-56中任一项所述的方法,其中所述扩增包括聚合酶链反应。

58. 根据权利要求52-57中任一项所述的方法,其中所述多个信号是多个荧光信号或多个化学发光信号。

59. 根据权利要求52-58中任一项所述的方法,其中(a)进一步包括将对应于所述多个核酸分子的多个寡核苷酸探针分配到所述多个分区中。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述多个信号的至少一部分由所述多个寡核苷酸探针生成。

61. 根据权利要求59或60所述的方法,其中所述扩增使所述多个寡核苷酸探针降解,从而生成所述多个信号。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述多个寡核苷酸探针被核酸酶降解,从而从所述多个寡核苷酸探针中的每一个释放信号标签,并生成所述多个信号。

63. 根据权利要求52-62中任一项所述的方法,其中所述样品来源于生物样品。

64. 根据权利要求63所述的方法,其中所述生物样品是血液或血浆。

65. 一种对样品中的靶核酸分子进行定量的方法,该方法包括:

(a) 将多个核酸分子分配到多个分区中;

(b) 在所述多个分区中扩增所述多个核酸分子,从而生成多个信号;

(c) 检测所述多个信号;

(d) 将所述多个信号的成员相互比较;以及

(e) 基于所述比较,对所述样品中的所述靶核酸分子进行定量,

所述方法不包括在所述多个分区的任何单个成员中对所述多个核酸分子进行定量的步骤。

66. 根据权利要求65所述的方法,其中所述比较包括从所述多个信号生成一个或多个信号分布曲线,并分析所述一个或多个信号分布曲线。

67. 根据权利要求66所述的方法,其中所述分析包括针对所述一个或多个信号分布曲线中的每一个测量曲线下面积(AUC)。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中(d)包括将所述AUC与参考值进行比较。

69. 根据权利要求67所述的方法,其中所述一个或多个信号分布曲线包括多个信号分布曲线,其中(d)包括将所述一个或多个信号分布曲线中的每一个的AUC相互比较。

70. 根据权利要求65-69中任一项所述的方法,其中所述多个核酸分子衍生自、对应于

所述靶核酸分子,或者是所述靶核酸分子的成员。

71.根据权利要求65-70中任一项所述的方法,其中所述扩增包括聚合酶链反应。

72.根据权利要求65-71中任一项所述的方法,其中所述多个信号是多个荧光信号或多个化学发光信号。

73.根据权利要求65-72中任一项所述的方法,其中(a)进一步包括将对应于所述多个核酸分子的多个寡核苷酸探针分配到所述多个分区中。

74.根据权利要求73所述的方法,其中所述多个信号的至少一部分由所述多个寡核苷酸探针生成。

75.根据权利要求73或74所述的方法,其中所述扩增使所述多个寡核苷酸探针降解,从而生成所述多个信号。

76.根据权利要求73或74所述的方法,其中所述多个寡核苷酸探针被核酸酶降解,从而从所述多个寡核苷酸探针中的每一个释放信号标签,并生成所述多个信号。

77.根据权利要求65-76中任一项所述的方法,其中所述样品来源于生物样品。

78.根据权利要求77所述的方法,其中所述生物样品是血液或血浆。

79.一种相对于样品中第二靶核酸的量确定第一靶核酸的量的方法,该方法包括:

(a)提供混合物,其包含:

i.衍生自和/或对应于所述第一靶核酸的第一多个核酸分子;以及

ii.衍生自和/或对应于所述第二靶核酸的第二多个核酸分子;

(b)将所述混合物分配到多个分区中;

(c)在所述多个分区中扩增所述第一多个核酸分子和所述第二多个核酸分子,从而生成多个信号;

(d)检测所述多个信号;以及

(e)基于所述检测,确定代表所述样品中所述第一靶核酸的量相对于所述第二靶核酸的量的比率,

所述方法不包括在所述多个分区的任何单个成员中对所述第一多个核酸分子或所述第二多个核酸分子进行定量的步骤。

80.根据权利要求79所述的方法,其进一步包括基于所述比率对所述样品中的所述第一靶核酸和所述第二靶核酸进行定量。

81.根据权利要求79或80所述的方法,其中所述比率代表胎儿分数。

82.根据权利要求79-81中任一项所述的方法,其中所述第一核酸靶标是第一染色体。

83.根据权利要求79-82中任一项所述的方法,其中所述第二核酸靶标是第二染色体。

84.根据权利要求79-83中任一项所述的方法,其中所述第一核酸靶标来源于第一生物体。

85.根据权利要求79-84中任一项所述的方法,其中所述第二核酸靶标来源于第二生物体。

86.根据权利要求79-85中任一项所述的方法,其中所述扩增包括聚合酶链反应。

87.根据权利要求79-86中任一项所述的方法,其中所述多个信号是多个荧光信号或多个化学发光信号。

88.根据权利要求79-87中任一项所述的方法,其中所述样品进一步包含(iii)与所述

第一多个核酸分子相对应的第一多个寡核苷酸探针,和(iv)与所述第二多个核酸分子相对应的第二多个寡核苷酸探针。

89.根据权利要求88所述的方法,其中所述多个信号的至少一部分是由所述第一多个寡核苷酸探针和所述第二多个寡核苷酸探针生成的。

90.根据权利要求88或89所述的方法,其中所述扩增使所述第一多个寡核苷酸探针和所述第二多个寡核苷酸探针降解,从而生成所述多个信号。

91.根据权利要求88或89所述的方法,其中所述第一多个寡核苷酸探针和所述第二多个寡核苷酸探针被核酸酶降解,从而从所述多个寡核苷酸探针中的每一个释放信号标签,并生成所述多个信号。

92.根据权利要求79-91中任一项所述的方法,其中(d)包括从所述多个信号生成信号图。

93.根据权利要求92所述的方法,其中所述信号图包含重叠区域。

94.根据权利要求92所述的方法,其中所述信号图包含多个目标群体。

95.根据权利要求94所述的方法,其中所述多个目标群体的至少一部分彼此重叠。

96.根据权利要求79-95中任一项所述的方法,其中所述比率是使用峰值最小阈值化模型计算的。

97.根据权利要求79-96中任一项所述的方法,其中所述比率是使用中点阈值化模型计算的。

98.根据权利要求79-97中任一项所述的方法,其中所述比率是使用部分概率求和模型计算的。

99.根据权利要求79-98中任一项所述的方法,其中所述比率是使用直接概率求和模型计算的。

100.根据权利要求79-99中任一项所述的方法,其中所述样品来源于生物样品。

101.根据权利要求100所述的方法,其中所述生物样品是血液或血浆。

102.根据权利要求79-101中任一项所述的方法,其中所述第一多个核酸分子是所述第一核酸靶标的拷贝,并且其中所述第一多个核酸分子已经从所述样品转移到所述混合物中。

103.根据权利要求79-102中任一项所述的方法,其中所述第二多个核酸分子是所述第二核酸靶标的拷贝,并且其中所述第二多个核酸分子已经从所述样品转移到所述混合物中。

104.根据权利要求79-103中任一项所述的方法,其中所述第一多个核酸分子和所述第二多个核酸分子源自所述样品。

105.根据权利要求79-104中任一项所述的方法,其中所述第一多个核酸分子是所述第一靶核酸的核酸扩增产物。

106.根据权利要求79-104中任一项所述的方法,其中所述第二多个核酸分子是所述第二靶核酸的核酸扩增产物。

107.根据权利要求79-104中任一项所述的方法,其中所述第一多个核酸分子是所述第一靶核酸的核酸延伸产物。

108.根据权利要求79-104中任一项所述的方法,其中所述第二多个核酸分子是所述第

二靶核酸的核酸延伸产物。

109. 根据权利要求79-104中任一项所述的方法, 其中所述第一多个核酸分子是所述第一靶核酸的逆转录产物。

110. 根据权利要求79-104中任一项所述的方法, 其中所述第二多个核酸分子是所述第二靶核酸的逆转录产物。

用于多重分析的方法和系统

交叉引用

[0001] 本申请要求2018年4月17日提交的第62/659,025号美国临时专利申请、2018年4月17日提交的第62/659,027号美国临时申请、2018年7月3日提交的第62/693,754号美国临时申请、2018年10月31日提交的第62/753,782号美国临时申请和2019年2月12日提交的第62/804,574号美国临时申请的权益和优先权,所述临时申请均为所有目的通过引用整体并入本文。

背景技术

[0002] 数字PCR(dPCR)是用于核酸靶标的检测和定量的有用方法。使用标记的寡核苷酸探针使得能够对分区(例如,小液滴、微孔)中存在的靶标进行特异性检测。dPCR方法可包括创建空间解析的荧光点簇,并在簇之间绘制截断值或阈值,以确定单个分区是否含有目的靶标。

发明内容

[0003] 在一些方面,本文公开了多重定量方法,其中对反应中存在的靶标的浓度进行定量不需要对各个分区进行分类。

[0004] 在一方面,本文公开了一种对样品中的核酸靶标进行定量的方法,该方法包括:(a)提供混合物,其包含:(i)衍生自和/或对应于所述核酸靶标的多个核酸分子;以及(ii)多个寡核苷酸探针,每个寡核苷酸探针对应于所述核酸靶标的不同区域;(b)将所述混合物分配到多个分区中;(c)在所述多个分区中生成多个信号,其中所述多个信号在一个颜色通道中是可检测的,并且其中所述多个信号中的至少一个信号对应于所述多个分区的分区中所述多个核酸分子中的两个或更多个核酸分子的独特组合;(d)在所述颜色通道中从所述多个分区的多分区中检测所述多个信号;以及(e)基于所述检测,对所述样品中的所述核酸靶标进行定量。在一些实施方案中,所述多个信号的至少一部分是由所述多个寡核苷酸探针生成的。在一些实施方案中,所述样品进一步包含(iii)衍生自和/或对应于另外的核酸靶标的另外的多个核酸分子,以及(iv)另外的多个寡核苷酸探针,其中每一个对应于所述另外的核酸靶标的不同区域。在一些实施方案中,所述多个信号的至少一部分是由所述多个寡核苷酸探针和所述另外的多个寡核苷酸探针生成的。在一些实施方案中,所述样品来源于生物样品。在一些实施方案中,该生物样品是血液或血浆。在一些实施方案中,所述核酸靶标是染色体。在一些实施方案中,该染色体是21号染色体、18号染色体、15号染色体、13号染色体、X染色体或Y染色体。在一些实施方案中,(c)包括扩增所述多个核酸分子,从而生成所述多个信号。在一些实施方案中,该扩增包括聚合酶链反应。在一些实施方案中,所述扩增使所述多个寡核苷酸探针降解,从而生成所述多个信号。在一些实施方案中,所述多个寡核苷酸探针被核酸酶降解,从而从所述多个寡核苷酸探针中的每一个释放信号标签,并生成所述多个信号。在一些实施方案中,所述多个信号是多个荧光信号或多个化学发光信号。在一些实施方案中,所述多个寡核苷酸探针各自与所述核酸靶标的不同区域结合。在一

些实施方案中,所述多个信号中的所述至少一个唯一地对应于在所述分区中存在所述多个核酸分子中的恰好两个。在一些实施方案中,所述多个信号中的至少一个信号对应于所述多个核酸分子的两个或更多个独特组合。在一些实施方案中,所述多个信号中的所述至少一个信号(A)对应于所述多个核酸分子之一的存在,并且(B)对应于所述多个核酸分子中的两个核酸分子的存在。

[0005] 在一些方面,本文公开了一种对样品中的第一核酸靶标和第二核酸靶标进行定量的方法,该方法包括:(a)提供混合物,其包含:(i)衍生自和/或对应于所述第一核酸靶标的第一多个核酸分子;(ii)衍生自和/或对应于所述第二核酸靶标的第二多个核酸分子;(iii)第一多个寡核苷酸探针,每个探针对应于所述第一核酸靶标的不同区域;以及(iv)第二多个寡核苷酸探针,每个探针对应于所述第二核酸靶标的不同区域;(b)将所述混合物分配到多个分区中;(c)在所述多个分区中生成多个信号,其中所述多个信号在一个颜色通道中是可检测的;(d)在所述颜色通道中从所述多个分区的多分区中检测所述多个信号;以及(e)基于所述检测,对所述样品中的所述第一核酸靶标和所述第二核酸靶标进行定量。在一些实施方案中,所述多个信号是由所述第一多个寡核苷酸探针和所述第二多个寡核苷酸探针生成的。在一些实施方案中,所述多个信号中的至少一个对应于所述多个分区的分区中所述多个第一核酸分子和/或所述多个第二核酸分子中的两个或更多个的独特组合。在一些实施方案中,所述多个信号中的所述至少一个唯一地对应于在所述分区中存在所述第一多个核酸分子或所述第二多个核酸分子中的恰好两个。在一些实施方案中,所述定量包括确定所述样品中所述第一核酸靶标与所述第二核酸靶标之比。在一些实施方案中,所述定量包括确定所述样品中所述第一核酸靶标和所述第二核酸靶标的绝对量。在一些实施方案中,所述定量包括确定所述样品中所述第一核酸靶标和所述第二核酸靶标的相对量,其中所述相对量是相对于参考值的量。在一些实施方案中,所述样品来源于生物样品。在一些实施方案中,该生物样品是血液或血浆。在一些实施方案中,所述核酸靶标是染色体。在一些实施方案中,该染色体是21号染色体、18号染色体、15号染色体、13号染色体、X染色体或Y染色体。在一些实施方案中,(c)包括扩增所述多个核酸分子,从而生成所述多个信号。在一些实施方案中,该扩增包括聚合酶链反应。在一些实施方案中,所述扩增使所述多个寡核苷酸探针降解,从而生成所述多个信号。在一些实施方案中,所述多个寡核苷酸探针被核酸酶降解,从而从所述多个寡核苷酸探针中的每一个释放信号标签,并生成所述多个信号。在一些实施方案中,所述多个信号是多个荧光信号或多个化学发光信号。在一些实施方案中,所述多个寡核苷酸探针各自与所述核酸靶标的不同区域结合。在一些实施方案中,所述多个信号中的至少一个信号对应于所述第一多个核酸分子和/或所述第二多个核酸分子的两个或更多个独特组合。

[0006] 在一些方面,本文公开了一种对样品中的靶核酸分子进行定量的方法,该方法包括:(a)将多个核酸分子分配到多个分区中;(b)在所述多个分区中扩增所述多个核酸分子,从而生成多个信号;(c)检测所述多个信号;(d)基于所述检测,对所述多个分区中的每个分区确定所述多个核酸分子中的一个或多个核酸分子存在于所述分区中的概率,从而生成多个概率;以及(e)基于所述多个概率的函数,对所述样品中的所述靶核酸分子进行定量。在一些实施方案中,所述方法不包括确定所述多个分区的任何单个成员中的核酸分子数目的步骤。在一些实施方案中,所述方法不包括确定包含与所述靶核酸分子相对应的核酸序列

的分区数目的步骤。在一些实施方案中,所述函数是和。在一些实施方案中,所述多个核酸分子衍生自、对应于所述靶核酸分子,或者是所述靶核酸分子的成员。在一些实施方案中,该扩增包括聚合酶链反应。在一些实施方案中,所述多个信号是多个荧光信号或多个化学发光信号。在一些实施方案中,(a)进一步包括将对应于所述多个核酸分子的多个寡核苷酸探针分配到所述多个分区中。在一些实施方案中,所述多个信号的至少一部分由所述多个寡核苷酸探针生成。在一些实施方案中,所述扩增使所述多个寡核苷酸探针降解,从而生成所述多个信号。在一些实施方案中,所述多个寡核苷酸探针被核酸酶降解,从而从所述多个寡核苷酸探针中的每一个释放信号标签,并生成所述多个信号。在一些实施方案中,所述样品来源于生物样品。在一些实施方案中,该生物样品是血液或血浆。

[0007] 在一些方面,本文公开了一种对样品中的靶核酸分子进行定量的方法,该方法包括:(a)将多个核酸分子分配到多个分区中;(b)在所述多个分区中扩增所述多个核酸分子,从而生成多个信号;(c)检测所述多个信号;(d)将所述多个信号的成员相互比较;以及(e)基于所述比较,对所述样品中的所述靶核酸分子进行定量,所述方法不包括在所述多个分区的任何单个成员中对所述多个核酸分子进行定量的步骤。在一些实施方案中,所述比较包括从所述多个信号生成一个或多个信号分布曲线,并分析所述一个或多个信号分布曲线。在一些实施方案中,所述分析包括针对所述一个或多个信号分布曲线中的每一个测量曲线下面积(AUC)。在一些实施方案中,(d)包括将所述AUC与参考值进行比较。在一些实施方案中,所述一个或多个信号分布曲线包括多个信号分布曲线,其中(d)包括将所述一个或多个信号分布曲线中的每一个的AUC相互比较。在一些实施方案中,所述多个核酸分子衍生自、对应于所述靶核酸分子,或者是所述靶核酸分子的成员。在一些实施方案中,该扩增包括聚合酶链反应。在一些实施方案中,所述多个信号是多个荧光信号或多个化学发光信号。在一些实施方案中,(a)进一步包括将对应于所述多个核酸分子的多个寡核苷酸探针分配到所述多个分区中。在一些实施方案中,所述多个信号的至少一部分由所述多个寡核苷酸探针生成。在一些实施方案中,所述扩增使所述多个寡核苷酸探针降解,从而生成所述多个信号。在一些实施方案中,所述多个寡核苷酸探针被核酸酶降解,从而从所述多个寡核苷酸探针中的每一个释放信号标签,并生成所述多个信号。在一些实施方案中,所述样品来源于生物样品。在一些实施方案中,该生物样品是血液或血浆。

[0008] 在一些方面,本文公开了一种相对于样品中第二靶核酸的量确定第一靶核酸的量的方法,该方法包括:(a)提供混合物,其包含:(i)衍生自和/或对应于所述第一靶核酸的第一多个核酸分子;以及(ii)衍生自和/或对应于所述第二靶核酸的第二多个核酸分子;(b)将所述混合物分配到多个分区中;(c)在所述多个分区中扩增所述第一多个核酸分子和所述第二多个核酸分子,从而生成多个信号;(d)检测所述多个信号;以及(e)基于所述检测,确定代表所述样品中所述第一靶核酸的量相对于所述第二靶核酸的量的比率,所述方法不包括在所述多个分区的任何单个成员中对所述第一多个核酸分子或所述第二多个核酸分子进行定量的步骤。在一些实施方案中,所述方法进一步包括基于所述比率对所述样品中的所述第一靶核酸和所述第二靶核酸进行定量。在一些实施方案中,所述比率代表胎儿分数。在一些实施方案中,所述第一核酸靶标是第一染色体。在一些实施方案中,所述第二核酸靶标是第二染色体。在一些实施方案中,所述第一核酸靶标来源于第一生物体。在一些实施方案中,所述第二核酸靶标来源于第二生物体。在一些实施方案中,该扩增包括聚合酶链

反应。在一些实施方案中,所述多个信号是多个荧光信号或多个化学发光信号。在一些实施方案中,所述样品进一步包含(iii)与所述第一多个核酸分子相对应的第一多个寡核苷酸探针,和(iv)与所述第二多个核酸分子相对应的第二多个寡核苷酸探针。在一些实施方案中,所述多个信号的至少一部分是由所述第一多个寡核苷酸探针和所述第二多个寡核苷酸探针生成的。在一些实施方案中,所述扩增使所述第一多个寡核苷酸探针和所述第二多个寡核苷酸探针降解,从而生成所述多个信号。在一些实施方案中,所述第一多个寡核苷酸探针和所述第二多个寡核苷酸探针被核酸酶降解,从而从所述多个寡核苷酸探针中的每一个释放信号标签,并生成所述多个信号。在一些实施方案中,(d)包括从所述多个信号生成信号图。在一些实施方案中,所述信号图包含重叠区域。在一些实施方案中,所述信号图包含多个目标群体。在一些实施方案中,所述多个目标群体的至少一部分彼此重叠。在一些实施方案中,所述比率是使用峰值最小阈值化模型计算的。在一些实施方案中,所述比率是使用中点阈值化模型计算的。在一些实施方案中,所述比率是使用部分概率求和模型计算的。在一些实施方案中,所述比率是使用直接概率求和模型计算的。在一些实施方案中,所述样品来源于生物样品。在一些实施方案中,该生物样品是血液或血浆。在一些实施方案中,所述第一多个核酸分子是所述第一核酸靶标的拷贝,并且其中所述第一多个核酸分子已经从所述样品转移到所述混合物中。在一些实施方案中,所述第二多个核酸分子是所述第二核酸靶标的拷贝,并且其中所述第二多个核酸分子已经从所述样品转移到所述混合物中。在一些实施方案中,所述第一多个核酸分子和所述第二多个核酸分子源自所述样品。在一些实施方案中,所述第一多个核酸分子是所述第一靶核酸的核酸扩增产物。在一些实施方案中,所述第二多个核酸分子是所述第二靶核酸的核酸扩增产物。在一些实施方案中,所述第一多个核酸分子是所述第一靶核酸的核酸延伸产物。在一些实施方案中,所述第二多个核酸分子是所述第二靶核酸的核酸延伸产物。在一些实施方案中,所述第一多个核酸分子是所述第一靶核酸的逆转录产物。在一些实施方案中,所述第二多个核酸分子是所述第二靶核酸的逆转录产物。

附图说明

[0009] 本发明的新颖特征在所附权利要求书中具体阐述。通过参考以下对利用本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述以及附图,将会对本发明的特征和优点获得更好的理解,在这些附图中:

[0010] 图1示出了dPCR测定中的示例信号存在。

[0011] 图2示出了在用于数字PCR的制剂(formulation)中使用合成或天然靶标以多重化方法校准多个簇的位置的示例方法。

[0012] 图3A-C示出了用于产生重叠簇的数字PCR的制剂。图3A显示了与以下四个簇之一对准的来自实验的三个孔的小液滴的散点图:(1)无靶标,(2)Pan FluA靶标,(3)FluA H3亚型靶标,(4)Pan FluA和FluAH3靶标两者。图3B显示了标识出不同簇的等值线图。图3C显示了x轴的密度图,示出了四个不同的簇,其中无法鉴别来自每个簇的单个小液滴,也不能用标准“截断”方法确定每个簇的小液滴数目。

[0013] 图4示出了估计目标量的方法。图4A示出了中点阈值建模。图4B示出了相对最小阈值化。

- [0014] 图5显示了FluA靶标和RSVB靶标的示例直方图分解。
- [0015] 图6显示了对数据的四个峰的高斯拟合以及分配的示例小液滴强度和部分概率。
- [0016] 图7A-C示出了导致不同强度簇位置的示例探针滴定实验。
- [0017] 图8示出了确定簇位置之间的阈值的常规方法。
- [0018] 图9A显示了组合实验中的小液滴分布。图9B显示了图9A的曲线图的放大区域。图9C显示了上方分布与模型(深线)的拟合。图9D显示了图9C的曲线图的局部图。
- [0019] 图10A-C证明了不能确定靶标之间任何单个分区的状态。
- [0020] 图11A-C证明了能够通过测量靶标信号的总和来区分RSVA和鼻病毒(RhV)。
- [0021] 图12A-B示出了能够用数字PCR测定来靶向单个染色体上的多个基因座。
- [0022] 图13A-D示出了能够用数字PCR测定来靶向单个染色体上的多个基因座。
- [0023] 图14显示了将传统dPCR与实施例3中描述的分析方法进行比较的示例数字PCR模拟的结果。
- [0024] 图15A-C显示了采用数字PCR的基本单通道多重化的示例。
- [0025] 图16A-C显示了在存在多个染色体基因座的情况下,采用数字PCR的多重化的示例。
- [0026] 图17A-C证明了在存在多个染色体基因座的情况下,采用数字PCR的多重化中灵敏度提高。
- [0027] 图18A-D证明了在大约20,000个分区反应中,能够对18号染色体的40,000个拷贝和21号染色体的40,000个拷贝进行定量。
- [0028] 图19A-B显示了实施例5中描述的示例数字PCR测定模拟的结果。

具体实施方式

[0029] 以下描述提供了用于全面理解并允许描述本技术的各个实施方案的具体细节。所使用的术语旨在以最广泛的合理方式解释,即使与某些实施方案的详细描述一起使用。

[0030] 在详细描述本教导之前,应当理解,本公开不限于具体的组合物或工艺步骤,因此可以有所不同。除非上下文另有明确规定,否则如本文所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”也意欲包括复数形式。此外,就说明书和/或权利要求书中使用的术语“包括”、“包含”、“具有”、“如”或其变化形式而言,这些术语并非限制性的,并且旨在以与术语“包含”类似的方式为包含性的。除非明确指出,否则说明书中“包含”各种组分的实施方案也被理解为“由所列举的组分组成”或“基本上由所列举的组分组成”。

[0031] 聚合酶链反应(PCR)是在具有核酸聚合酶和引物的反应混合物中指数扩增特定核酸靶标的方法。引物是短的单链寡核苷酸,其互补于靶序列的正链和负链的3'序列。该反应混合物在重复的加热和冷却步骤中循环。加热循环使双链核酸靶标变性或分成单链模板。在冷却循环中,引物与模板上的互补序列结合。在模板被引发后,核酸聚合酶产生原始模板的拷贝。重复循环在每个循环中以指数方式将靶标扩增2倍,导致靶序列在30个循环中增加大约10亿倍(Saiki等人,1988)。

[0032] 数字PCR(dPCR)是以下的过程,将含有一个或多个靶标的样品分配到多个分区(例如,孔、小液滴等)中,在每个分区中进行PCR反应,并记录由例如靶标特异性报告探针生成的发光(例如,荧光)。使用标记的寡核苷酸探针允许进行特异性检测。dPCR可以在多种核酸

检测方法中使用。数字PCR通常在数字PCR仪上进行,该PCR仪通过一个或多个激发/发射滤波器组测量光学通道中来自每个分区的荧光。

[0033] 通常,靶标特异性寡核苷酸探针是与所扩增的靶标的一条链互补的短寡核苷酸。该探针缺少3' 羟基,因此无法被DNA聚合酶延伸。TaqMan (ThermoFisher Scientific) 化学法是用多重实时PCR的常见的报告探针方法(Holland等人,1991)。TaqMan寡核苷酸探针用荧光团和猝灭标签(即,猝灭剂)共价修饰。在这种构造中,由荧光团生成的荧光被猝灭,并且无法被实时PCR仪检测到。当存在目的靶标时,探针寡核苷酸与扩增的靶标发生碱基配对。当结合时,其被Taq聚合酶的5' 至3' 外切核酸酶活性消化,从而将荧光团与猝灭剂物理分离并释放信号以供实时PCR仪检测。

[0034] 可以通过将每个核酸靶标编码为独特的强度值或数值范围来进行单个测量中的多个核酸靶标的多重分析。例如,为了使用一次测量来检测样品中的多个核酸靶标,可以以不同的浓度提供寡核苷酸探针,使得由探针生成的每个信号的强度(无论是单独地还是组合地)都是唯一的。

概述

[0035] 在dPCR的一个实例中,可以将含有至少一种核酸靶标序列、至少一种扩增寡聚物、至少一种检测寡核苷酸、dNTP、热稳定DNA聚合酶和其他PCR试剂的单个样品分配到大致20,000个均匀大小的分区中。通常,每个分区可以接纳核酸靶标序列的单个模板。然而,从统计学上讲,某些分区可接纳超过一个拷贝的核酸靶标模板,而其他分区可能不接纳任何靶模板。

[0036] 在分区后,每个分区可以进行端点PCR。发射荧光信号的分区被标记为“阳性”,并被评分为“1”,而没有可检测的荧光的分区被视为“阴性”,并被评分为“0”。dPCR的基本原理是,阳性反应的数目与样品中存在的模板核酸的总数成正比,因此使得能够进行绝对定量。然而,由于某些分区在分区期间会接纳超过一个核酸靶标模板,因此,如果不进行校正,则阳性分区的比例将无法准确反映样品中存在的核酸靶标的精确量。因此,可以使用泊松统计模型来计算给定反应接纳零个、一个、二个、三个或更多个拷贝的概率。这种“校正”可以使起始样品中的所有分子都得到解读,从而产生绝对定量。对于单个靶标扩增,可以通过 $\lambda = -\ln(P(k=0))$ 来确定以每个分区的平均拷贝数(λ) 表示的核酸量。

[0037] 当将每个分区的扩增结果可视化为二维散点图(从而相对于彼此绘出两个颜色通道中的荧光幅度)时,所得的荧光“簇”可指示样品中特定核酸靶标序列的相对量结果。

[0038] 当将多个靶标多重化到数字PCR反应的两个通道中时,许多最终状态之间可能会有重叠。例如,在每个检测探针利用报告染料(例如,FAM和HEX)的实验中,当作图时,簇将包括HEX阳性、FAM阳性、双阳性和双阴性(空)簇。然而,在实践中,并非所有分区都提供确定的阳性或阴性结果。通常在二维散点图上的簇之间观察到不确定的分区。在同一颜色通道中的簇之间可能存在不确定的信号。在不同颜色通道中的簇之间可能存在不确定的信号。介于明显阳性与明显阴性之间的不确定信号的存在可能会阻止精确的定量。图1示出了在示例dPCR测定中单个靶标(RSVB)的信号存在。图1揭示了在簇(例如,可能与分区中存在或不存在靶核酸序列相对应的信号)之间存在不确定的信号。在此认识到,需要能解读不确定信号的定量方法。

[0039] 在一些方面,本公开提供了使用数字测定进行多重定量的方法、系统和组合物,其

中不需要对各个分区进行分类来对反应中存在的靶标进行定量。所公开的方法可用于鉴别或检测受试者的遗传异常,例如胎儿非整倍性(例如,21三体、18三体等)。

[0040] 在一些方面,本公开提供了用于非侵入性产前诊断非整倍性的多重定量的dPCR方法。由于无细胞胎儿DNA(cffDNA)仅占母体血浆中总无细胞DNA的一小部分,因此将样品分配到大约20,000个均匀大小的单独分区中——每个分区的体积约为1纳升——可用于高特异性和灵敏度的绝对定量,而无需对反应中各个分区中存在的靶序列进行分类或浓度定量。定量方法在本文其他地方更详细地描述,并且包括,例如,峰值最小阈值化、中点阈值化、部分概率求和以及直接概率求和。在一个实例中,扩增了与21号染色体相对应的多个核酸序列(例如,基因座),并且在单个颜色通道中检测了由所有序列生成的信号组,而从未确定任何单独分区中的任何单个序列的量。平行地,扩增了与18号染色体相对应的多个核酸序列(例如,基因座),并且在单个颜色通道中检测了由所有序列生成的信号组,而从未确定任何单独分区中的任何单个序列的量。然后将这两组信号进行比较。在一些情况下,确定21号染色体与18号染色体的比率。确定比率可用于鉴别样品中的染色体(例如,cffDNA)量相对于参考值(例如,母体DNA)的增加或减少。

[0041] 在示例性实施方案中,扩增了与21号染色体相对应的多个序列(例如,基因座),并且确定由所有序列生成的第一和信号,而从未确定任何单个序列的量。平行地,扩增了与18号染色体相对应的多个序列(例如,基因座),并且确定由所有序列生成的第二和信号,而从未确定任何单个序列的量。然后将这些第一和第二和信号进行比较,并确定比率。因此,如果确定来自四个21号染色体序列的和信号为500个单位,并且确定来自四个18号染色体序列的和信号为300个单位,则确定21号染色体与18号染色体之比为1.6。

靶核酸的定量

[0042] 在一些方面,本文描述了一种对样品中的核酸靶标进行定量的方法。首先,可以提供包含多个核酸分子和多个寡核苷酸探针的混合物。所述多个核酸分子可以衍生自和/或可以对应于样品中的核酸靶标。所述多个寡核苷酸探针可以各自对应于核酸靶标的不同区域。该混合物可以进一步包含其他试剂(例如,扩增试剂),包括例如寡核苷酸引物、dNTP、核酸酶(例如,聚合酶)和盐(例如, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等)。接下来,可将该混合物分配到多个分区(例如,孔、微孔、小液滴等)中。接下来,可以在所述多个分区中生成多个信号。所述多个信号在一个颜色通道中可以是可检测的。所述多个信号在多个颜色通道中可以是可检测的。所述多个信号中的至少一个信号可以对应于在单个分区中存在所述多个核酸分子中的两个或更多个核酸分子的独特组合。例如,一个信号可以对应于在单个小液滴中存在两个核酸分子(例如,核酸序列的两个拷贝)。接下来,可以在所述多个分区的多分区中检测所述多个信号。可以在单个颜色通道中检测所述多个信号。可以在多个颜色通道中检测所述多个信号。基于所述检测,可以对样品中的核酸靶标进行定量。

[0043] 在一些情况下,样品进一步包含另外的多个核酸分子和另外的多个寡核苷酸探针。所述另外的多个核酸分子可以衍生自和/或对应于另外的核酸靶标。所述另外的多个寡核苷酸探针可以各自对应于所述另外的核酸靶标的不同区域。

[0044] 样品可以是生物样品。样品可以来源于生物样品。生物样品可以是,例如,血液、血浆、血清、尿液、唾液、粘膜分泌物、痰、粪便或泪液。生物样品可以是流体样品。流体样品可以是血液或血浆。生物样品可包含无细胞核酸(例如,无细胞RNA、无细胞DNA等)。

[0045] 核酸靶标可以是来自病原体(例如,病毒、细菌等)的核酸。核酸靶标可以是怀疑包含一个或多个突变的核酸(例如,染色体)。核酸靶标可以是癌症核酸。核酸靶标可以是染色体。寡核苷酸探针可以对应于染色体的不同区域(例如,基因座)。染色体是21号染色体、18号染色体、15号染色体、13号染色体、X染色体或Y染色体。

[0046] 所述多个信号可以由来自混合物的所述多个探针中的一个或多个探针生成。可以通过所述多个核酸分子的核酸扩增(例如,PCR)来生成所述多个信号。核酸扩增可以降解所述多个寡核苷酸探针(例如,通过核酸酶的活性),从而生成所述多个信号。多个信号可以是多个荧光信号、多个化学发光信号或其组合。

[0047] 所述多个信号中的信号可以对应于单个分区中的所述多个核酸分子的两个或更多个独特组合(例如,可以是不确定信号)。例如,信号可以对应于一个核酸分子的存在,也可以对应于两个核酸分子的存在。

[0048] 在一些情况下,所述方法不包括确定所述多个分区的任何单个成员中的核酸分子数目的步骤。样品中的核酸靶标的定量可包括解读不确定信号。定量可以包括使用峰值最小阈值化模型。定量可以包括使用中点阈值化模型。定量可以包括使用部分概率求和模型。定量可以包括使用直接概率求和模型。

多个靶核酸的定量

[0049] 在一些方面,本文描述了一种对样品中的多个核酸靶标进行定量的方法。首先,可以提供包含第一多个核酸分子、第二多个核酸分子、第一多个寡核苷酸探针和第二多个寡核苷酸探针的混合物。第一多个核酸分子可以衍生自和/或可以对应于样品中的第一核酸靶标。第二多个核酸分子可以衍生自和/或可以对应于样品中的第二核酸靶标。第一多个寡核苷酸探针可以各自对应于第一核酸靶标的不同区域。第二多个寡核苷酸探针可以各自对应于第二核酸靶标的不同区域。该混合物可以进一步包含其他试剂(例如,扩增试剂),包括例如寡核苷酸引物、dNTP、核酸酶(例如,聚合酶)和盐(例如, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等)。接下来,可将该混合物分配到多个分区(例如,孔、微孔、小液滴等)中。接下来,可以在所述多个分区中生成多个信号。所述多个信号在一个颜色通道中可以是可检测的。所述多个信号在多个颜色通道中可以是可检测的。接下来,可以在所述多个分区的多分区中检测所述多个信号。可以在单个颜色通道中检测所述多个信号。可以在多个颜色通道中检测所述多个信号。基于所述检测,可以对样品中的第一核酸靶标和第二核酸靶标进行定量。

[0050] 所述多个信号可以由来自混合物的所述第一多个探针和/或所述第二多个探针中的一个或多个探针生成。可以通过所述第一多个核酸分子和/或所述第二多个核酸分子的核酸扩增(例如,PCR)来生成所述多个信号。核酸扩增可以降解所述第一和第二多个寡核苷酸探针(例如,通过核酸酶的活性),从而生成所述多个信号。多个信号可以是多个荧光信号、多个化学发光信号或其组合。

[0051] 第一和第二核酸靶标的定量可以包括确定样品中第一核酸靶标与第二核酸靶标之比(例如,样品中的第一核酸靶标的量相对于第二核酸靶标的量)。第一和第二核酸靶标的定量可以包括确定样品中第一和第二核酸靶标的绝对量。第一和第二核酸靶标的定量可以包括确定样品中第一和第二核酸靶标的相对量。

[0052] 样品可以是生物样品。样品可以来源于生物样品。生物样品可以是,例如,血液、血浆、血清、尿液、唾液、粘膜分泌物、痰、粪便或泪液。生物样品可以是流体样品。流体样品可

以是血液或血浆。生物样品可包含无细胞核酸(例如,无细胞RNA、无细胞DNA等)。

[0053] 核酸靶标可以是来自病原体(例如,病毒、细菌等)的核酸。核酸靶标可以是怀疑包含一个或多个突变的核酸(例如,染色体)。核酸靶标可以是癌症核酸。核酸靶标可以是染色体。寡核苷酸探针可以对应于染色体的不同区域(例如,基因座)。染色体是21号染色体、18号染色体、15号染色体、13号染色体、X染色体或Y染色体。

[0054] 所述多个信号中的至少一个信号可以对应于在单个分区中存在所述第一或第二多个核酸分子中的两个或更多个核酸分子的独特组合。例如,一个信号可以对应于在单个小液滴中存在两个核酸分子(例如,核酸序列的两个拷贝)。所述多个信号中的信号可以对应于单个分区中的所述第一或第二多个核酸分子的两个或更多个独特组合(例如,可以是不确定信号)。例如,信号可以对应于一个核酸分子的存在,也可以对应于两个核酸分子的存在。

[0055] 在一些情况下,所述方法不包括确定所述多个分区的任何单个成员中的核酸分子数目的步骤。样品中的核酸靶标的定量可包括解读不确定信号。定量可以包括使用峰值最小阈值化模型。定量可以包括使用中点阈值化模型。定量可以包括使用部分概率求和模型。定量可以包括使用直接概率求和模型。

使用概率确定对靶核酸分子的定量

[0056] 在一些方面,本文描述了一种对样品中的靶核酸分子进行定量的方法。首先,可以将多个核酸分子分配到多个分区(例如,微孔、孔、小液滴等)中。所述多个核酸分子可以衍生自和/或可以对应于样品中的靶核酸分子。除了所述多个核酸分子外,还可以分配其他试剂(例如,扩增试剂),包括,例如,寡核苷酸引物、寡核苷酸探针、dNTP、核酸酶(例如,聚合酶)和盐(例如, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等)。接下来,可以扩增所述多个核酸分子,从而生成多个信号。所述多个信号在一个颜色通道中可以是可检测的。所述多个信号在多个颜色通道中可以是可检测的。接下来,可以检测所述多个信号。可以在单个颜色通道中检测所述多个信号。可以在多个颜色通道中检测所述多个信号。接下来,对于所述多个分区中的每个分区,可以确定存在所述多个核酸分子中的一个或多个核酸分子的概率,从而生成多个概率。可以基于检测(例如,基于对检测到的信号的分析)来生成所述多个概率。可以基于所述多个概率的函数对样品中的靶核酸分子进行定量。

[0057] 所述多个概率的函数可以是和(sum)。在这种情况下,对靶核酸分子的定量可以包括计算所有所述多个概率的总和。所述多个概率的函数可以是每个分区生成的信号的性质(例如,大小、形状、宽度等)导出的函数。例如,可以基于每个信号的宽度来生成函数,并将其用于对所述多个靶核酸分子进行定量。

[0058] 所述方法可以进一步包括将对应于所述多个核酸分子的多个寡核苷酸探针分配到所述多个分区中。可以由所述多个寡核苷酸探针生成所述多个信号。可以通过所述多个核酸分子的核酸扩增(例如,PCR)来生成所述多个信号。核酸扩增可以降解所述多个寡核苷酸探针(例如,通过核酸酶的活性),从而生成所述多个信号。核酸扩增可以从所述多个探针释放信号标签,从而生成所述多个信号。多个信号可以是多个荧光信号、多个化学发光信号或其组合。

[0059] 样品可以是生物样品。样品可以来源于生物样品。生物样品可以是,例如,血液、血浆、血清、尿液、唾液、粘膜分泌物、痰、粪便或泪液。生物样品可以是流体样品。流体样品可

以是血液或血浆。生物样品可包含无细胞核酸(例如,无细胞RNA、无细胞DNA等)。

[0060] 核酸靶标可以是来自病原体(例如,病毒、细菌等)的核酸。核酸靶标可以是怀疑包含一个或多个突变的核酸(例如,染色体)。核酸靶标可以是癌症核酸。核酸靶标可以是染色体。寡核苷酸探针可以对应于染色体的不同区域(例如,基因座)。染色体是21号染色体、18号染色体、15号染色体、13号染色体、X染色体或Y染色体。

[0061] 所述多个信号中的至少一个信号可以对应于在单个分区中存在所述多个核酸分子中的两个或更多个核酸分子的独特组合。例如,一个信号可以对应于在单个小液滴中存在两个核酸分子(例如,核酸序列的两个拷贝)。所述多个信号中的信号可以对应于单个分区中的所述多个核酸分子的两个或更多个独特组合(例如,可以是不确定信号)。例如,信号可以对应于一个核酸分子的存在,也可以对应于两个核酸分子的存在。

[0062] 靶核酸分子的定量可以包括确定样品中第一核酸靶标与第二核酸靶标之比(例如,样品中的第一核酸靶标的量相对于第二核酸靶标的量)。靶核酸分子的定量可以包括确定样品中靶核酸分子的绝对量。第一和第二核酸靶标的定量可以包括确定样品中靶核酸分子的相对量。

[0063] 所述方法可以不包括确定所述多个分区的任何单个成员中的核酸分子数目的步骤。所述方法可以不包括确定包含与靶核酸分子相对应的核酸序列的分区数目的步骤。所述方法可以不包括从所述多个分区的任何单个分区确定量的任何步骤。样品中的靶核酸分子的定量可包括解读不确定信号。定量可以包括使用峰值最小阈值化模型。定量可以包括使用中点阈值化模型。定量可以包括使用部分概率求和模型。定量可以包括使用直接概率求和模型。

使用直接分析对靶核酸分子的定量

[0064] 在一些方面,本文描述了一种对样品中的靶核酸分子进行定量的方法。首先,可以将多个核酸分子分配到多个分区(例如,微孔、孔、小液滴等)中。所述多个核酸分子可以衍生自和/或可以对应于样品中的靶核酸分子。除了所述多个核酸分子外,还可以分配其他试剂(例如,扩增试剂),包括,例如,寡核苷酸引物、寡核苷酸探针、dNTP、核酸酶(例如,聚合酶)和盐(例如, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等)。接下来,可以扩增所述多个核酸分子,从而生成多个信号。所述多个信号在一个颜色通道中可以是可检测的。所述多个信号在多个颜色通道中可以是可检测的。接下来,可以检测所述多个信号。可以在单个颜色通道中检测所述多个信号。可以在多个颜色通道中检测所述多个信号。接下来,可以将所述多个信号的成员相互比较。可以基于所述比较对样品中的靶核酸分子进行定量。所述方法可以不包括在所述多个分区的任何单个成员中对所述多个核酸分子进行定量的步骤。

[0065] 多个信号的成员之间的相互比较可以包括从所述多个信号生成一个或多个信号分布曲线,并分析所述一个或多个信号分布曲线。比较可以包括针对从所述多个信号生成的一个或多个信号分布曲线测量曲线下面积(AUC)。比较可以包括将AUC与参考值进行比较。比较可以包括生成一个或多个信号分布曲线,并将所述一个或多个信号分布曲线中的每一个的AUC相互比较。

[0066] 所述方法可以进一步包括将对应于所述多个核酸分子的多个寡核苷酸探针分配到所述多个分区中。可以由所述多个寡核苷酸探针生成所述多个信号。可以通过所述多个核酸分子的核酸扩增(例如,PCR)来生成所述多个信号。核酸扩增可以降解所述多个寡核苷酸

探针(例如,通过核酸酶的活性),从而生成所述多个信号。核酸扩增可以从所述多个探针释放信号标签,从而生成所述多个信号。多个信号可以是多个荧光信号、多个化学发光信号或其组合。

[0067] 样品可以是生物样品。样品可以来源于生物样品。生物样品可以是,例如,血液、血浆、血清、尿液、唾液、粘膜分泌物、痰、粪便或泪液。生物样品可以是流体样品。流体样品可以是血液或血浆。生物样品可包含无细胞核酸(例如,无细胞RNA、无细胞DNA等)。

[0068] 核酸靶标可以是来自病原体(例如,病毒、细菌等)的核酸。核酸靶标可以是怀疑包含一个或多个突变的核酸(例如,染色体)。核酸靶标可以是癌症核酸。核酸靶标可以是染色体。寡核苷酸探针可以对应于染色体的不同区域(例如,基因座)。染色体是21号染色体、18号染色体、15号染色体、13号染色体、X染色体或Y染色体。

[0069] 所述多个信号中的至少一个信号可以对应于在单个分区中存在所述多个核酸分子中的两个或更多个核酸分子的独特组合。例如,一个信号可以对应于在单个小液滴中存在两个核酸分子(例如,核酸序列的两个拷贝)。所述多个信号中的信号可以对应于单个分区中的所述多个核酸分子的两个或更多个独特组合(例如,可以是不确定信号)。例如,信号可以对应于一个核酸分子的存在,也可以对应于两个核酸分子的存在。

[0070] 靶核酸分子的定量可以包括确定样品中第一核酸靶标与第二核酸靶标之比(例如,样品中的第一核酸靶标的量相对于第二核酸靶标的量)。靶核酸分子的定量可以包括确定样品中靶核酸分子的绝对量。第一和第二核酸靶标的定量可以包括确定样品中靶核酸分子的相对量。

[0071] 所述方法可以不包括确定所述多个分区的任何单个成员中的核酸分子数目的步骤。所述方法可以不包括确定包含与靶核酸分子相对应的核酸序列的分区数目的步骤。所述方法可以不包括从所述多个分区的任何单个分区确定量的任何步骤。样品中的靶核酸分子的定量可包括解读不确定信号。定量可以包括使用峰值最小阈值化模型。定量可以包括使用中点阈值化模型。定量可以包括使用部分概率求和模型。定量可以包括使用直接概率求和模型。

确定比率

[0072] 在一些方面,本文描述了一种相对于样品中第二靶核酸的量确定第一靶核酸的量的方法。首先,可以提供包含第一多个核酸分子和第二多个核酸分子的混合物。所述第一多个核酸分子可以衍生自和/或可以对应于样品中的第一核酸靶标。所述第二多个核酸分子可以衍生自和/或可以对应于样品中的第二核酸靶标。除了所述第一和第二多个核酸分子外,还可以在混合物中提供其他试剂(例如,扩增试剂),包括,例如,寡核苷酸引物、寡核苷酸探针、dNTP、核酸酶(例如,聚合酶)和盐(例如, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等)。接下来,可将该混合物分配到多个分区(例如,微孔、孔、小液滴等)中。接下来,可以扩增所述第一多个核酸分子和所述第二多个核酸分子,从而生成多个信号;所述多个信号在一个颜色通道中可以是可检测的。所述多个信号在多个颜色通道中可以是可检测的。接下来,可以检测所述多个信号。可以在单个颜色通道中检测所述多个信号。可以在多个颜色通道中检测所述多个信号。接下来,基于所述检测,可以确定代表样品中第一靶核酸的量相对于第二靶核酸的量的比率,所述方法可以不包括在所述多个分区的任何单个成员中对所述第一多个核酸分子或所述第二多个核酸分子进行定量的步骤。样品中的第一靶核酸和第二靶核酸可以基于该比率进行定

量。

[0073] 所述方法可以进一步包括将对应于所述多个核酸分子的多个寡核苷酸探针分配到所述多个分区中。可以由所述多个寡核苷酸探针生成所述多个信号。可以通过所述多个核酸分子的核酸扩增(例如,PCR)来生成所述多个信号。核酸扩增可以降解所述多个寡核苷酸探针(例如,通过核酸酶的活性),从而生成所述多个信号。核酸扩增可以从所述多个探针释放信号标签,从而生成所述多个信号。多个信号可以是多个荧光信号、多个化学发光信号或其组合。

[0074] 比率可以代表胎儿分数。比率可以是胎儿分数。比率可以代表或指示染色体异常。染色体异常可以是非整倍性。非整倍性可以是胎儿非整倍性。染色体异常可以是突变(例如,插入、缺失、点突变、易位、扩增等)。

[0075] 样品可以是生物样品。样品可以来源于生物样品。生物样品可以是,例如,血液、血浆、血清、尿液、唾液、粘膜分泌物、痰、粪便或泪液。生物样品可以是流体样品。流体样品可以是血液或血浆。生物样品可包含无细胞核酸(例如,无细胞RNA、无细胞DNA等)。

[0076] 核酸靶标可以是来自病原体(例如,病毒、细菌等)的核酸。核酸靶标可以是怀疑包含一个或多个突变的核酸(例如,染色体)。核酸靶标可以是癌症核酸。核酸靶标可以是染色体。寡核苷酸探针可以对应于染色体的不同区域(例如,基因座)。染色体是21号染色体、18号染色体、15号染色体、13号染色体、X染色体或Y染色体。

[0077] 所述多个信号中的至少一个信号可以对应于在单个分区中存在所述第一或第二多个核酸分子中的两个或更多个核酸分子的独特组合。例如,一个信号可以对应于在单个小液滴中存在两个核酸分子(例如,核酸序列的两个拷贝)。所述多个信号中的信号可以对应于单个分区中的所述第一或第二多个核酸分子的两个或更多个独特组合(例如,可以是不确定信号)。例如,信号可以对应于一个核酸分子的存在,也可以对应于两个核酸分子的存在。

[0078] 确定比率可以包括从所述多个信号生成信号图。信号图可以是代表信号性质(例如,波长、幅度等)的图形或其他显示。信号图可以包含多个目标群体。信号图可以包含所述多个目标群体中的每一个之间的重叠区域。所述多个目标群体的至少一部分彼此重叠。

[0079] 在一些情况下,所述方法不包括确定所述多个分区的任何单个成员中的核酸分子数目的步骤。样品中的第一和第二核酸靶标的定量可包括解读不确定信号。定量可以包括使用峰值最小阈值化模型。定量可以包括使用中点阈值化模型。定量可以包括使用部分概率求和模型。定量可以包括使用直接概率求和模型。

[0080] 所述第一多个核酸分子可以是第一核酸靶标的拷贝,其中所述拷贝已经从样品转移到所述混合物中。所述第二多个核酸分子可以是第二核酸靶标的拷贝,其中所述拷贝已经从样品转移到所述混合物中。所述第一多个核酸分子和所述第二多个核酸分子可以源自样品。所述第一多个核酸分子可以是第一靶核酸的核酸扩增(例如,PCR)的产物。所述第二多个核酸分子可以是第二靶核酸的核酸扩增(例如,PCR)的产物。所述第一多个核酸分子可以是第一靶核酸的核酸延伸的产物。所述第二多个核酸分子可以是第二靶核酸的核酸延伸的产物。所述第一多个核酸分子可以是第一靶核酸的逆转录的产物。所述第二多个核酸分子可以是第二靶核酸的核酸延伸的产物。

多重校准

[0081] 当进行多重化时,dPCR方法可包括创建空间解析的荧光点簇,并在簇之间绘制“截断值”或“阈值”,以鉴别单个小液滴是含有目的靶标的“阳性”簇还是不含目的靶标的“阴性”簇。因此,只有在将小液滴“门控”成组之后,才能测量模板阳性小液滴的确切数目。然而,由于高度的主观性,门控可能会出现不准确性。因此,在多重测定中校准多个簇的位置使得在测定中靶标簇的位置发生归一化,从而减轻了不准确性。当将多个靶标多重化到数字PCR反应的两个通道中时,许多最终状态之间可能会有重叠。因此,可以在用于数字PCR的制剂中使用合成或天然靶标,以便以多重化方法校准多个簇的位置。图2显示了来自六重呼吸窗格(six-plex respiratory panes)的实验数据。[X]标记出校准物簇的假定位置。

[0082] (以与多重反应中其他靶标的已知信号比)向用于数字PCR反应的混合物中添加模板和一个或多个合成(或以其他方式生成的,以便与目的靶标不同)引物/探针组确保了一些但不是大多数小液滴生成“阳性”荧光。所得的独特簇可以用来对测定中的靶标簇的位置进行归一化。作为添加模板核酸的替代或除此之外,校准方法还可包括使用预期存在的阳性对照将已知样品掺加到反应中,或者在数字小液滴PCR的情况下,在另一反应中生成已知阳性小液滴,并在感测之前将其添加到反应容器中。这些簇可能与测定中或相同位置的其他靶标不同。

数字测定

[0083] 在一些方面,本公开提供了用于明确检测样品中多个核酸靶标的存在或不存在的测定。核酸靶标的检测可以通过使用两个或更多个反应来完成。例如,用于测量多个核酸靶标的测定可以包括第一反应和第二反应。单独的第一反应和第二反应可能都无法非简并地检测核酸靶标的任何组合的存在或不存在。第一和第二反应的结果可以一起明确地检测每个核酸靶标的存在或不存在。

[0084] 可以使用本公开的测定来检测任何数目的核酸靶标。在一些情况下,测定可以明确地检测至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、30、40、50个或更多个核酸靶标。在一些情况下,测定可以明确地检测至多50、40、30、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4或3个核酸靶标。测定可以包括任何数目的反应,其中这些反应的结果一起确定多个核酸靶标的存在或不存在的任何组合。测定可以包括2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个反应。单独的每个反应可能无法非简并地检测核酸靶标的任何组合的存在或不存在。然而,每个反应的结果一起可以明确地检测每个核酸靶标的存在或不存在。

[0085] 反应可以在相同的样品溶液体积中进行。例如,第一反应可以在第一颜色通道中生成荧光信号,而第二反应可以在第二颜色通道中生成荧光信号,从而生成两个测量值以供比较。或者,可以在不同的样品溶液体积中进行反应。例如,第一反应可以在第一样品溶液体积中进行,并在给定的颜色通道中生成荧光信号,而第二反应可以在第二样品溶液体积中进行,并在相同的颜色通道或不同的颜色通道中生成荧光信号,从而生成两个测量值以供比较。

[0086] 在一些方面,本公开提供了用于进行数字测定的方法。用于进行数字测定的方法可包括将多个核酸靶标和多个寡核酸探针分配到多个分区中。在一些情况下,可以将两个、三个、四个、五个或更多个核酸靶标与两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个寡核酸探针一起分配到多个分区中。分区后,核酸靶标可以在分区中扩增,例如通过聚合酶链反应(PCR)。接下来,

可以由寡核酸探针生成N个信号。这N个信号中的每个信号可以对应于在分区中存在核酸靶标的独特组合。在信号生成后,可以在单个光学通道中检测这N个信号。可以使用例如单色通道中的荧光检测来检测信号。

[0087] 用于进行数字测定的方法可包括在多个分区中扩增来自样品的核酸靶标,所述多个分区包含与核酸靶标的一个或多个区域互补的寡核酸探针。每个寡核酸探针可以用荧光团标记。荧光团可以能够在单个光学通道中被检测。例如,荧光团可以各自包含类似的发射波长光谱,使得可以在单个光学通道中对其进行检测。分区后,如果存在一个或多个核酸靶标,则可以从多个分区中检测到N个信号。这N个信号中的每一个可以对应于分区中存在的一个或多个核酸靶标的独特组合。根据这N个信号,可以确定样品中每个核酸靶标的存在与否。

[0088] 反应可以包括生成累积信号测量值。本公开的测定可以包括比较两个或更多个累积信号测量值,以明确地检测样品中核酸靶标的任何组合。累积信号测量值可以包括从提供给样品溶液的一个或多个探针生成的一种或多种信号。累积信号测量值可以是信号强度水平,其对应于从多个寡核苷酸探针生成的信号的总和。例如,两个探针可以各自与核酸分子结合,其中每个探针以1x强度生成给定波长的信号。这些信号的测量将生成与两个信号强度之和相对应的累积信号测量值,即2x信号强度。

[0089] 反应可以包括不确定性。不确定性可以是无法明确地鉴别样品中核酸靶标的单个组合的信号。例如,反应可生成2x强度水平的信号。基于反应的编码(例如,反应中存在的杂交探针的浓度),2x强度水平可以对应于核酸靶标的超过一种组合,从而包括不确定性。可以通过进行一个或多个附加反应来解决不确定性,从而解决不确定性。例如,第二反应可生成3x信号强度水平,其中来自第一反应的2x信号强度水平和来自第二反应的3x信号强度水平两者的存在唯一地鉴别了样品中核酸靶标的给定组合。

[0090] 测定可以包括根据解决不确定性所必需的信息,从反应选择中选择两个或更多个反应。例如,第一反应可以包括第一信号水平和第二信号水平的不确定性。对应于第一信号水平的结果可以确定解决不确定性所必需的第一附加反应,而对应于第二信号水平的结果可以确定解决不确定性所必需的第二附加反应。

扩增

[0091] 在一些方面,所公开的方法包括核酸扩增。扩增可以在分区前或分区后进行。在一些情况下,核酸靶标的扩增在多个分区中进行。例如,可以将核酸靶标分配到多个小液滴中,并在每个小液滴内进行扩增,从而在小液滴中存在至少一个核酸靶标的情况下生成信号。

[0092] 可以修改扩增条件,使得在数字测定中生成的信号独特地鉴别靶标的每个组合。扩增条件可包括热循环条件,其包括每个热循环的温度和时间长度。特定扩增条件的使用可用来修改每个信号的信号强度,从而使每个信号能够对应于分区中核酸靶标的独特组合。

分区

[0093] 本公开的方法可以包括将样品或混合物分配到多个分区中。混合物的样品可包含在多个分区中的核酸、寡核苷酸探针和/或另外的试剂。分区可以是小液滴(例如,乳液中的小液滴)。分区可以是微液滴。分区可以是孔。分区可以是微孔。可使用微流体装置进行分

区。在一些情况下,使用小液滴生成器进行分区。分区可包括将样品或混合物分配到油包水小液滴中。小液滴可包含一种或多种核酸。小液滴可包含单种核酸。小液滴可包含两种或更多种核酸。小液滴可以不包含核酸。多个小液滴中的每个小液滴可以生成信号。多个信号可以包括由包含样品子集的多个小液滴中的每个小液滴生成的信号。

热循环

[0094] 本公开的方法可以包括热循环。热循环可以包括一个或多个热循环。热循环可以在适合于用PCR扩增模板核酸的反应条件下进行。模板核酸的扩增可能需要寡核苷酸引物与模板核酸结合或退火。适当的反应条件可以包括适当的温度条件、适当的缓冲液条件和适当试剂的存在。在一些情况下,适当的温度条件可以使得每个热循环在所需的退火温度下进行。所需的退火温度可能足以使寡核苷酸探针与核酸靶标退火。在一些情况下,适当的缓冲液条件可以使得在热循环过程中使用的缓冲液中存在适当的盐。适当的盐可以包括镁盐、钾盐、铵盐。适当的缓冲液条件可以使得适当的盐以适当的浓度存在。用于通过PCR扩增多个核酸靶标的每个成员的适当试剂可包括脱氧三磷酸(dNTP)。dNTP可包括天然或非天然dNTP,包括例如dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP及其变体。

核酸靶标

[0095] 本公开的核酸靶标可以来源于生物样品。生物样品可以是来源于受试者的样品。生物样品可以包含任何数目的大分子,例如细胞大分子。生物样品可以来源于另一样品。生物样品可以是组织样品,如活检物、针芯活检物、针抽吸物或细针抽吸物。生物样品可以是流体样品,如血液样品、尿液样品或唾液样品。生物样品可以是皮肤样品。生物样品可以是颊拭子。生物样品可以是血浆或血清样品。生物样品可以包含一个或多个细胞。生物样品可以是无细胞样品。无细胞样品可以包含细胞外多核苷酸。细胞外多核苷酸可以从身体样品分离,该身体样品可选自血液、血浆、血清、尿液、唾液、粘膜分泌物、痰、粪便和泪液。

[0096] 核酸靶标可以来源于一个或多个细胞。细胞可以是肿瘤细胞。细胞可以是疑似包含病毒病原体的细胞。在一些情况下,核酸靶标来源于无细胞样品(例如,血清、血浆)。核酸靶标可以是无细胞核酸。无细胞核酸可以是,例如,无细胞肿瘤DNA、无细胞胎儿DNA、无细胞RNA等。核酸靶标可包括脱氧核糖核酸(DNA)。DNA可以是任何种类的DNA,包括基因组DNA。核酸靶标可以是病毒DNA。核酸靶标可包括核糖核酸(RNA)。RNA可以是任何种类的RNA,包括信使RNA、转移RNA、核糖体RNA和微小RNA。RNA可以是病毒RNA。核酸靶标可含一个或多个成员。成员可以是核酸靶标的任何区域。成员可以具有任何长度。成员可以是,例如,至多1、2、3、4、5、10、20、50、100、500、1000、5000、10000、50000或100000个或更多个核苷酸。在一些情况下,成员可以是基因。核酸靶标可包括其检测可用于诊断一种或多种疾病的基因。基因可以是其检测可用于确定受试者中是否存在病原体的病毒基因或细菌基因。在一些情况下,本公开的方法可用于检测受试者中是否存在一种或多种感染原(例如,病毒)。

[0097] 在一些情况下,核酸靶标是染色体。通过本公开的方法分析的一种或多种核酸分子可以对应于染色体。例如,核酸分子可以是染色体的片段。在另一个示例中,核酸分子可以是染色体的扩增产物。可以从一个或多个细胞获得对应于染色体的核酸分子。可以从无细胞样品(例如,血清、血浆、血液等)获得对应于染色体的核酸分子。

样品处理

[0098] 可以与本公开的方法同时、在其之前或之后处理样品。可以处理样品以纯化或富

集核酸(例如,从血浆样品中纯化核酸)。可以处理包含核酸的样品,以纯化或富集目的核酸。可以处理包含核酸的样品,以富集胎儿核酸。可以通过多种方法富集样品中的目的核酸(例如,胎儿核酸),包括,例如,序列特异性富集(例如,通过使用捕获序列)、表观遗传特异性富集(例如,通过使用甲基化特异性捕获部分,如抗体)。富集可包括分离目的核酸和/或消耗掉非目的核酸。在一些情况下,在进行本公开的方法(例如,从样品扩增核酸)之前,无需为了纯化或富集目的核酸而处理样品。例如,如本文其他地方所述,在将样品与寡核苷酸引物和寡核苷酸探针混合之前,可能不必为了富集胎儿核酸而处理样品。

核酸酶

[0099] 本公开的混合物和组合物可以包含一种或多种核酸酶。核酸酶可以具有外切核酸酶活性。核酸酶可以具有内切核酸酶活性。核酸酶可以具有RNA酶活性。核酸酶可能能够降解包含一个或多个核糖核苷酸碱基的核酸。核酸酶可以是例如RNA酶H或RNA酶III。RNA酶III可以是例如切酶。核酸酶可以是内切核酸酶I,例如T7内切核酸酶I。核酸酶可能能够降解包含非天然核苷酸的核酸。核酸酶可以是内切核酸酶V,例如大肠杆菌内切核酸酶V。核酸酶可以是聚合酶(例如,DNA聚合酶)。聚合酶可以是Taq聚合酶或其变体。核酸酶在适当条件下可能能够降解寡核苷酸探针。核酸酶在适当条件下可能能够从寡核苷酸探针释放猝灭剂。

反应

[0100] 反应可以包括使核酸靶标与一个或多个寡核苷酸探针接触。反应可以包括使样品溶液体积(例如,小液滴、孔、管等)与多个寡核苷酸探针接触,每个寡核苷酸探针对应于多个核酸靶标之一,以生成由所述多个寡核苷酸探针生成的多个信号。反应可以包括聚合酶链反应(PCR)。反应可以是数字PCR反应。

[0101] 在一些情况下,来自多个信号的一个或多个信号无法非简并地鉴别多个核酸分子的任何组合的存在或不存在(例如,信号对应于样品体积中核酸分子的两个或更多个组合)。如本文所公开的,可以比较两个或更多个信号,从而以任何组合非简并地指示多个核酸靶标的存在或不存在。

[0102] 在一些情况下,可以使用一个或多个合成(或以其他方式生成的,以与目的靶标不同)引物/探针组来校准反应(例如,数字PCR反应)中多个信号的位置。反应可以包括已知量的模板。反应中的已知模板与其他靶标之比可用来对测定中靶标簇的位置进行归一化(参见,例如,图2)。

寡核苷酸引物

[0103] 本公开的寡核苷酸引物(或“扩增寡聚物”)可以是脱氧核糖核酸。寡核苷酸引物可以是核糖核酸。寡核苷酸引物可以包含一个或多个非天然核苷酸。非天然核苷酸可以是,例如,脱氧肌苷。

[0104] 寡核苷酸引物可以是正向引物。寡核苷酸引物可以是反向引物。寡核苷酸引物的长度可以是约5个至约50个核苷酸。寡核苷酸引物的长度可以是至少5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45或50个或更多个碱基对。寡核苷酸引物的长度可以是至多50、45、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10或5个核苷酸。寡核苷酸引物的长度可以是约5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45或50个碱基对。

[0105] 一组寡核苷酸引物可包含配对的寡核苷酸引物。配对的寡核苷酸引物可包含正向寡核苷酸引物和反向寡核苷酸引物。正向寡核苷酸引物可以被配置为与核酸序列的第一区域(例如,3'末端)杂交,而反向寡核苷酸引物可以被配置为与该核酸序列的第二区域(例如,5'末端)杂交,从而被配置为在足以进行核酸扩增的条件下扩增该核酸序列。不同组寡核苷酸引物可以被配置为扩增不同的核酸靶标序列。

[0106] 混合物可包含多个正向寡核苷酸引物。多个正向寡核苷酸引物可以是脱氧核糖核酸。或者,多个正向寡核苷酸引物可以是核糖核酸。多个正向寡核苷酸引物的长度可以是约5个至约50个核苷酸。多个正向寡核苷酸引物的长度可以是至少5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45或50个或更多个碱基对。多个正向寡核苷酸引物的长度可以是至多50、45、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10或5个核苷酸。

[0107] 混合物可包含多个反向寡核苷酸引物。多个反向寡核苷酸引物可以是脱氧核糖核酸。或者,多个反向寡核苷酸引物可以是核糖核酸。多个反向寡核苷酸引物的长度可以是约5个至约50个核苷酸。多个反向寡核苷酸引物的长度可以是至少5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45或50个或更多个碱基对。多个反向寡核苷酸引物的长度可以是至多50、45、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10或5个核苷酸。

[0108] 在一些方面,混合物可包含用于数字PCR反应的一种或多种合成(或以其他方式生成的,以与目的靶标不同)引物。所述一种或多种合成引物可以与模板组合使用,以校准反应中多个簇的位置(参见,例如,图2)。

[0109] 在一些方面,可以使混合物经历足以使寡核苷酸引物与核酸分子退火的条件。在一些方面,可以使混合物经历足以使多个寡核苷酸引物与核酸分子退火的条件。在一些方面,可以使混合物经历足以使多个寡核苷酸引物与多个核酸靶标退火的条件。可以使混合物经历足以使核酸分子变性的条件。使混合物经历足以使寡核苷酸引物与核酸靶标退火的条件可包括在适合于扩增核酸靶标的反应条件下通过例如聚合酶链反应(PCR)使混合物发生热循环。

[0110] 条件可以使得寡核苷酸引物对(例如,正向寡核苷酸引物和反向寡核苷酸引物)被核酸酶降解。寡核苷酸引物对可被核酸酶的外切核酸酶活性降解。寡核苷酸引物对可被核酸酶的RNA酶活性降解。寡核苷酸引物对的降解可导致寡核苷酸引物的释放。一旦释放,寡核苷酸引物对就可以与模板核酸结合或退火。

寡核苷酸探针

[0111] 本公开的样品、混合物、试剂盒和组合物可包含寡核苷酸探针,在本文中也称为“检测探针”或“探针”。寡核苷酸探针可以是核酸(例如,DNA、RNA等)。寡核苷酸探针可包含与核酸靶标的区域互补的区域。寡核苷酸探针的浓度可以使其相对于样品中的其他组分过量。

[0112] 寡核苷酸探针可包含非靶标杂交序列。非靶标杂交序列可以是与核酸靶标序列的任何区域都不互补的序列。包含非靶标杂交序列的寡核苷酸探针可以是发夹检测探针。包含非靶标杂交序列的寡核苷酸探针可以是分子信标探针。分子信标探针的实例在例如美国专利7,671,184中提供,该专利通过引用整体并入本文。包含非靶标杂交序列的寡核苷酸探针可以是分子火炬(molecular torch)。分子火炬的实例在例如美国专利6,534,274中提供,该专利通过引用整体并入本文。

[0113] 样品可包含超过一个寡核苷酸探针。多个寡核苷酸探针可以相同,或者可以不同。寡核苷酸探针的长度可以是至少5个、至少10个、至少15个、至少20个或至少30个或更多个核苷酸。寡核苷酸探针的长度可以是至多30个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个核苷酸。在一些实例中,混合物包含第一寡核苷酸探针和一个或多个另外的寡核苷酸探针。寡核苷酸探针可以是核酸(例如,DNA、RNA等)。寡核苷酸探针的长度可以是至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50个或更多个核苷酸。寡核苷酸探针的长度可以是至多50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3或2个核苷酸。

[0114] 在一些情况下,将2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20个或更多个不同的寡核苷酸探针分配到多个分区中。每个寡核苷酸探针可以对应于(例如,能够结合)样品中核酸靶标(例如,染色体)的给定区域。在一个实例中,第一寡核苷酸探针对第一核酸靶标的第一区域具有特异性,第二寡核苷酸探针对第一核酸靶标的第二区域具有特异性,第三寡核苷酸探针对第一核酸靶标的第三区域具有特异性。每个寡核苷酸探针可包含具有大致相等的发射波长的信号标签。在一些情况下,每个寡核苷酸探针包含相同的荧光团。在一些情况下,每个寡核苷酸探针包含不同的荧光团,其中每个荧光团能够在单个光学通道中被检测到。

[0115] 在一些方面,混合物可包含用于数字PCR反应的一个或多个合成(或以其他方式生成的,与目的靶标不同)探针。所述一个或多个合成探针可以具有已知的与反应中的其他靶标的荧光比,并用来校准反应中的多个簇的位置。所述一个或多个合成探针可用来通过确保一些但不是大多数小液滴在不同簇中生成“阳性”荧光来对测定中的靶标簇的位置进行归一化(参见,例如,图2)。

[0116] 探针可以对应于核酸靶标的区域。例如,探针可以与核酸靶标的区域具有互补性和/或同源性。探针可包含与核酸靶标的区域互补或同源的区域。对应于核酸靶标区域的探针可能能够在适当条件(例如,温度条件、缓冲液条件等)下与核酸靶标区域结合。例如,探针可能能够在适合于聚合酶链反应的条件下与核酸靶标的区域结合。探针可以对应于与核酸靶标相对应的寡核苷酸。例如,寡核苷酸可以是具有与核酸靶标互补的区域和与探针互补的区域的引物。

[0117] 探针可以是与给定核酸靶标的区域互补的核酸。在本公开的方法和测定中使用的每个探针可包含至少一个荧光团。荧光团可以选自任何数目的荧光团。荧光团可以选自三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个或更多个荧光团。在单个反应中使用的一个或多个寡核苷酸探针可包含相同的荧光团。在一些情况下,在单个反应中使用的所有寡核苷酸探针均包含相同的荧光团。每个探针在被激发并与其对应的核酸靶标接触时可生成信号。信号可以是荧光信号。可以由一个或多个探针生成多个信号。

[0118] 寡核苷酸探针可以与多个核酸靶标的任何成员具有小于50%、40%、30%、20%、10%、5%或1%的互补性。寡核苷酸探针可以与所述多个核酸靶标的任何成员不具有互补性。

[0119] 寡核苷酸探针可包含可检测标记。可检测标记可以是化学发光标记。可检测标记可包含化学发光标记。可检测标记可包含荧光标记。可检测标记可包含荧光团。荧光团可以是,例如,FAM、TET、HEX、JOE、Cy3或Cy5。荧光团可以是FAM。荧光团可以是HEX。寡核苷酸探针可以进一步包含一种或多种猝灭剂。猝灭剂可以抑制从荧光团生成信号。猝灭剂可以是,例

如, TAMRA、BHQ-1、BHQ-2或Dabcy。猝灭剂可以是BHQ-1。猝灭剂可以是BHQ-2。

信号生成

[0120] 可以进行热循环,使得一个或多个寡核苷酸探针被核酸酶降解。寡核苷酸探针可以被核酸酶的外切核酸酶活性降解。寡核苷酸探针可以在降解时生成信号。在一些情况下,只有在混合物中存在多个核酸靶标的至少一个成员时,寡核苷酸探针才可以生成信号。

[0121] 反应可以生成一个或多个信号。反应可以生成包含多个信号之和的累积强度信号。信号可以是化学发光信号。信号可以是荧光信号。信号可以由寡核苷酸探针生成。例如,激发包含发光信号标签的杂交探针可以生成信号。信号可以由荧光团生成。荧光团可以在从杂交探针上释放时生成信号。反应可以包括荧光团的激发。反应可以包括信号检测。反应可以包括检测来自荧光团的发射。

[0122] 信号可以是荧光信号。信号可以对应于荧光强度水平。在本公开的方法中测量的每个信号可以具有不同的荧光强度值,从而对应于在分区中存在核酸靶标的独特组合。信号可以由一个或多个寡核苷酸探针生成。在数字测定中生成的信号的数目可以对应于所分配的寡核苷酸探针的数目、所分配的核酸靶标的数目,以及在一些情况下,对应于分区条件。例如,在分配三个核酸靶标和三个寡核苷酸探针以使得每个分区可以包含一个、两个或全部三个核酸靶标的情况下,可以生成七个信号,其中每个信号对应于在分区中存在所述三个核酸靶标的独特结合。N可以是在本公开的测定中在单个光学通道中检测到的信号的数目。N可以是至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、40、50或更多。N可以是至多50、40、30、24、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2。N可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、40或50。

[0123] 如将会认识到并在本文其他地方描述的,可以在多个不同的光学通道中生成成组信号,其中在单个光学通道中检测每组信号,从而显著增加在单个反应(例如,数字PCR反应)中能够测得的核酸靶标的数目。在一些情况下,在单个反应中检测两组信号。反应中检测到的每组信号可以包含相同数目的信号或不同数目的信号。

[0124] 在一些情况下,可在寡核苷酸探针与核酸区域杂交的同时生成信号。例如,寡核苷酸探针(例如,分子信标探针或分子火炬)可以在与核酸杂交后生成信号(例如,荧光信号)。在一些情况下,可在寡核苷酸探针与核酸区域杂交之后,在寡核苷酸探针被核酸酶降解之后生成信号。

[0125] 在寡核苷酸探针包含信号标签的情况下,该寡核苷酸探针当与寡核苷酸引物的区域结合时可以被降解,从而生成信号。例如,寡核苷酸探针(例如, **TaqMan®** 探针)可以在寡核苷酸探针与核酸杂交并且随后被聚合酶降解(例如,在扩增如PCR扩增过程中)之后生成信号。寡核苷酸探针可以被核酸酶的外切核酸酶活性降解。

[0126] 寡核苷酸探针可包含猝灭剂和荧光团,使得猝灭剂在寡核苷酸探针降解时释放,从而生成荧光信号。可以利用热循环生成一种或多种信号。热循环可以生成至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个信号。热循环可以生成至多10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个信号。多个信号可以是相同的类型或不同的类型。不同类型的信号可以是具有不同荧光波长的荧光信号。不同类型的信号可以由包含不同荧光团的可检测标记生成。相同类型的信号可以具有不同的强度(例如,相同荧光波长的不同强度)。相同类型的信号可以是在相同颜色通道中可检测的信号。相同类型的信号可以由包含相同荧光团的可检测标记生成。包含相同荧光

团的可检测标记可以通过处于不同浓度的性质而生成不同的信号,从而生成相同信号类型的不同强度。

[0127] 本公开中呈现的方法可以与任何可定量的信号一起使用。在一些情况下,本公开提供了使用信号的单个分量(例如,强度)对靶标进行定量的方法。例如,分析可依赖于多个信号强度,而不考虑颜色。尽管已经使用荧光探针来阐释该原理,但是所公开的方法同样适用于提供包括电化学信号和化学发光信号在内的可定量信号的其他任何方法。

[0128] 本公开中呈现的方法还可以利用至少二维的信号测量,也称为信号的至少两个分量的测量(例如,颜色和强度)。在一些情况下,可定量信号包括具有频率(波长)和幅度(强度)的波形。信号可以是电磁信号。电磁信号可以是声音、无线电信号、微波信号、红外信号、可见光信号、紫外线信号、X射线信号或伽马射线信号。在一些情况下,电磁信号可以是荧光信号,例如可以就波长和强度来表征的荧光发射光谱。

[0129] 在本公开的某些部分中,以荧光信号为例描述并例示了信号。这并不意味着是限制性的,并且本领域普通技术人员将容易认识到,适用于荧光信号测量的原理也适用于其他信号。例如,像荧光信号一样,以上描述的任何电磁信号也可以就波长和强度来表征。荧光信号的波长也可以就颜色来描述。可以基于在特定波长或波长范围内测量强度来确定颜色,例如,通过确定不同波长处的荧光强度分布和/或通过使用带通滤波器确定特定波长范围内的荧光强度来确定颜色。强度可以用光电探测器来测量。波长范围可以被称为“通道”、“颜色通道”或“光学通道”。

[0130] 可以检测一个或多个信号的存在或不存在。可以检测一个信号,或者可以检测多个信号。可以同时检测多个信号。或者,可以顺序检测多个信号。信号的存在可以与核酸靶标的存在相关联。至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个信号的存在可以与至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个核酸靶标中至少一个的存在相关联。信号的不存在可以与相应核酸靶标的不存在相关联。至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个信号的不存在可以与至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个核酸靶标分子中的每一个的不存在相关联。

试剂盒

[0131] 本公开还提供了用于多重分析的试剂盒。试剂盒可包含一个或多个寡核苷酸探针。寡核苷酸探针可以被冻干。不同的寡核苷酸探针可以以不同的浓度存在于试剂盒中。寡核苷酸探针可包含荧光团和/或一种或多种猝灭剂。

[0132] 试剂盒可包含一组或多组如本文所述的寡核苷酸引物(或“扩增寡聚物”)。一组寡核苷酸引物可包含配对的寡核苷酸引物。配对的寡核苷酸引物可包含正向寡核苷酸引物和反向寡核苷酸引物。一组寡核苷酸引物可以被配置为扩增与特定靶标相对应的核酸序列。例如,正向寡核苷酸引物可以被配置为与核酸序列的第一区域(例如,3'末端)杂交,而反向寡核苷酸引物可以被配置为与该核酸序列的第二区域(例如,5'末端)杂交,从而被配置为扩增该核酸序列。不同组寡核苷酸引物可以被配置为扩增核酸序列。在一个实例中,第一组寡核苷酸引物可以被配置为扩增第一核酸序列,并且第二组寡核苷酸引物可以被配置为扩增第二核酸序列。被配置为扩增核酸分子的寡核苷酸引物可以在进行所公开的方法中使用。在一些情况下,试剂盒中的所有寡核苷酸引物都被冻干。

[0133] 试剂盒可包含一种或多种核酸酶。核酸酶可以是核酸聚合酶。核酸聚合酶可以是脱氧核糖核酸聚合酶(DNA酶)。DNA酶可以是Taq聚合酶或其变体。核酸酶可以是核糖核酸聚

合酶(RNA酶)。RNA酶可以是RNA酶III。RNA酶III可以是切酶。核酸酶可以是内切核酸酶。内切核酸酶可以是内切核酸酶I。内切核酸酶I可以是T7内切核酸酶I。试剂盒可以包含关于在本文所述的方法中使用任何前述物质的说明书。

[0134] 另外,试剂盒可包含用于数字PCR反应的一个或多个合成(或以其他方式生成的,以与目的靶标不同)引物/探针组。所述一个或多个合成引物/探针组可用来校准多重反应中多个簇的位置。试剂盒还可以包含已知量的模板。

[0135] 本文提供的试剂盒可用于例如计算至少第一和第二总和,每个是与第一和第二染色体相对应的多个靶信号的总和。

实施例

实施例1-在具有重叠簇的数字PCR测定中估计靶标量

[0136] 运行数字PCR测定,该测定由具有不同探针浓度的两个用ATT0532染料标记的靶标组成,这根据分区是否含有以下成分而形成离散的簇:(1)无模板;(2)FluAPan标记;(3)FluAH3标记;或(4)Pan FluA和FluAH3靶标。该测定在Bio-Rad CX100上进行测试,示例性的孔数据在图3A中示出。虽然没有对每个簇进行空间解析,但是指示存在不同簇的小液滴密度场的等值线图是可识别的,如图3B所示。图3C所示的x轴的密度图示出了四个不同的簇,其中无法鉴别来自每个簇的单个小液滴,也不能用标准“截断”方法确定每个簇的小液滴数目。

[0137] 可以使用多种方法来选择多峰分布中的峰之间的中点或最小值处的阈值。图4A显示了使用每个簇峰之间的中点作为阈值,并将给定区域中的所有小液滴均分配给该簇(“中点阈值建模”)。图4B显示了使用峰之间的最小值作为阈值,并将给定区域中的小液滴分配给该簇(“相对最小阈值化”)。

[0138] 由于许多简单分布是单峰分布,因此对多峰分布进行建模的一种方式假设它是由多个单峰分布生成的。虽然不能将每个单独的小液滴分配给母簇,但是可以通过假设每个簇的基础分布模型并将直方图分解为单个分量来分配小液滴的相对数和总数(参见图5)。图5显示了在10,000拷贝输入时以1750个荧光强度单位为中心的FluA靶标和在1000拷贝输入时以1500个荧光单位为中心的RSVB靶标的示例直方图分解。

[0139] 在真实世界单峰数据建模中最常用的分布是高斯分布。此外,高斯混合模型(“部分概率求和”)保留了高斯模型的许多理论和计算优势,使其对于极大型数据集的有效建模非常实用。因此,此处使用将多峰数据建模为许多单峰高斯分布的混合物。

[0140] 高斯参数对每个簇进行拟合,并且基于模型中每个高斯的高度比将一系列部分概率分配给分布中的每个小液滴。通过将所有小液滴中每个小液滴的部分概率求和,估计出拷贝数/小液滴和比率。

公式1:高斯混合模型分布的方程式

$$ae^{-\frac{(x-b)^2}{2c^2}}$$

[0141] 为了评估使用不同方法进行定量的优势,在数字PCR测定中运行了5个重复孔,并在孔之间评估了估计的拷贝数/小液滴(CPD)或FluAH3标记/FluAPan之比的变异系数。

[0142] 图6显示了对于数据的代表性高斯拟合,并且表1显示了分配的示例小液滴强度和部分概率。

表1

小液滴	强度	p (1)	p (2)	p (3)	p (4)
1	750	1	0	0	0
2	930	0	1	0	0
3	1000	0	0.5	0.5	0
总计	NA	1	1.5	0.5	0

[0143] 在给定小液滴中FluAH3的总概率被估计为 $0.5/3=1/6$,然后使用泊松采样统计学($\lambda=-\ln(1-k/n)$),其中k是阳性小液滴的数目,n是小液滴的总数, λ 是每个小液滴的平均拷贝数)根据占用的预期泊松分布对其进行校正。结果是3.81的计算比(其中FluAH3: $=-\ln(1-0.5/3.0)=0.182$ 个拷贝/小液滴,且FluAPan: $=-\ln(1-1.5/3.0)=0.69$ 个拷贝/小液滴)。

[0144] 高斯混合模型进一步用于从概率分布直接计算拷贝数/小液滴(CPD)和比率(“直接概率分布”)。

公式2:高斯下面积,其中N是鉴别的特定簇的面积。

$$A_n = \sqrt{2}a_n|c_n|\sqrt{\pi}$$

公式3:在不包括模板簇的N个总簇的混合物中,计算对一个靶标估计的拷贝数/小液滴。

$$\text{拷贝数/小液滴H3} = -\ln\left(1 - \frac{A_3 + A_4}{\sum_{n=1}^N A_n}\right) = -\ln\left(1 - \frac{a_3|c_3| + a_4|c_4|}{\sum_{n=1}^N a_n|c_n|}\right)$$

公式4:通过对含有靶标的每个簇的概率分布下面积进行求和并校正分区的泊松加载,直接计算两个靶标的比率。

$$H3:FluAPan\text{比} = \frac{-\ln\left(1 - \frac{a_3|c_3| + a_4|c_4|}{\sum_{n=1}^N a_n|c_n|}\right)}{-\ln\left(1 - \frac{a_2|c_2| + a_4|c_4|}{\sum_{n=1}^N a_n|c_n|}\right)}$$

[0145] 在对模板的拷贝数/小液滴进行定量或直接计算靶标之间的比率的情况下,这些新方法所需的步骤较少,并且显示出比当前方法改进的可重复性。比较了FluAPan(表2)和FluAH3(表3)之间的峰值最小阈值化、中点阈值化、部分概率求和以及直接概率分布。确定了FluAPan和FluAH3靶标浓度之间的计算比率,并显示在表4中。

表2

孔	峰值最小阈值化	中点阈值化	部分概率求和	直接概率分布
1	0.488	0.557	0.540	0.536
2	0.437	0.497	0.486	0.483
3	0.431	0.491	0.501	0.497
4	0.483	0.545	0.514	0.508
5	0.573	0.669	0.596	0.584
%CV	11.8%	13.0%	8.2%	7.8%

表3

孔	峰值最小阈值化	中点阈值化	部分概率求和	直接概率分布
1	0.895	0.828	0.874	0.871
2	0.851	0.778	0.868	0.863
3	0.799	0.834	0.820	0.816
4	0.855	0.929	0.867	0.861
5	0.956	0.843	0.891	0.879
%CV	6.7%	6.5%	3.1%	2.9%

表4

孔	峰值最小阈值化	中点阈值化	部分概率求和	直接概率分布
1	1.83	1.49	1.62	1.63
2	1.95	1.57	1.78	1.79
3	1.85	1.70	1.64	1.64
4	1.77	1.70	1.69	1.72
5	1.67	1.26	1.50	1.51
%CV	5.7%	11.9%	6.4%	6.4%

[0146] 将数字PCR测定的六个孔(各自显示大的下尾)(图7A和图7B)合并,以形成图7C中所示的图,并评价各种方法在确定起始材料的原始已知计数方面的准确性。

[0147] 与实施例1中描述的方法一样,将常规的基于阈值的方法(如图8所示)与簇分布建模、为每个小液滴分配部分小液滴概率以及在所有小液滴中求和结合使用。

[0148] 图9A显示了来自图7C的数据的密度图。图9B显示了来自图9A的曲线图的放大的y

轴。针对顶峰构建了非高斯分布模型，并与数据拟合，如图9C所示。在图9D中示出了放大视图。

[0149] 生成了所有分区的表格，示例分区在表5中示出。根据强度，将部分概率分配给每个分区的每个母峰。然后将所有分区的部分概率求和，以计算与每个靶标相关联的估计的拷贝数/小液滴，并估计靶标的比率。另外，该比率还直接从拟合分布下面积计算，而无需估算每个靶标的浓度。如表6所示，估计的拷贝数/小液滴和靶标比率明显更接近于真实的源数据。使用模型来拟合分布并估算来源的“模型”版本，在估计的拷贝数/小液滴和靶标比率方面都比图8所示的当前标准实践“阈值”方法更为接近。

表5

分区	Ch2强度	P (1)	P (2)	P (3)
1	2750	0	0.41	0.59
2	3000	0	0.51	0.49
3	3250	0	0.60	0.40
总计	3500	0	0.68	0.32

表6

靶标	真	阈值	模型
1	0.151	0.170	0.150
2	0.138	0.120	0.141
1:2	1.09	1.42	1.06

实施例2-通过测量靶标信号总和来区分RSVA和鼻病毒 (RhV)

[0150] 构建了用于数字PCR测定的制剂，使得BioRad CX100系统上由于在小液滴中存在任一个靶标而导致的荧光强度映射到该系统的荧光通道1 (FAM) 上的相同位置。使用含有约20,000个拷贝的RSVA合成模板、约20,000个拷贝的鼻病毒 (RhV) 合成模板或同时包含这两种模板的孔进行了测试。

[0151] 图10显示了该dPCR测定的结果，其中含有RSVA或鼻病毒的靶标的小液滴均以50个荧光强度单位的强度发出荧光，不含靶标的小液滴以-150个荧光强度单位发出荧光，而含有RSVA和鼻病毒两者的小液滴以约200个荧光强度单位发出荧光。图11A示出了在通道1中以50个荧光单位为中心的RSVA靶标。图11B示出了以与RSVA相同的位置为中心的鼻病毒靶标。图11C示出了显示同时存在两个靶标的图形。在这种情况下，不可能对给定的小液滴解析存在哪种病毒，但是可以量化总病毒载量以及是否同时存在两者。表7示出了基于对图11A-11C的曲线的分析而估计出的拷贝数/小液滴。

表7

靶标	拷贝数/小液滴(CPD)
RSVA	1.93
RhV	1.73
RSVA + RhV	3.63
从单重分析 (singleplex) 预期的 RSVA + RhV	3.65

[0152] 重要的是,该方法不包括确定任何单个分区的状态的任何步骤,因此不包括对任何数目的分区进行计数的任何步骤。而是如上所述,基于小液滴的分布计算出数值,基于该数值各自确定代表性的总和,并且不进行任何分区计数的确定。两个靶标之间大约有10%的差异。

[0153] 对于图11A-C中三个箱元(bin)中的每个箱元中的阳性计数的频率, F_0 、 F_1 、 F_2 和 x , $y = \exp(-\lambda_1)$ 和 $\exp(-\lambda_2)$ 。

$$F_0 = xy$$

$$F_1 = x + y - 2xy$$

$$F_2 = 1 - x - y - xy$$

$$1 = F_0 + F_1 + F_2$$

当 $F_0 + F_1 + F_2 = 1$ 时,该方程式可以重排为:

$$xy = F_0$$

$$x + y = 2F_0 + F_1$$

因此,若 $C = 2 * F_0 + F_1$,则可以用二次方程式求解 x 和 y :

$$C = 2F_0 + F_1$$

$$x = \frac{1}{2} \left(C + \sqrt{C^2 - 4F_0} \right)$$

$$y = \frac{1}{2} \left(C - \sqrt{C^2 - 4F_0} \right)$$

实施例3-使用数字PCR分析单个染色体上的多个基因座

[0154] 图12A-B显示了单独强度单位为“1”的3个靶标的数字PCR模拟结果,其中存在多个靶标导致更高强度水平的峰。该模拟包括开发20,000个虚拟分区,并将每个输入DNA拷贝随机分配给分区。对于每个分区,如果在随机分配后存在特定的“靶标”DNA,则向小液滴的强度水平增加强度水平“1”。因此,如果分区没有DNA,则分配强度“0”;如果只有一个靶标的DNA的一个或多个拷贝,则分配强度“1”;如果存在两个靶标的DNA的一个或多个拷贝,则分配强度“2”;如果存在所有三个靶标的一个或多个拷贝,则分配强度水平“3”。为便于作图,向每个小液滴的强度增加少量正态分布的噪声。在该示例中,“靶标”是指每个单独的生成强度的探针序列,但是在其他情况下,靶标可指更大的靶标集合,例如单个染色体上的多个基因座。

[0155] 图13A-13B显示了针对来自单个染色体的10个不同基因座的数字PCR测定的类似模拟。存在强度水平为1的十个靶标,每个靶标10,000个拷贝的输入拷贝在20,000个分区中

分布,从而导致在任何给定小液滴中存在可达不同基因座的分区。出现了清晰而明显的模式,从而允许计算初始输入量和总计数为100,000的阳性DNA输入。

[0156] 图13C-13D显示了强度水平为‘1’的一个靶标的数字PCR测定的类似模拟,该靶标以100,000个拷贝的输入DNA存在,随机分布于20,000个分区中。大部分分区都被输入DNA饱和,表明额外输入拷贝的DNA的响应不太可能生成可测量的输出。

[0157] 图14显示了数字PCR模拟,其中对于图13A-D中的两种策略,DNA以不同输入水平随机分配到分区中。多次运行模拟,以生成试验之间输入DNA测量的变异系数。深灰色线表示当前方法作为输入标度的输入DNA拷贝量中的噪声。随着输入拷贝数的增加,测量中的噪声降至最低约1%,然后由于所有分区都被DNA饱和而开始上升。使用上述新方法,随着有更多输入DNA,定量测量中的噪声继续下降,从而使更高水平的定量能力显著提高。

实施例4-使用数字PCR分析两个染色体上的多个基因座

[0158] 图15A-C显示了与实施例3所进行的相类似的,针对18号染色体上的单个基因座和21号染色体上的单个基因座的基本单通道多重化的数字PCR模拟,显示了每个单独靶标的不同强度水平以及多重存在。

[0159] 图16A-C显示了与实施例3所进行的相类似的,采用18号染色体和21号染色体上各4个基因座的数字PCR模拟。在强度水平分别为“1”(对于18号染色体)和“3”(对于21号染色体)的额外基因座的情况下,在存在多个染色体基因座的地方出现了次级条带。

[0160] 图17A-C显示了与实施例3所进行的相类似的,采用18号染色体和21号染色体上各4个基因座的数字PCR模拟。

[0161] 图18A显示了与实施例3所进行的相类似的,与强度水平‘1’对准的四个18号染色体基因座和强度水平为‘3’的四个21号染色体基因座的数字PCR模拟。图18B显示了在Bio-Rad QX200上使用全基因组DNA收集的数字PCR实验的实验数据。Y轴表示通道强度,X轴表示小液滴宽度。图18C显示了对于10,000个拷贝的输入基因组DNA,如图18A中的数字PCR模拟。图18D显示了对于10,000个拷贝的输入全基因组DNA,数字PCR实验的实验结果。这证明了在大约20,000个分区的反应中,对40,000个拷贝的18号染色体和40,000个拷贝的21号染色体进行定量的能力。

实施例5-模拟输入DNA测量

[0162] 图19A-B显示了如实施例4中所述的数字PCR测定模拟,其由40个靶标组成,输入为10,000个拷贝的基因组DNA。该模拟显示了在400,000个拷贝的输入DNA时的独特响应。

实施例6-数字PCR NIPT测定

[0163] 扩增与21号染色体相对应的四个核酸靶标,并确定由所有四个靶标生成的和信号,而无需确定任一个单独靶标的水平。平行地,扩增与18号染色体相对应的四个靶标,并确定由所有这四个靶标生成的和信号,而无需确定任一个单独靶标的水平。然后比较这两个和信号,并确定比率。利用该比率确定来自母体血浆样品的胎儿非整倍性的存在。

[0164] 当提及可测量的值,如量、持续时间等时,术语“约”旨在涵盖指定值的 $\pm 20\%$ 的变化,或者在一些情况下为 $\pm 10\%$,或者在一些情况下为 $\pm 5\%$,或者在一些情况下为 $\pm 1\%$,或者在一些情况下为 $\pm 0.1\%$,因此这样的变化适于进行所公开的方法。此外,“约”可意指正负小于1%或1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%或大于30%,这取决于情况并且是本领域技

术人员已知或可知的。“约”还包括确切的量。因此，“约200nm”意指“约200nm”，并且还表示“200nm”。

[0165] 虽然本文已经显示并描述了本发明的优选实施方案，但是对于本领域技术人员显而易见的是，这些实施方案仅以示例的方式提供。并非打算用本说明书中提供的具体实例来限制本发明。尽管已经参照上述说明书对本发明进行了描述，但并不意味着对本文实施方案的描述和说明以限制性的意义来解释。在不脱离本发明的情况下，本领域技术人员现将想到许多变化、改变和替换。此外，应当理解，本发明的所有方面均不限于本文所阐述的具体描述、配置或相对比例，其取决于多种条件和变量。应当理解，在实施本发明的过程中可以采用本文所述的本发明实施方案的各种替代方案。因此可以预期，本发明还应涵盖任何这类替代、改变、变化或等同物。旨在以所附权利要求书限定本发明的范围，由此涵盖在这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

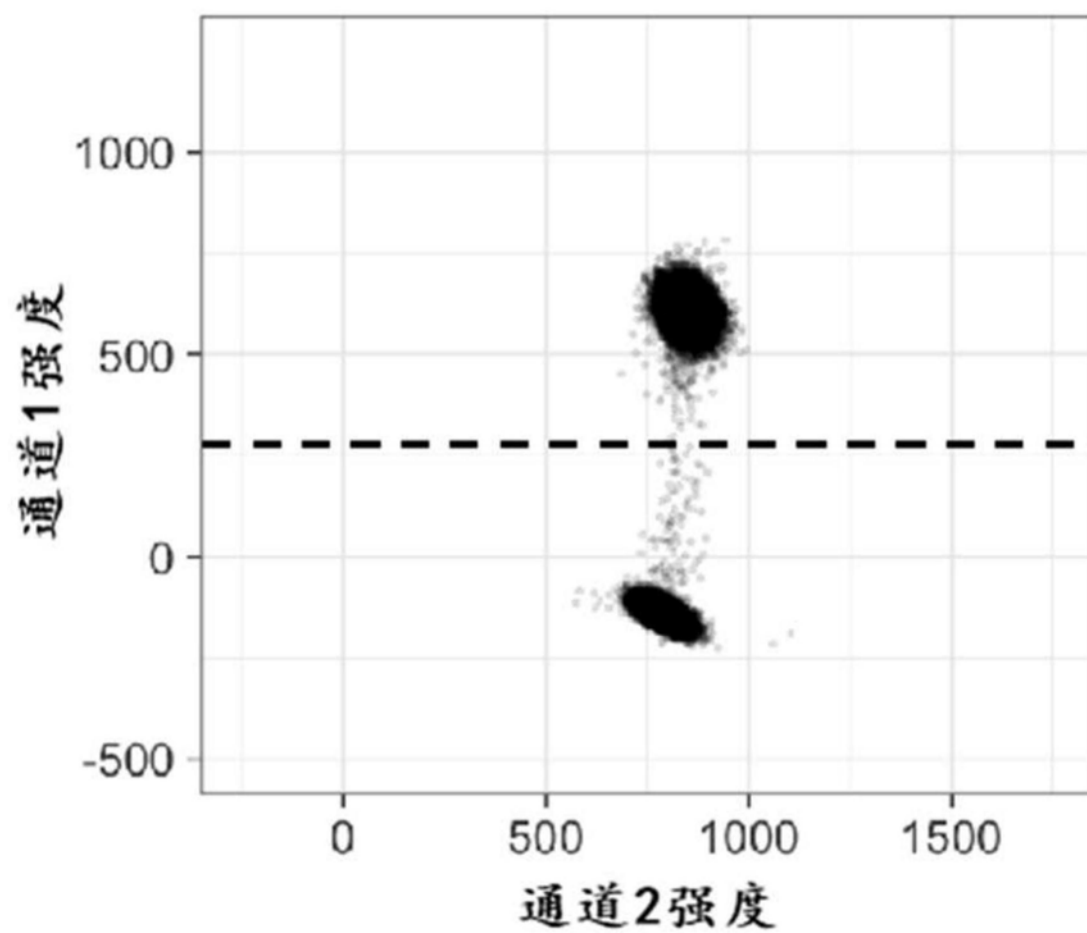


图1

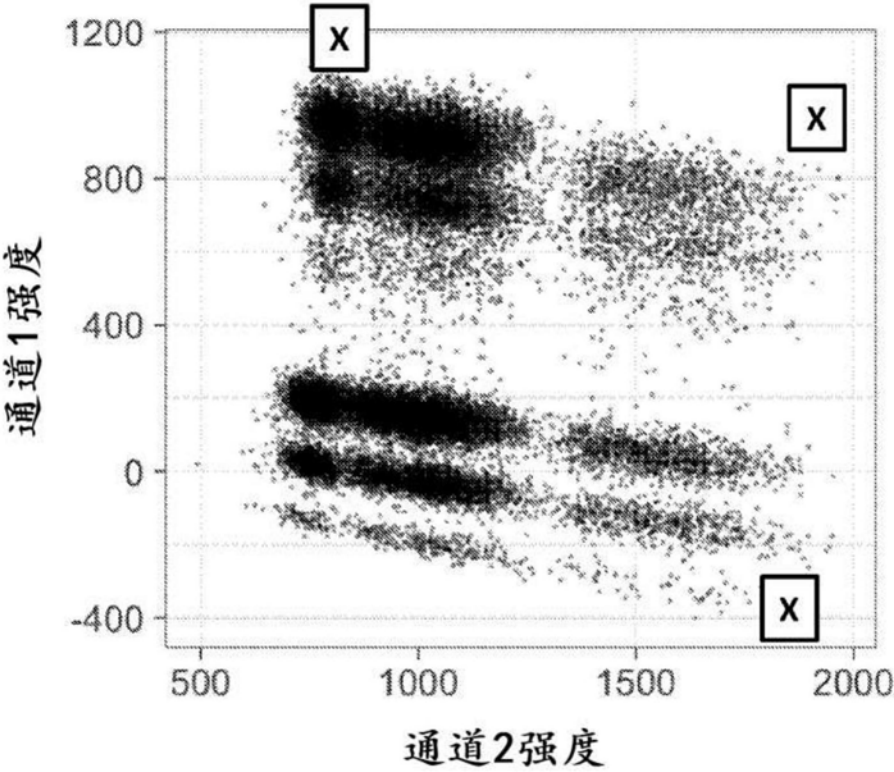


图2

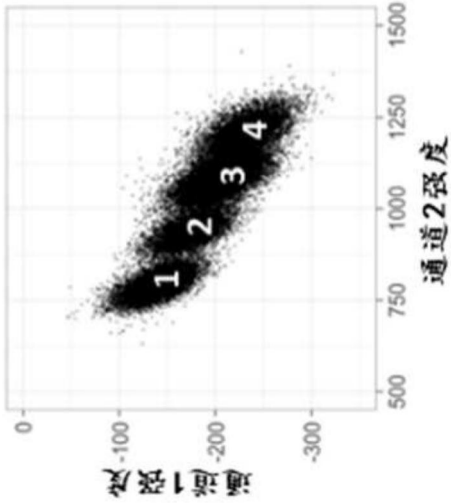


图3A

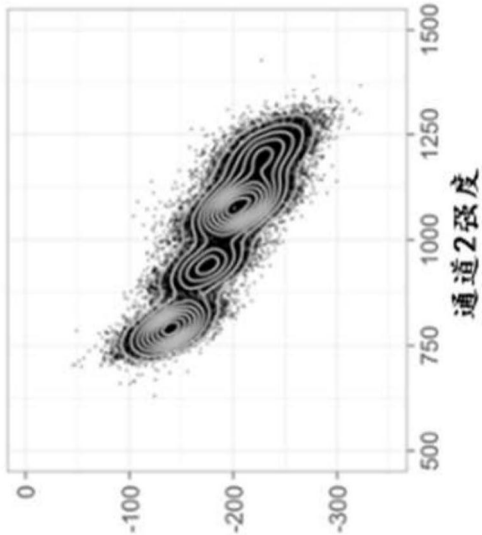


图3B

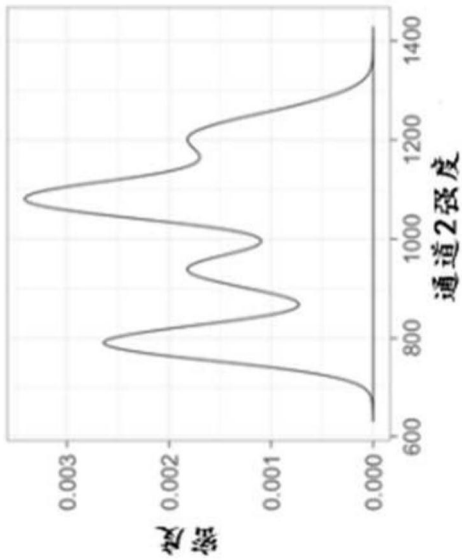


图3C

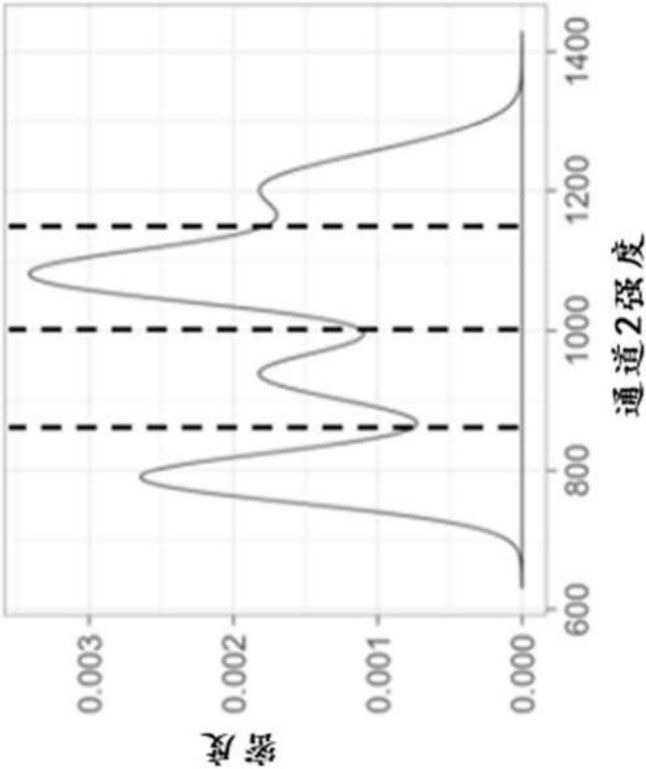


图4A

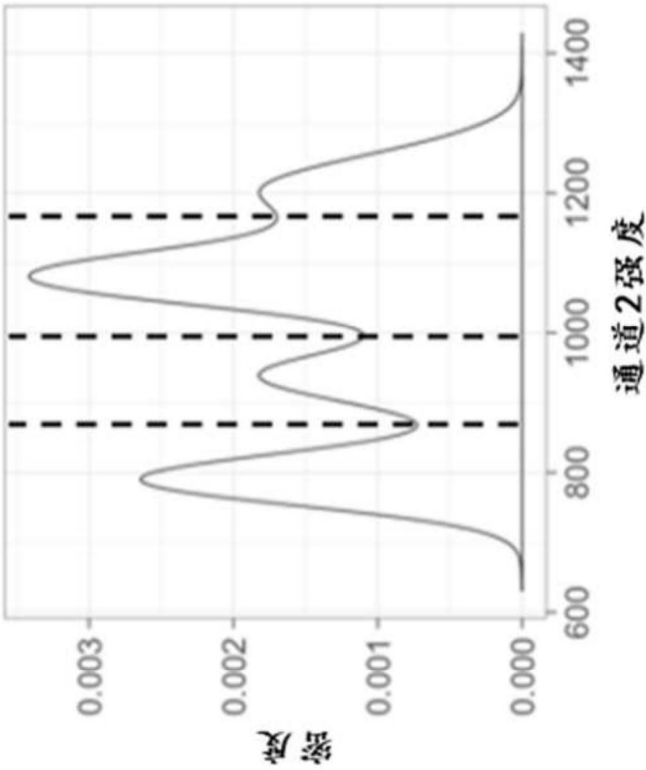


图4B

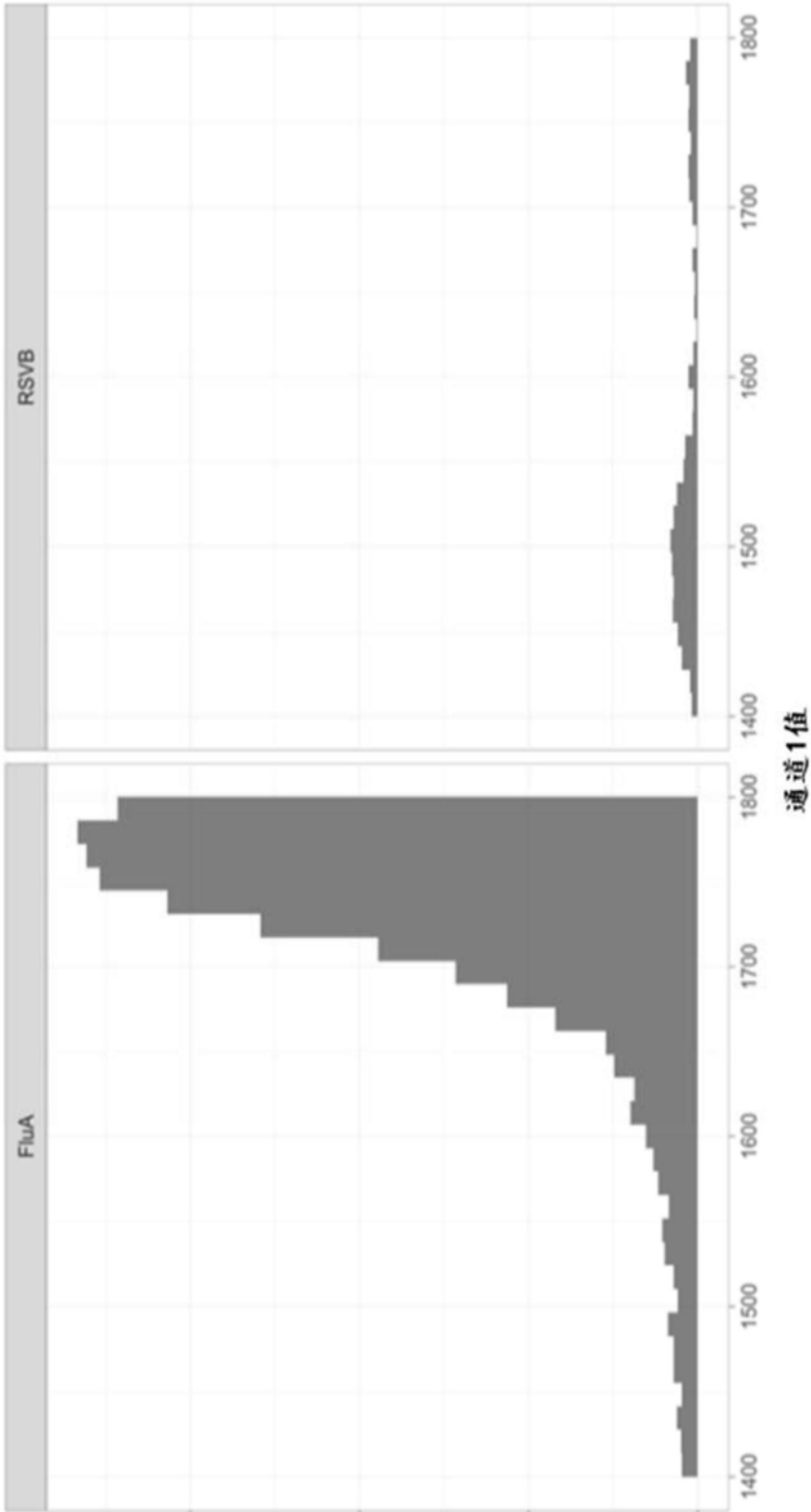


图5

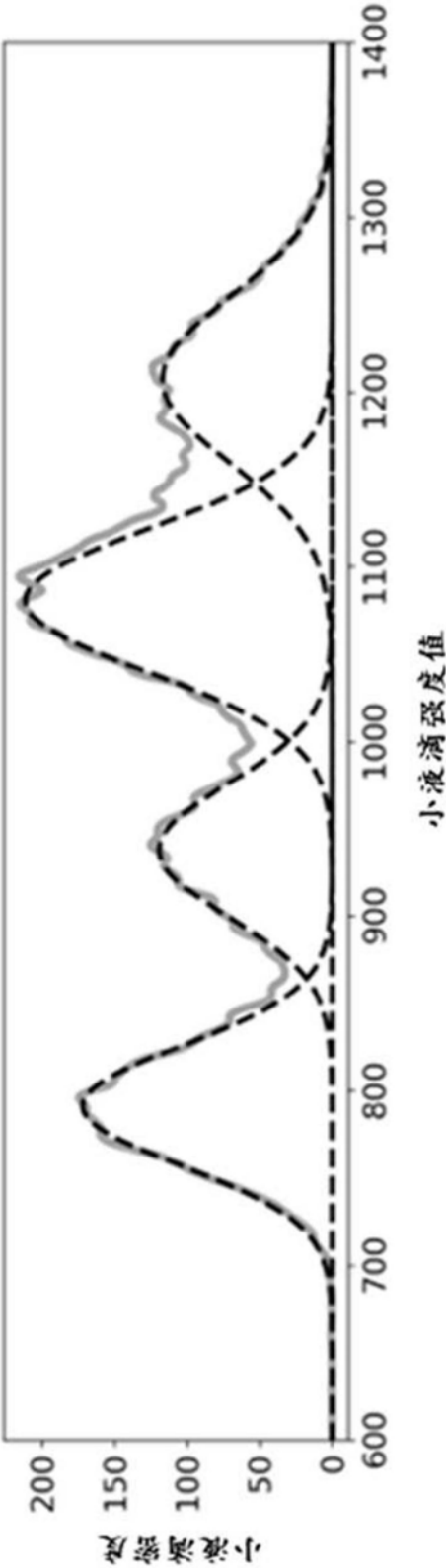


图6

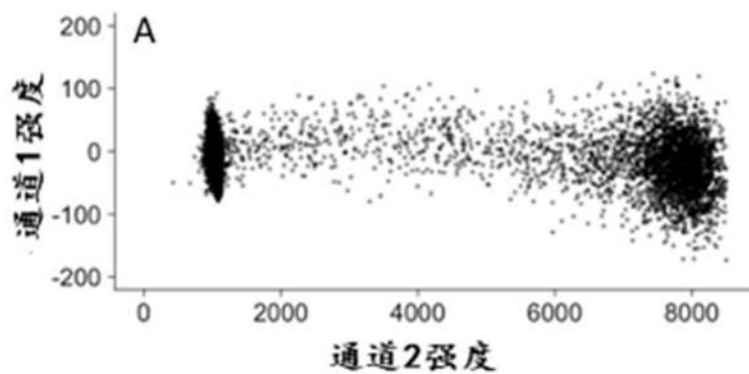


图7A

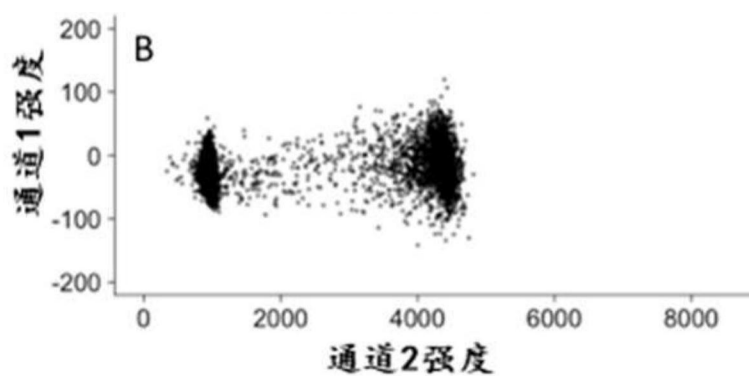


图7B

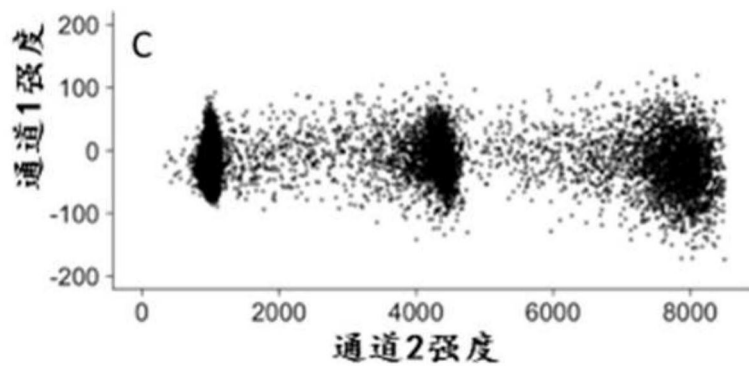


图7C

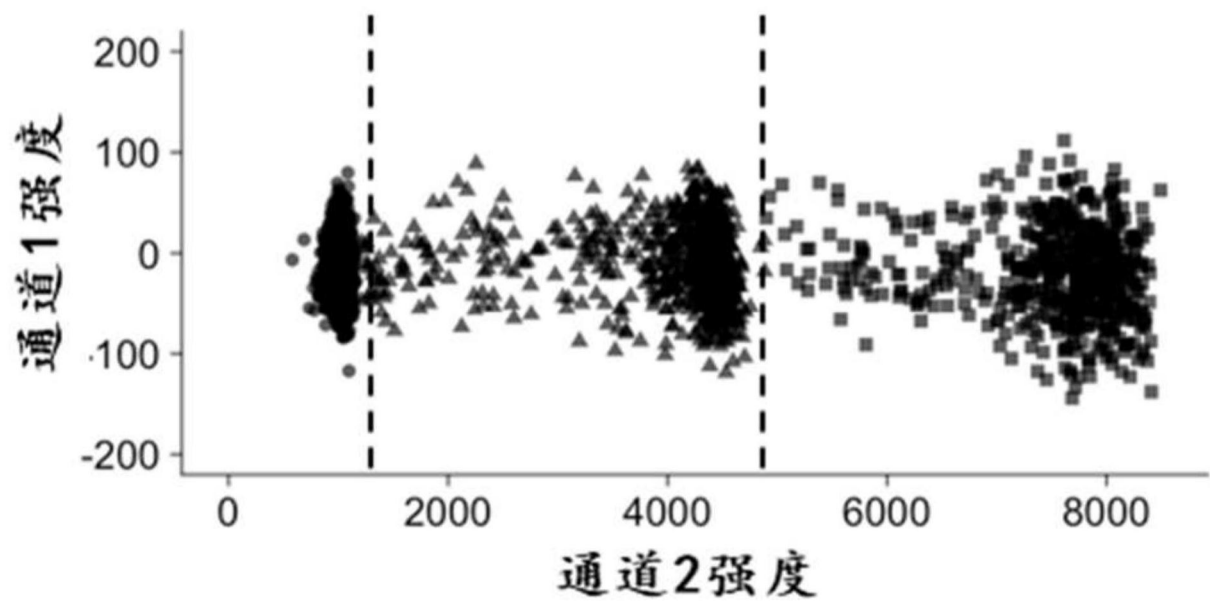


图8

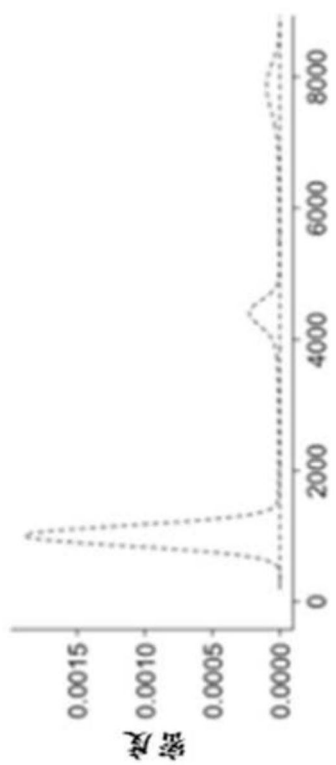


图9A

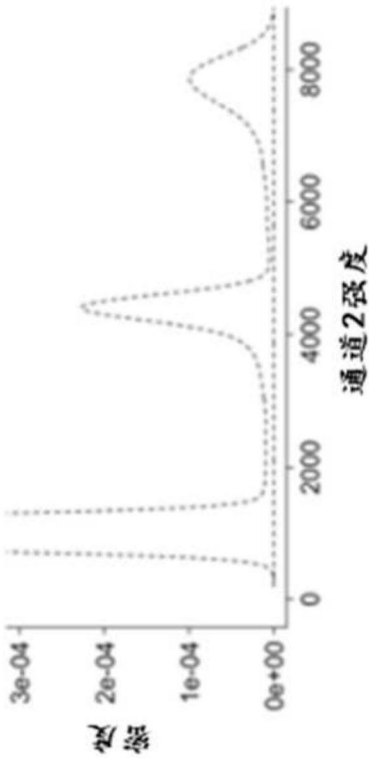


图9B

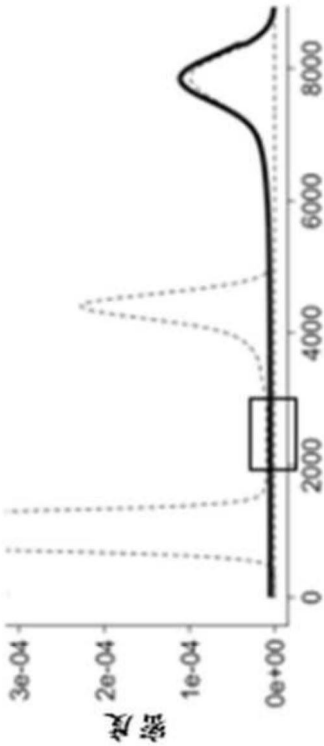


图9C

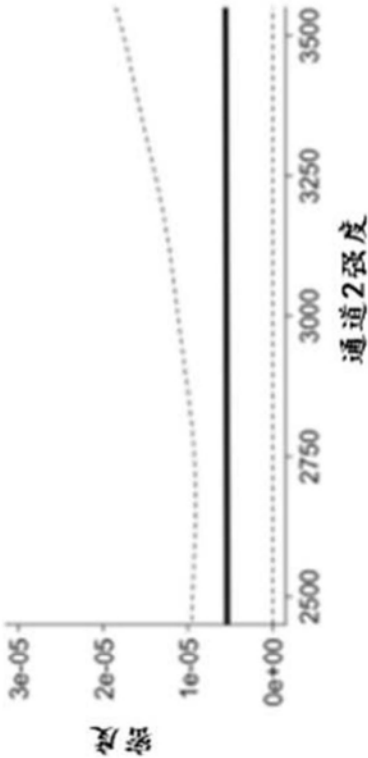


图9D

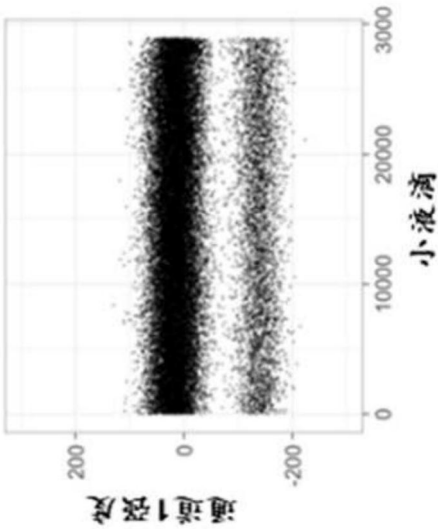


图10A

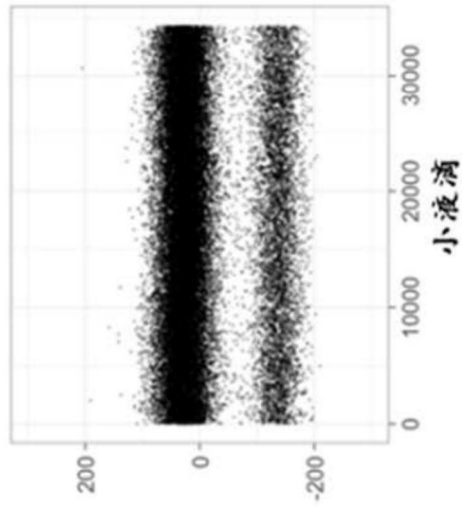


图10B

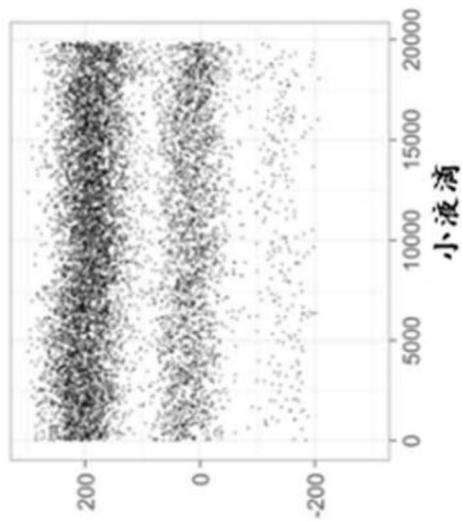


图10C

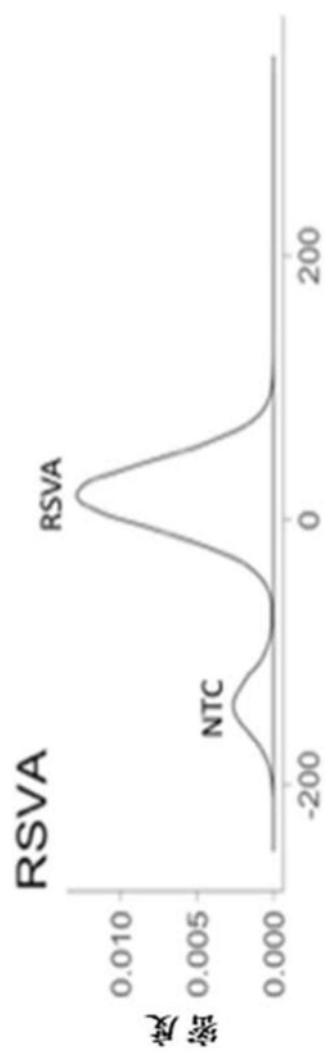


图11A

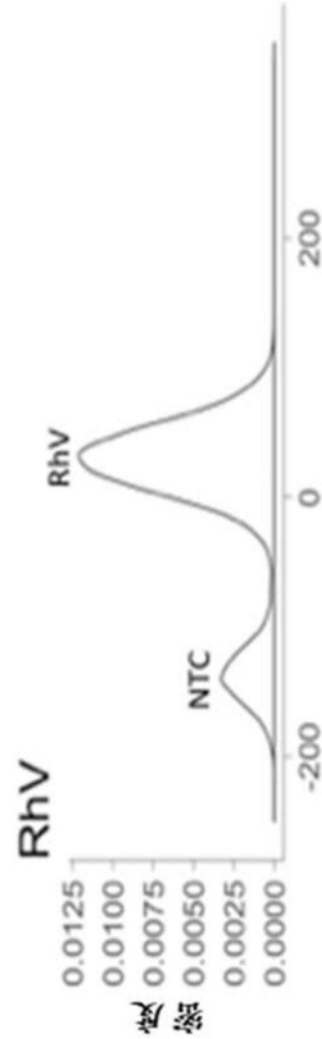


图11B

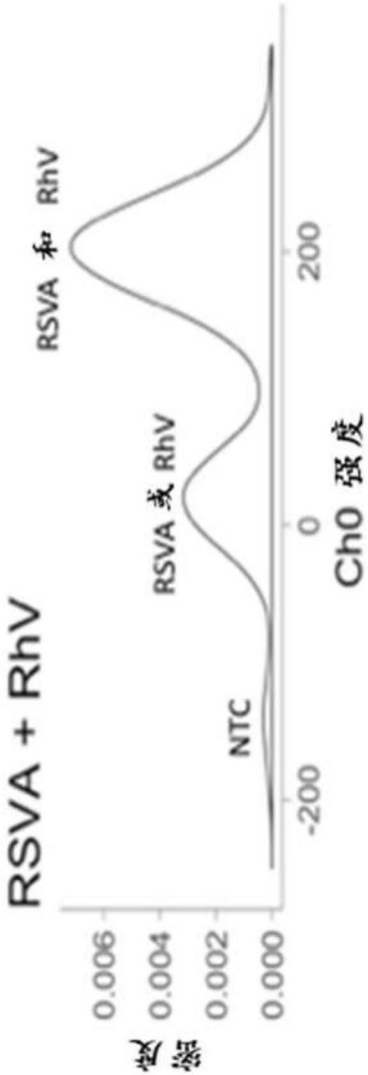


图11C

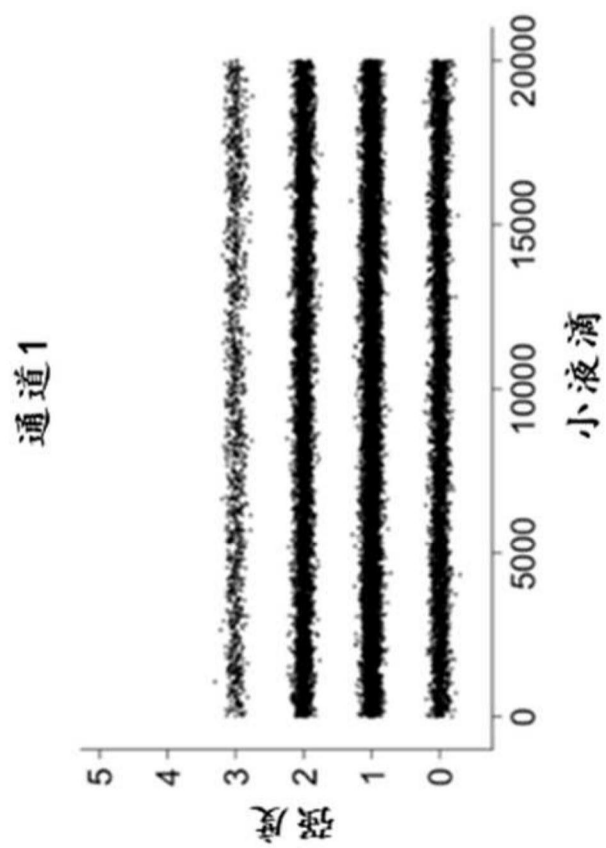


图12A

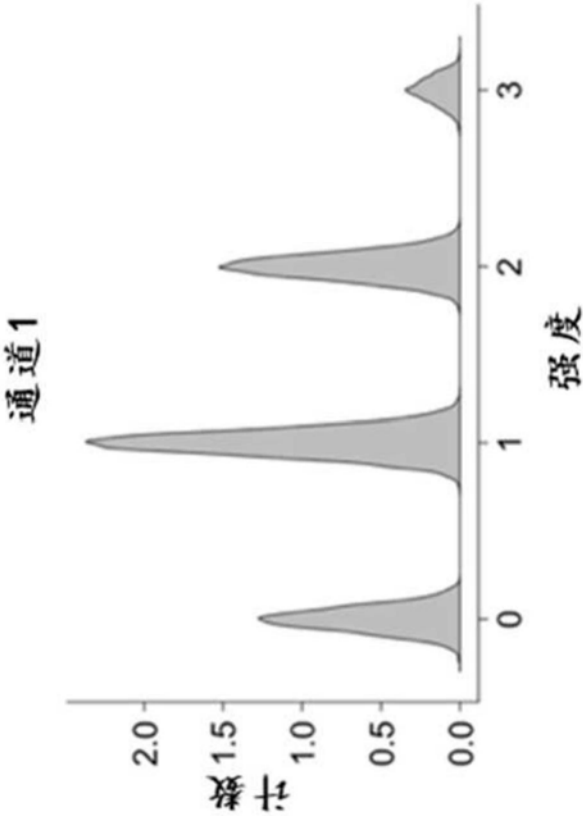


图12B

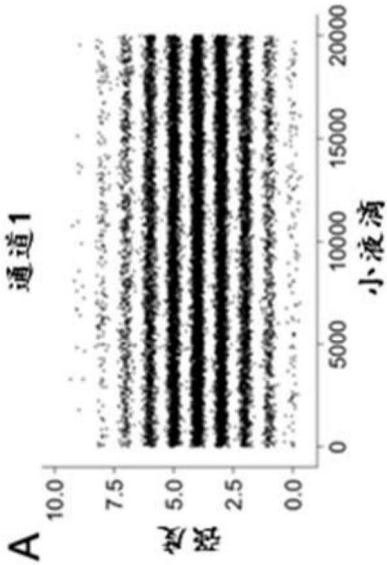


图13A

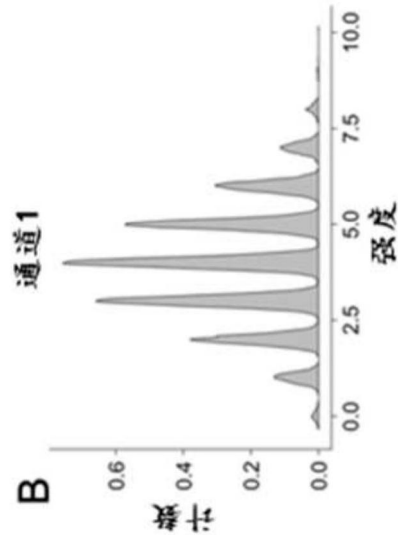


图13B

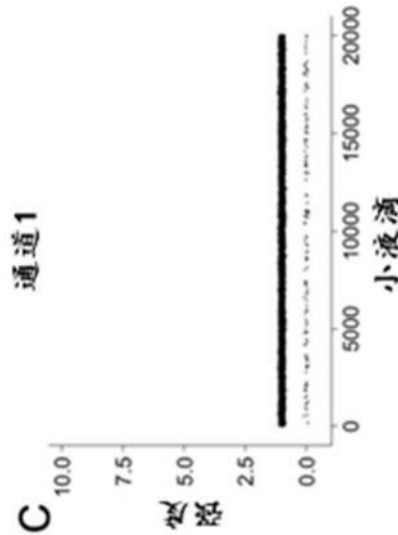


图13C

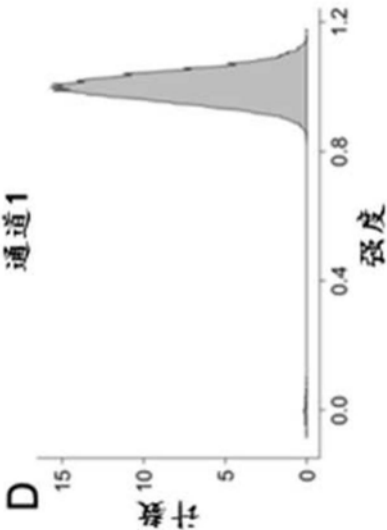


图13D

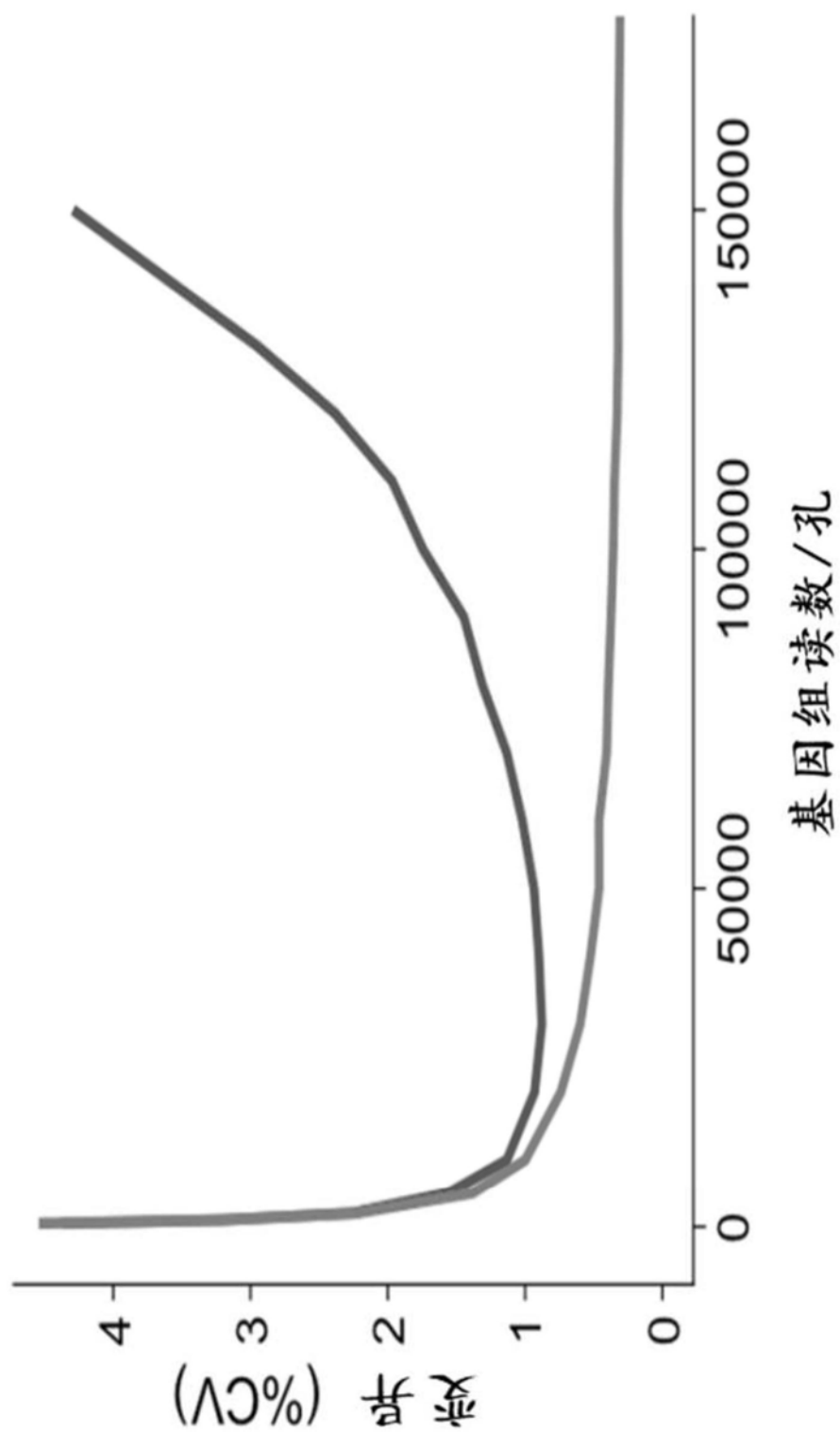


图14

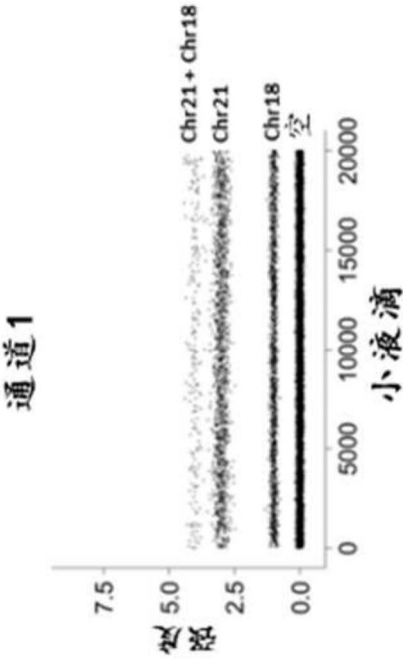


图15A

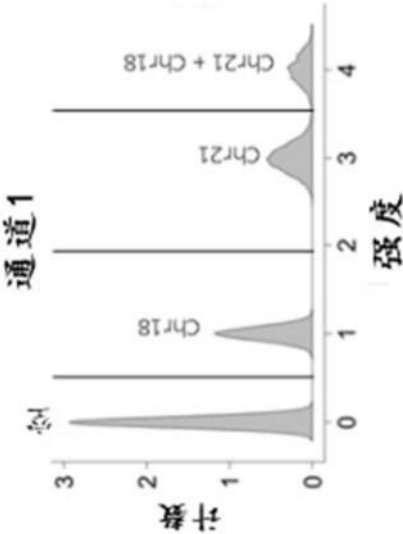


图15B

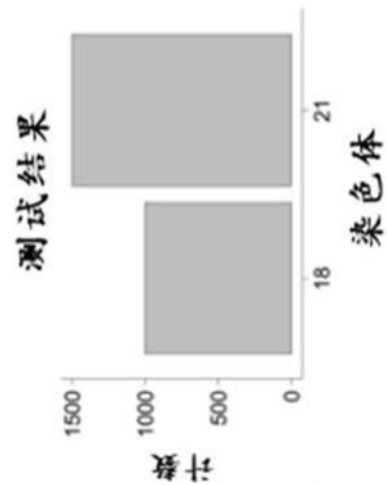


图15C

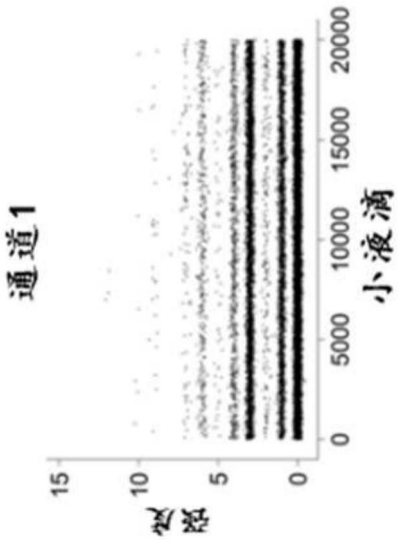


图16A

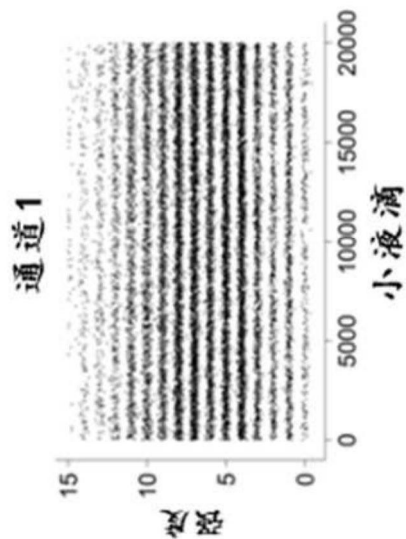


图17A

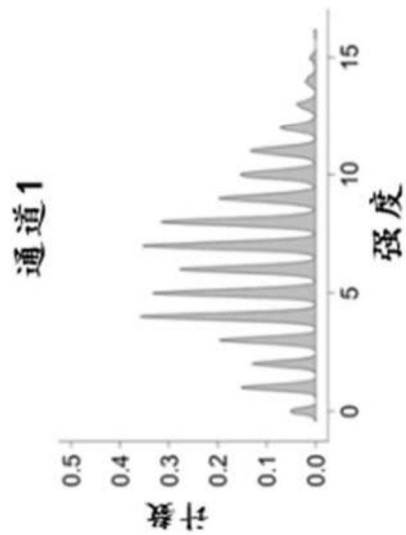


图17B

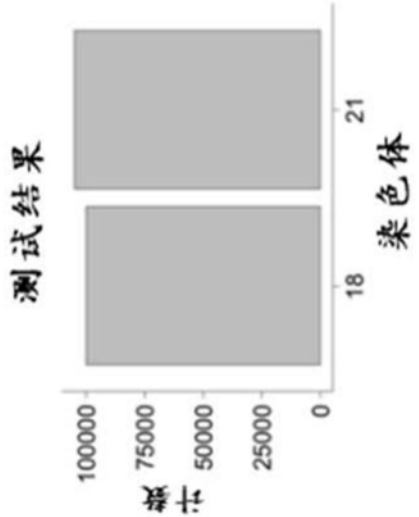


图17C

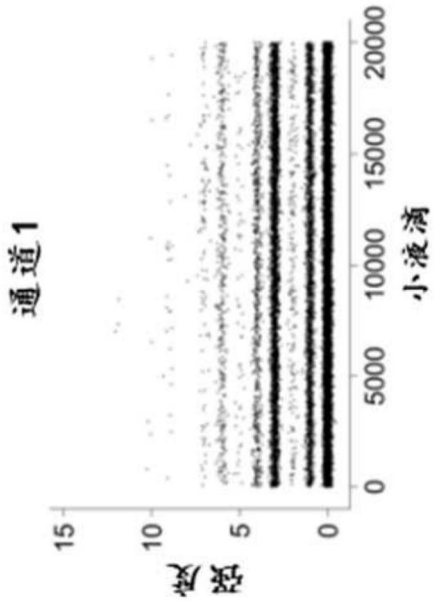


图18A

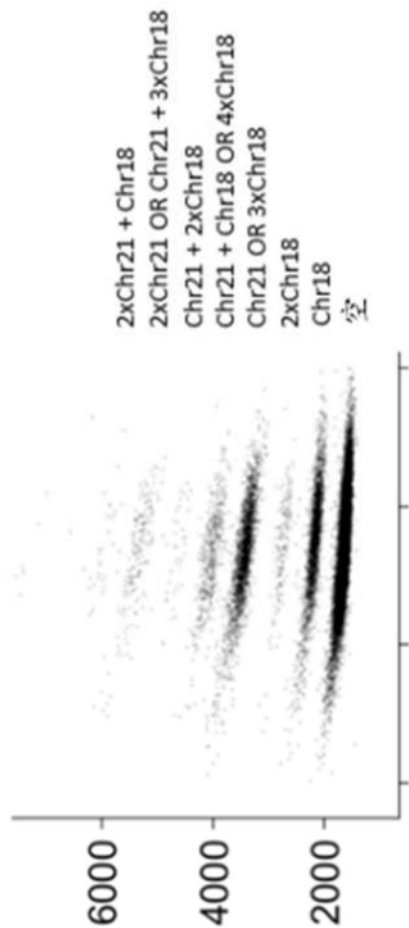


图18B

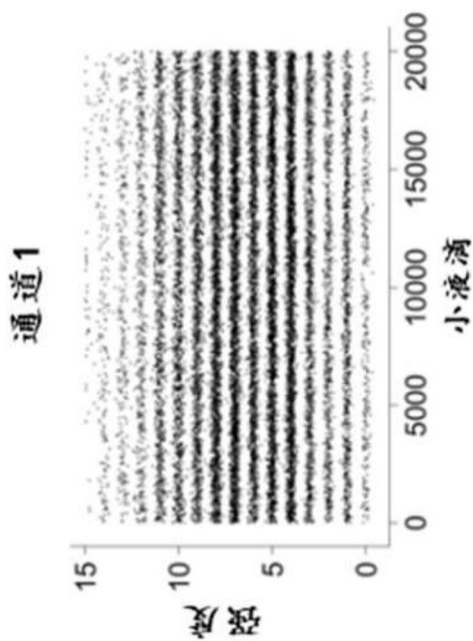


图18C

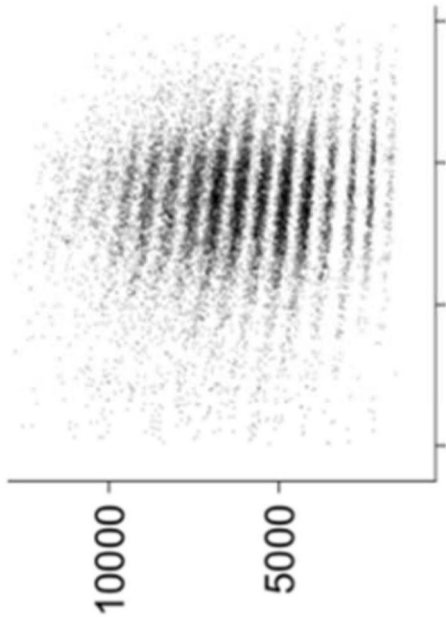


图18D

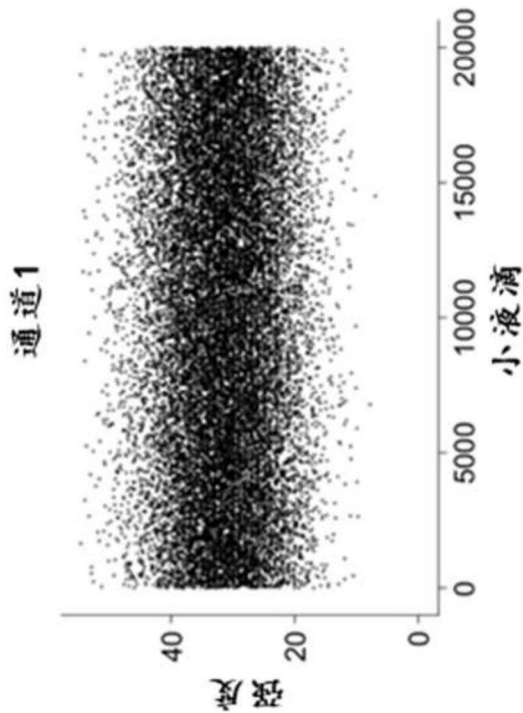


图19A

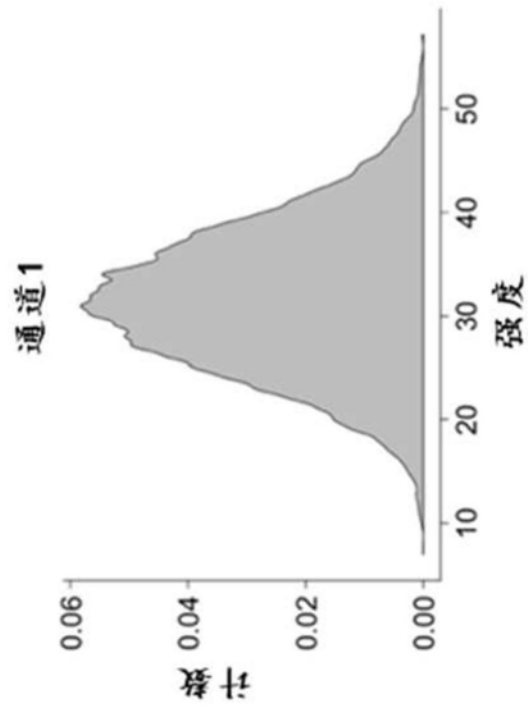


图19B