



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106906295 A

(43)申请公布日 2017.06.30

(21)申请号 201710210482.7

G06F 19/26(2011.01)

(22)申请日 2017.03.31

G06F 19/24(2011.01)

G06F 19/18(2011.01)

(71)申请人 天津诺禾致源生物信息科技有限公司

地址 301700 天津市武清区武清开发区创业总部基地B07

(72)发明人 曹志生 邹浩 李文欢 何杰
张双华 段楠 王珏 张向向
李鹏程 邵于玲

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 赵囡囡 吴贵明

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12M 1/34(2006.01)

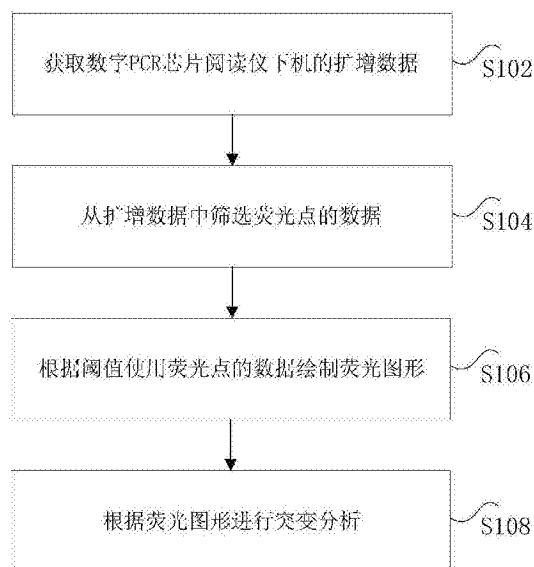
权利要求书3页 说明书13页
序列表3页 附图4页

(54)发明名称

数字PCR检测基因点突变方法及装置

(57)摘要

本发明公开了一种数字PCR检测基因点突变方法及装置。其中,包括:获取数字PCR芯片阅读仪下机的扩增数据;从扩增数据中筛选荧光点的数据;根据阈值使用荧光点的数据绘制荧光图形;根据荧光图形进行突变分析。本发明解决了无法准确判断检测样本中是否存在基因点突变的技术问题。



1. 一种数字PCR检测基因点突变的方法,其特征在于,所述方法包括:
获取数字PCR芯片阅读器下机的扩增数据;
从所述扩增数据中筛选荧光点的数据;
根据阈值使用所述荧光点的数据绘制荧光图形;
根据所述荧光图形进行突变分析。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,获取所述扩增数据包括:
通过界面显示第一控件,其中,所述第一控件中列举了预定文件夹下所有预定格式的文件;
通过所述第一控件从所述所有预定格式的文件中选择一个文件作为所述扩增数据。
3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在根据阈值使用所述荧光点的数据绘制荧光图形之前,所述方法还包括:
使用预先配置的数值作为所述阈值。
4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,在无法使用预先配置的数值作为所述阈值的情况下,所述方法还包括:
通过界面显示第二控件,其中,所述第二控件包括至少一个输入框;
通过所述至少一个输入框接收用户输入的数值作为所述阈值。
5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在根据所述荧光图形进行突变分析之后,所述方法还包括:
存储进行所述突变分析之后得到的结果;
根据所述结果生成报告。
6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,
所述荧光点的数据包括:VIC和FAM荧光点的数据;
所述荧光图形包括:VIC-FAM荧光图形。
7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述突变分析包括以下至少之一:计算阴性点个数、计算突变频率、判断阴阳性结果。
8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述扩增数据通过将目的基因的PCR反应体系置于微反应器中进行数字PCR得到。
9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述目的基因为EGFR基因,所述EGFR基因的PCR反应体系包括用于检测所述EGFR基因第20号外显子突变的引物及探针。
10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,所述引物包括:
第一上游引物SEQ ID NO:1:CCTCACCTCCACCGTGC,
第一下游引物SEQ ID NO:2:ACCAGTTGAGCAGGTACTGG;
第二上游引物SEQ ID NO:3:TGCCTCACCTCCACCG,
第二下游引物SEQ ID NO:4:ACCAGTTGAGCAGGTACTGG;
第三上游引物SEQ ID NO:5:GCATCTGCCTCACCTCCACC,
第三下游引物SEQ ID NO:6:ACCAGTTGAGCAGGTACTGGGAGC;
第四上游引物SEQ ID NO:7:GGGCATCTGCCTCACCTCCAC,
第四下游引物SEQ ID NO:8:ACACCAGTTGAGCAGGTACTGGGAG;
所述探针包括:

第一探针FAM SEQ ID NO:9:AGCTCATCATGCAGCTCAT,

第二探针VIC SEQ ID NO:10:AGCTCATCACGCAGCTCAT。

11. 根据权利要求1所述的方法,其特征不在于,在根据所述阈值使用所述荧光点的数据绘制荧光图形之前,所述方法还包括:

获取所述阈值,其中,所述阈值包括以下至少之一:VIC阈值、FAM阈值。

12. 根据权利要求11所述的方法,其特征不在于,获取所述VIC阈值包括:

对所述荧光点的数据进行排序得到第一数据集;

从所述第一数据集中获取包括预定数量荧光点的多个子集并获取每个子集的标准差;

将最大标准差集合作为阈值划分子集;

选取子集中间数值+1作为所述VIC阈值。

13. 根据权利要求12所述的方法,其特征不在于,获取所述FAM阈值包括:

获取同一荧光值下荧光点数目最大的第一数值作为第一峰值;

获取在所述荧光值大于所述第一峰值的所述荧光值的情况下,所述荧光点数目仅次于所述第一数值的第二数值作为第二峰值;

获取第一阈值包括:获取所述第一峰值与所述第二峰值之间相邻所述荧光点数目之差最大的两个荧光值集合,将其中较小的所述荧光值作为第一阈值;

获取第二阈值包括:获取所述第一峰值与所述第二峰值之间相邻所述荧光点数目之差第二大的两个荧光值集合,将其中较小的所述荧光值作为第二阈值;

获取第三阈值包括:设定所述第一峰值序号为a,最大荧光值序号为b,最小荧光值序号为c;若 $b-a > a-c$ 则选取 $a \sim c$ 为第一计算子集;若 $b-a < a-c$ 则选取 $a \sim b$ 为第二计算子集,根据所述第一计算子集和所述第二计算子集计算标准差;所述第三阈值为所述第一峰值+6倍的所述标准差;

基于所述第一阈值、所述第二阈值、以及所述第三阈值,判断所述FAM阈值。

14. 根据权利要求13所述的方法,其特征不在于,基于所述第一阈值、所述第二阈值、以及所述第三阈值,判断所述FAM阈值包括:

在所述第一阈值-所述第二阈值 $>$ (所述最大荧光值-所述最小荧光值) $\times 0.09$ 的情况下,确定所述第二阈值作为最佳阈值;否则确定所述第一阈值作为所述最佳阈值。

15. 根据权利要求14所述的方法,其特征不在于,在确定所述最佳阈值之后,所述方法还包括:

建立荧光点的数据的VIC-FAM坐标图;

根据所述VIC阈值和所述最佳阈值将所述VIC-FAM坐标图划分4个象限,

若第一象限点数量在3-10之间,并且所述最佳阈值-所述第三阈值 $>$ 所述第三阈值 $\times 0.15$,则取所述第三阈值+1作为所述FAM阈值;

若所述第一象限点数量小于2,则取所述第二阈值+1作为所述FAM阈值;

否则将所述最佳阈值+1作为所述FAM阈值。

16. 根据权利要求13或15所述的方法,其特征不在于,判断所述FAM阈值还包括:

以所述VIC阈值和所述FAM阈值划分4点团,若第一象限点数量为0,则将所述FAM最大荧光值+1作为所述FAM阈值。

17. 一种数字PCR检测基因点突变装置,其特征不在于,包括:

获取单元,用于获取数字PCR芯片阅读仪下机的扩增数据;

筛选单元,用于从所述扩增数据中筛选荧光点的数据;

绘制单元,用于根据阈值使用所述荧光点的数据绘制荧光图形;

突变分析单元,用于根据所述荧光图形进行突变分析。

18.根据权利要求17所述的装置,其特征在于,所述获取单元包括:

第一显示模块,用于通过界面显示第一控件,其中,所述第一控件中列举了预定文件夹下所有预定格式的文件;

选择模块,用于通过所述第一控件从所述所有预定格式的文件中选择一个文件作为所述扩增数据。

19.根据权利要求17所述的装置,其特征在于,所述绘制单元包括:

第二显示模块,用于通过界面显示第二控件,其中,所述第二控件包括至少一个输入框;

接收模块,用于通过所述至少一个输入框接收用户输入的数值作为所述阈值。

20.一种存储介质,其特征在于,所述存储介质包括存储的程序,其中,在所述程序运行时控制所述存储介质所在的设备执行权利要求1至16中任意一项所述的方法。

21.一种处理器,其特征在于,所述处理器用于运行程序,其中,所述程序运行时执行权利要求1至16中任意一项所述的方法。

数字PCR检测基因点突变方法及装置

技术领域

[0001] 本发明涉及基因检测领域,具体而言,涉及一种数字PCR检测基因点突变方法及装置。

背景技术

[0002] 数字PCR技术是一种核酸检测和定量/定性方法,采用高密度流控芯片技术,将检测样本均匀分配至20,000个单独的反应孔中,每个反应孔作为一个独立的反应器,包含或不包含一个或多个拷贝的目标分子(DNA模板),以此实现“单分子模板PCR扩增”,通过呈现阴性和阳性信号类型反应器的数目和比例进行统计学分析,计算出原始样本中的模板拷贝数。

[0003] Life-technologies推出的QuantStudio 3D数字PCR系统,也是采用数字PCR技术,并配套QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™软件使用,能够对QuantStudio 3D数字PCR系统下机的扩增数据进行绘图处理。

[0004] 但是,Life-technologies推出的QuantStudio 3D数字PCR系统和QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™软件无法直接获得阴阳性结果,不利于做定性分析,并且在无阴阳性参考品对照的情况下,无法给出正确的阈值判断,从而无法准确判断检测样本中是否存在基因点突变。

[0005] 针对上述无法准确判断检测样本中是否存在基因点突变的问题,目前尚未提出有效的解决方案。

发明内容

[0006] 本发明实施例提供了一种数字PCR检测基因点突变方法及装置,以至少解决无法准确判断检测样本中是否存在基因点突变的技术问题。

[0007] 根据本发明实施例的一个方面,提供了一种数字PCR检测基因点突变方法,包括:获取数字PCR芯片阅读器下机的扩增数据;从扩增数据中筛选荧光点的数据;根据阈值使用荧光点的数据绘制荧光图形;根据荧光图形进行突变分析。

[0008] 进一步地,获取扩增数据包括:通过界面显示第一控件,其中,第一控件中列举了预定文件夹下所有预定格式的文件;通过第一控件从所有预定格式的文件中选择一个文件作为扩增数据。

[0009] 进一步地,在根据阈值使用所述荧光点的数据绘制荧光图形之前,所述方法还包括:使用预先配置的数值作为所述阈值。

[0010] 进一步地,在无法使用预先配置的数值作为所述阈值的情况下,所述方法还包括:通过界面显示第二控件,其中,所述第二控件包括至少一个输入框;通过所述至少一个输入框接收用户输入的数值作为所述阈值。

[0011] 进一步地,在根据荧光图形进行突变分析之后,方法还包括:存储进行突变分析之后得到的结果;根据结果生成报告。

[0012] 进一步地,荧光点的数据包括:VIC和FAM荧光点的数据;荧光图形包括:VIC-FAM荧光图形。

[0013] 进一步地,突变分析包括以下至少之一:计算阴阳性点个数、计算突变频率、判断阴阳性结果。

[0014] 进一步地,扩增数据通过将目的基因的PCR反应体系置于微反应器中进行数字PCR得到。

[0015] 进一步地,目的基因为EGFR基因,EGFR基因的PCR反应体系包括用于检测EGFR基因第20号外显子突变的引物及探针。

[0016] 进一步地,引物包括:第一上游引物SEQ ID NO:1:CCTCACCTCCACCGTGC,第一下游引物SEQ ID NO:2:ACCAGTTGAGCAGGTACTGG;第二上游引物SEQ ID NO:3:TGCCTCACCTCCACCG,第二下游引物SEQ ID NO:4:ACCAGTTGAGCAGGTACTGG;第三上游引物SEQ ID NO:5:GCATCTGCCTCACCTCCACC,第三下游引物SEQ ID NO:6:ACCAGTTGAGCAGGTACTGGGAGC;第四上游引物SEQ ID NO:7:GGGCATCTGCCTCACCTCCAC,第四下游引物SEQ ID NO:8:ACACCAGTTGAGCAGGTACTGGGAG;探针包括:第一探针FAM SEQ ID NO:9:AGCTCATCATGCAGCTCAT,第二探针VIC SEQ ID NO:10:AGCTCATCACGCAGCTCAT。

[0017] 进一步地,在根据所述阈值使用所述荧光点的数据绘制荧光图形之前,所述方法还包括:获取所述阈值,其中,所述阈值包括以下至少之一:VIC阈值、FAM阈值。

[0018] 进一步地,获取所述VIC阈值包括:对所述荧光点的数据进行排序得到第一数据集;从所述第一数据集中获取包括预定数量荧光点的多个子集并获取每个子集的标准差;将最大标准差集合作为阈值划分子集;选取子集中间数值+1作为所述VIC阈值。

[0019] 进一步地,获取所述FAM阈值包括:获取同一荧光值下荧光点数目最大的第一数值作为第一峰值;获取在所述荧光值大于所述第一峰值的所述荧光值的情况下,所述荧光点数目仅次于所述第一数值的第二数值作为第二峰值;获取第一阈值包括:获取所述第一峰值与所述第二峰值之间相邻所述荧光点数目之差最大的两个荧光值集合,将其中较小的所述荧光值作为第一阈值;获取第二阈值包括:获取所述第一峰值与所述第二峰值之间相邻所述荧光点数目之差第二大的两个荧光值集合,将其中较小的所述荧光值作为第二阈值;获取第三阈值包括:设定所述第一峰值序号为a,最大荧光值序号为b,最小荧光值序号为c;若 $b-a > a-c$ 则选取 $a \sim c$ 为第一计算子集;若 $b-a < a-c$ 则选取 $a \sim b$ 为第二计算子集,根据所述第一计算子集和所述第二计算子集计算标准差;所述第三阈值为所述第一峰值+6倍的所述标准差;基于所述第一阈值、所述第二阈值、以及所述第三阈值,判断所述FAM阈值。

[0020] 进一步地,基于所述第一阈值、所述第二阈值、以及所述第三阈值,判断所述FAM阈值包括:在所述第一阈值-所述第二阈值 $>$ (所述最大荧光值-所述最小荧光值) $\times 0.09$ 的情况下,确定所述第二阈值作为最佳阈值;否则确定所述第一阈值作为所述最佳阈值。

[0021] 进一步地,在确定所述最佳阈值之后,所述方法还包括:建立荧光点的数据的VIC-FAM坐标图;根据所述VIC阈值和所述最佳阈值将所述VIC-FAM坐标图划分4个象限,若第一象限点数量在3-10之间,并且所述最佳阈值-所述第三阈值 $>$ 所述第三阈值 $\times 0.15$,则取所述第三阈值+1作为所述FAM阈值;若所述第一象限点数量小于2,则取所述第二阈值+1作为所述FAM阈值;否则将所述最佳阈值+1作为所述FAM阈值。

[0022] 进一步地,判断所述FAM阈值还包括:以VIC阈值和所述FAM阈值划分4点团,若第一

象限点数量为0,则将所述FAM最大荧光值+1作为所述FAM阈值。

[0023] 根据本发明实施例的另一方面,还提供了一种数字PCR检测基因点突变装置,包括:获取单元,用于获取数字PCR芯片阅读器下机的扩增数据;筛选单元,用于从扩增数据中筛选荧光点的数据;绘制单元,用于根据阈值使用荧光点的数据绘制荧光图形;突变分析单元,用于根据荧光图形进行突变分析。

[0024] 进一步地,获取单元包括:第一显示模块,用于通过界面显示第一控件,其中,第一控件中列举了预定文件夹下所有预定格式的文件;选择模块,用于通过第一控件从所有预定格式的文件中选择一个文件作为扩增数据。

[0025] 进一步地,绘制单元包括:第二显示模块,用于通过界面显示第二控件,其中,第二控件包括至少一个输入框;接收模块,用于通过至少一个输入框接收用户输入的数值作为阈值。

[0026] 进一步地,在未在至少一个输入框中检测到用户输入的数值的情况下,装置还包括:使用模块,用于使用预先配置的数值作为阈值。

[0027] 进一步地,在突变分析单元之后,装置还包括:存储模块,用于存储进行突变分析之后得到的结果;生成模块,用于根据结果生成报告。

[0028] 进一步地,荧光点的数据包括:VIC和FAM荧光点的数据;荧光图形包括:VIC-FAM荧光图形。

[0029] 进一步地,突变分析包括以下至少之一:计算阴阳性点个数、计算突变频率、判断阴阳性结果。

[0030] 根据本发明实施例的另一方面,还提供了一种存储介质,该存储介质包括存储的程序,其中,在程序运行时控制该存储介质所在的设备执行数字PCR检测基因点突变方法。

[0031] 根据本发明实施例的另一方面,还提供了一种处理器,该处理器用于运行程序,其中,程序运行时执行数字PCR检测基因点突变方法。

[0032] 在本发明实施例中,通过获取数字PCR芯片阅读器下机的扩增数据,再从中筛选出带有荧光点的数据的核苷酸,然后按照特定阈值算法,绘制出对应的荧光图形,并根据荧光图形进行突变分析。通过数字PCR芯片阅读器下机的扩增数据,合理绘制出对应的图形结果,并在该图形的基础上进行分析,得到突变率及阴阳性判断信息,储存信息,并出具pdf格式报告,更加方便准确地对样本进行判断,进而解决了无法准确判断检测样本中是否存在基因点突变的技术问题。

附图说明

[0033] 此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解,构成本申请的一部分,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0034] 图1是根据本发明实施例的一种数字PCR检测基因点突变方法的流程图;

[0035] 图2是根据本发明实施例的一种数字PCR检测基因点突变装置的示意图;

[0036] 图3是根据本发明实施例的一种可选的数字PCR检测基因点突变装置的示意图;

[0037] 图4是根据本发明实施例的一种欢迎界面的示意图;

[0038] 图5是根据本发明实施例的一种样本界面的示意图;

[0039] 图6是根据本发明实施例的一种绘图界面的示意图;

[0040] 图7是根据本发明实施例的一种结果界面的示意图；

[0041] 图8是根据本发明实施例的一种记录界面的示意图。

具体实施方式

[0042] 为了使本技术领域的人员更好地理解本发明方案，下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分的实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都应当属于本发明保护的范围。

[0043] 需要说明的是，本发明的说明书和权利要求书及上述附图中的术语“第一”、“第二”等是用于区别类似的对象，而不必用于描述特定的顺序或先后次序。应该理解这样使用的数据在适当情况下可以互换，以便这里描述的本发明的实施例能够以除了在这里图示或描述的那些以外的顺序实施。此外，术语“包括”和“具有”以及他们的任何变形，意图在于覆盖不排他的包含，例如，包含了一系列步骤或单元的过程、方法、系统、产品或设备不必限于清楚地列出的那些步骤或单元，而是可包括没有清楚地列出的或对于这些过程、方法、产品或设备固有的其它步骤或单元。

[0044] 根据本发明实施例，提供了一种数字PCR检测基因点突变方法的实施例，需要说明的是，在附图的流程图示出的步骤可以在诸如一组计算机可执行指令的计算机系统中执行，并且，虽然在流程图中示出了逻辑顺序，但是在某些情况下，可以以不同于此处的顺序执行所示出或描述的步骤。

[0045] 图1是根据本发明实施例的一种数字PCR检测基因点突变方法的流程图，如图1所示，该方法包括如下步骤：

[0046] 步骤S102，获取数字PCR芯片阅读器下机的扩增数据；

[0047] 步骤S104，从扩增数据中筛选荧光点的数据；

[0048] 步骤S106，根据阈值使用荧光点的数据绘制荧光图形；

[0049] 步骤S108，根据荧光图形进行突变分析。

[0050] 在上述实施例中，通过获取数字PCR芯片阅读器下机的扩增数据，再从中筛选出带有荧光点的数据的核苷酸，然后按照特定阈值算法，绘制出对应的荧光图形，并根据荧光图形进行突变分析。通过PCR芯片阅读器下机的扩增数据，合理绘制出对应的图形结果，并在该图形的基础上进行分析，得到突变率及阴阳性判断信息，储存信息，并出具pdf格式报告，更加方便准确地对样本进行判断，进而解决了无法准确判断检测样本中是否存在基因点突变的技术问题。

[0051] 需要说明的是，PCR指聚合酶链式反应，是一种用于放大扩增特定的DNA片段的分子生物学技术，它可看作是生物体外的特殊DNA复制，PCR的最大特点，是能将微量的DNA大幅增加，因此，根据生物体的细胞，只要能分离出一丁点的DNA，就能用PCR加以放大，进行比对。

[0052] 具体地，PCR（聚合酶链式反应）是利用DNA在体外高温（95摄氏度）时变性会变成单链，在低温（约60摄氏度左右）时引物与单链按碱基互补配对的原则结合，再调温度至DNA聚合酶的最适反应温度（72摄氏度左右），DNA聚合酶沿着磷酸到五碳糖的方向合成互补链。

[0053] 需要说明的是,数字PCR是一种全新的核酸检测和定量方法,将样品处理分割成多个单独的实时荧光定量PCR反应;这些反映之中的一部分含有靶标分子(阳性),而另外的则不含靶标分子(阴性)。在经过PCR扩增和信号分析后,根据阴性反映的比例对样品中的靶标分子数据进行绝对计数,而不必参照标准品或内源性对照。

[0054] 数字PCR主要采用微流控或微滴化方法,将大量稀释后的核酸PCR反应体系分散至芯片的微反应器或微滴中,每个反应器的核酸模板数少于或者等于1个。这样经过PCR循环之后,有一个核酸分子模板的反应器就会给出荧光信号,没有模板的反应器就没有荧光信号。根据相对比例和反应器的体积,就可以推算出原始溶液的核酸浓度。本发明以数字PCR为平台,在反应体系中加入PCR引物和TaqMan探针,利用两条不同的TaqMan探针(标记不同类型荧光)对野生和突变DNA模板进行检测;根据荧光类型判断样品中DNA模板的类型。优选采用微反应器的方式进行数字PCR获得扩增数据。

[0055] 具体地,数字PCR反应体系中的PCR引物可以根据具体目的基因上的目的点突变进行合理设计。在本申请一种优选的实施例中,目的基因片段是EGFR上的第20个外显子的T790M点突变,其PCR扩增的引物包括:第一上游引物SEQ ID NO:1:CCTCACCTCCACCGTGC,第一下游引物SEQ ID NO:2:ACCAGTTGAGCAGGTACTGG;第二上游引物SEQ ID NO:3:TGCCTCACCTCCACCG,第二下游引物SEQ ID NO:4:ACCAGTTGAGCAGGTACTGG;第三上游引物SEQ ID NO:5:GCATCTGCCTCACCTCCACC,第三下游引物SEQ ID NO:6:ACCAGTTGAGCAGGTACTGGGAGC;第四上游引物SEQ ID NO:7:GGGCATCTGCCTCACCTCCAC,第四下游引物SEQ ID NO:8:ACACCAGTTGAGCAGGTACTGGGAG。两种探针所带的荧光基团的种类不同,第一探针带有FAM荧光基团,第二探针带有VIC荧光基团。具体的第一探针和第二探针的序列为SEQ ID NO:9:AGCTCATCATGCAGCTCAT,第二探针VIC的序列为SEQ ID NO:10:AGCTCATCACGCAGCTCAT。更优选地,第一探针FAM的浓度为280~320nmol/L,第二探针VIC的浓度为750~850nmol/L。

[0056] 在一个可选的实施例中,获取扩增数据包括:通过界面显示第一控件,其中,第一控件中列举了预定文件夹下所有预定格式的文件;通过第一控件从所有预定格式的文件中选择一个文件作为扩增数据。

[0057] 具体地,获取扩增数据通过界面的第一控件完成,其中,界面显示第一控件中包含一个文件夹列表,该列表表示在预定文件夹下保存的全部预定格式的文件,通过第一控件,从全部预定格式的文件中选择一个文件作为扩增数据,用于后续操作。

[0058] 作为一个可选的实施例,在根据阈值使用荧光点的数据绘制荧光图形之前,方法还包括:使用预先配置的数值作为阈值。

[0059] 具体地,在根据阈值使用荧光点的数据绘制荧光图形之间,可以使用预先配置的数值作为阈值。使用预先配置的数值作为阈值,可以方便、快捷地使用该阈值绘制荧光图形,进行突变分析。

[0060] 一个可选的实施例,在无法使用预先配置的数值作为阈值的情况下,方法还包括:通过界面显示第二控件,其中,第二控件包括至少一个输入框;通过至少一个输入框接收用户输入的数值作为阈值。

[0061] 具体地,在无法使用预先设置的数值作为阈值的情况下,可以在界面显示第二空间,在第二控件中的至少一个输入框中接收用户输入的数值作为阈值,从而可以根据用户

输入的数值作为阈值绘制荧光图形,满足特殊情况的荧光图形的绘制,进行突变分析。

[0062] 在一个可选的实施例中,在根据荧光图形进行突变分析之后,方法还包括:存储进行突变分析之后得到的结果;根据结果生成报告。

[0063] 具体地,在根据荧光图形进行突变分析之后,将突变分析的结果进行存储,并根据存储的突变分析的结果生成报告。

[0064] 可选地,将突变分析的结果进行存储,可以将突变分析的结果保存到结果表格中。

[0065] 可选地,根据结果生成报告,可以根据结果生成pdf格式的報告。

[0066] 一个可选的实施例,荧光点的数据包括:VIC和FAM荧光点的数据;荧光图形包括:VIC-FAM荧光图形。

[0067] 需要说明的是,VIC和FAM是常用的荧光染料。FAM,羧基荧光素,是荧光素衍生物的一种,广泛存在于荧光标记试剂盒,并且,FAM与氨基反应较快,产物较稳定。

[0068] 作为一个可选的实施例,突变分析包括以下至少之一:计算阴阳性点个数、计算突变频率、判断阴阳性结果。

[0069] 作为一个可选的实施例,在根据阈值使用荧光点的数据绘制荧光图形之前,方法还包括:获取阈值,其中,阈值包括以下至少之一:VIC阈值、FAM阈值。根据VIC阈值、FAM阈值可以获取的阈值更加准确。

[0070] 在一个可选的实施例中,获取VIC阈值包括:对荧光点的数据进行排序得到第一数据集;从第一数据集中获取包括预定数量荧光点的多个子集并获取每个子集的标准差;将最大标准差集合作为阈值划分子集;选取子集中间数值+1作为VIC阈值。采用本发明上述实施例,可以使获取的VIC阈值更加准确。

[0071] 在另一个可选的实施例中,获取FAM阈值包括:获取同一荧光值下荧光点数目最大的第一数值作为第一峰值;获取在荧光值大于第一峰值的荧光值的情况下,荧光点数目仅次于第一数值的第二数值作为第二峰值;获取第一阈值包括:获取第一峰值与第二峰值之间相邻荧光点数目之差最大的两个荧光值集合,将其中较小的荧光值作为第一阈值;获取第二阈值包括:获取第一峰值与第二峰值之间相邻荧光点数目之差第二大的两个荧光值集合,将其中较小的荧光值作为第二阈值;获取第三阈值包括:设定第一峰值序号为a,最大荧光值序号为b,最小荧光值序号为c;若 $b-a > a-c$ 则选取 $a \sim c$ 为第一计算子集;若 $b-a < a-c$ 则选取 $a \sim b$ 为第二计算子集,根据第一计算子集和第二计算子集计算标准差;第三阈值为第一峰值+6倍标准差;基于第一阈值、第二阈值、以及第三阈值,判断FAM阈值。采用本发明上述实施例,可以使获取的FAM阈值更加准确。

[0072] 作为一个可选的实施例,基于第一阈值、第二阈值、以及第三阈值,判断FAM阈值包括:在第一阈值-第二阈值 $>$ (最大荧光值-最小荧光值) $\times 0.09$ 的情况下,确定第二阈值作为最佳阈值;否则确定第一阈值作为最佳阈值。采用本发明上述实施例,通过获取FAM的最佳阈值可以便于后续准确确定FAM阈值。

[0073] 作为一个可选的实施例,在确定最佳阈值之后,方法还包括:建立荧光点的数据的VIC-FAM坐标图;根据VIC阈值和最佳阈值将VIC-FAM坐标图划分4个象限,若第一象限点数量在3-10之间,并且最佳阈值-第三阈值 $>$ 第三阈值 $\times 0.15$,则取第三阈值+1作为FAM阈值;若第一象限点数量小于2,则取第二阈值+1作为FAM阈值;否则将最佳阈值+1作为FAM阈值。采用本发明上述实施例,可以使获取的FAM阈值更加准确。

[0074] 可选地,可以根据荧光点的数据的VIC值作为横坐标,根据荧光点的数据的FAM值作为纵坐标,建立荧光点在VIC-FAM坐标系的图形,以VIC阈值和FAM的最佳阈值建立两条直线,将荧光点在VIC-FAM坐标系的图形划分为四个象限,其中,低于VIC阈值,高于FAM的最佳阈值的荧光点所在象限为第一象限;高于VIC阈值,并且高于FAM的最佳阈值的荧光点所在象限为第二象限;高于VIC阈值,并且低于FAM的最佳阈值的荧光点所在象限为第三象限;低于VIC阈值,并且低于FAM的最佳阈值的荧光点所在象限为第四象限。

[0075] 在一个可选的实施例中,判断FAM阈值还包括:以VIC阈值和FAM阈值划分4点团,若第一象限点数量为0,则将FAM最大荧光值+1作为FAM阈值。采用本发明上述实施例,可以使获取的FAM阈值更加准确。

[0076] 可选地,根据荧光点的数据的VIC值与VIC阈值的关系;荧光点的数据的VIC值与FAM阈值的关系,将荧光标记点划分为4个点团,其中,低于VIC阈值,高于FAM的最佳阈值的荧光点位于第一点团;高于VIC阈值,并且高于FAM的最佳阈值的荧光点位于第二点团;高于VIC阈值,且低于FAM的最佳阈值的荧光点位于第三点团;低于VIC阈值,并且低于FAM的最佳阈值的荧光点位于第四点团。

[0077] 根据本发明实施例,还提供了一种数字PCR检测基因点突变装置实施例,需要说明的是,该数字PCR检测基因点突变装置可以用于执行本发明实施例中的数字PCR检测基因点突变方法,本发明实施例中的数字PCR检测基因点突变方法可以在该数字PCR检测基因点突变装置中执行。

[0078] 图2是根据本发明实施例的一种数字PCR检测基因点突变装置的示意图,如图2所示,该装置可以包括:获取单元21,用于获取数字PCR芯片阅读器下机的扩增数据;筛选单元23,用于从扩增数据中筛选荧光点的数据;绘制单元25,用于根据阈值使用荧光点的数据绘制荧光图形;突变分析单元27,用于根据荧光图形进行突变分析。

[0079] 需要说明的是,该实施例中的获取单元21可以用于执行本申请实施例中的步骤S102,该实施例中的筛选单元23可以用于执行本申请实施例中的步骤S104,该实施例中的绘制单元25可以用于执行本申请实施例中的步骤S106,该实施例中的突变分析单元27可以用于执行本申请实施例中的步骤S108。上述模块与对应的步骤所实现的示例和应用场景相同,但不限于上述实施例所公开的内容。

[0080] 在上述实施例中,通过获取数字PCR芯片阅读器下机的扩增数据,再从中筛选出带有荧光点的数据的核苷酸,然后按照特定阈值算法,绘制出对应的荧光图形,并根据荧光图形进行突变分析。通过PCR芯片阅读器下机的扩增数据,合理绘制出对应的图形结果,并在该图形的基础上进行分析,得到突变率及阴阳性判断信息,储存信息,并出具pdf格式报告,更加方便准确地对样本进行判断,进而解决了无法准确判断检测样本中是否存在基因点突变的技术问题。

[0081] 在一个可选的实施例中,获取单元包括:第一显示模块,用于通过界面显示第一控件,其中,第一控件中列举了预定文件夹下所有预定格式的文件;选择模块,用于通过第一控件从所有预定格式的文件中选择一个文件作为扩增数据。

[0082] 作为一个可选的实施例,绘制单元包括:第二显示模块,用于通过界面显示第二控件,其中,第二控件包括至少一个输入框;接收模块,用于通过至少一个输入框接收用户输入的数值作为阈值。

[0083] 一个可选的实施例,在未在至少一个输入框中检测到用户输入的数值的情况下,装置还包括:使用模块,用于使用预先配置的数值作为阈值。

[0084] 在一个可选的实施例中,在突变分析单元之后,装置还包括:存储模块,用于存储进行突变分析之后得到的结果;生成模块,用于根据结果生成报告。

[0085] 作为一个可选的实施例,荧光点的数据包括:VIC和FAM荧光点的数据;荧光图形包括:VIC-FAM荧光图形。

[0086] 在一个可选的实施例中,突变分析包括以下至少之一:计算阴阳性点个数、计算突变频率、判断阴阳性结果。

[0087] 根据本发明实施例的另一方面,还提供了一种存储介质,存储介质包括存储的程序,其中,在程序运行时控制存储介质所在的设备执行数字PCR检测基因点突变方法。

[0088] 根据本发明实施例的另一方面,还提供了一种处理器,其特征在于,处理器用于运行程序,其中,程序运行时执行数字PCR检测基因点突变方法。

[0089] 图3是根据本发明实施例的一种可选的数字PCR检测基因点突变装置的示意图,如图3所示,该装置可以包括:欢迎界面31,包括主界面和设置功能;样本界面33,包括样本管理功能;绘图界面35,包括绘图功能;结果界面37,结果数据统计功能;以及记录界面39,包括记录功能。该装置通过内置算法,样本界面中包括第一控件,通过第一控件从所有预定格式的文件中选择一个文件作为扩增数据;绘图界面中包括第二控件,通过第二控件中的输入框接收用户输入的数值,并将该数值作为阈值,进行绘图;结果界面包括生成模块,用于根据绘图界面绘制的荧光图形分析,得到突变分析的结果,并突变分析的结果生成报告,其中,该报告包括pdf格式的报告;记录界面包括存储模块,用于存储进行突变分析之后的结果,记录相关信息。

[0090] 图4是根据本发明实施例的一种欢迎界面的示意图,如图4所示,欢迎界面是初始化界面,包含公司图标,装置名称,装置相关说明以及设置四个部分。其中,通过设置按钮可以进入设置界面,通过设置界面对“工作文件夹”、“压缩软件”、“report文件夹”以及“eds共享文件夹”进行相关设置。

[0091] 图5是根据本发明实施例的一种样本界面的示意图,如图5所示,样本界面中包含共享文件夹列表,选择样本列表及样本操作相关功能。共享文件夹列表会自动读取设置的“eds共享文件夹”中eds文件,并按照日期依次列举出来;选择样本列表会呈现出进行样本操作后的样本列表,顺序为操作顺序;样本操作包含“导入样本”、“删除样本”及“清空样本”三种,分别对应其字面功能。其中“导入样本”和“删除样本”可以进行多样本操作。

[0092] 图6是根据本发明实施例的一种绘图界面的示意图,如图6所示,绘制界面为样本绘图界面,包含样本列表,图形设置相关和图形结果功能。样本列表与样本界面中的样本列表相同,通过选择其中的样本可以进行绘图处理;绘图设置功能,可以使用“默认”或者“自定义”功能。“默认”对应着内置算法,自动绘制出合适的VIC-FAM荧光图并标出合理的阈值。“自定义”对应着个性化算法,将接收的用户输入的数值作为阈值,还可以手动输入X,Y1,Y2阈值;当设置好阈值之后,使用刷新或者批量刷新能够对样本进行绘图操作,然后对选中的样本绘制出对应的VIC-FAM荧光图,并给出相应的数据信息。

[0093] 图7是根据本发明实施例的一种结果界面的示意图,如图7所示,结果界面为样本结果界面,包含检测结果表格,分析结果表格,全选和打印报告功能。检测结果表格中部分

数据和分析结果表格中全部数据,为装置内置算法计算得到;当完整填写结果表格相关信息后,可以勾选或者全选结果表格中样本,然后进行打印报告相关操作;打印报告能够根据结果表格中相关信息,自动完成对应的pdf报告生成。

[0094] 图8是根据本发明实施例的一种记录界面的示意图,如图8所示,记录界面为样本记录界面,包含结果记录表格。结果记录表格将记录装置安装后,所有打印报告操作的样本相关信息,以供查询。

[0095] 根据本发明上述实施例,能够根据数字PCR芯片阅读器下机的“.eds”扩增数据,通过筛选其中的VIC,FAM荧光点的数据,按照特定的阈值算法,绘制出VIC-FAM荧光图形,并根据图形信息,进行阴阳性点个数,突变频率的计算及阴阳性结果的判断,储存信息,并出具pdf格式报告。

[0096] 在上述实施例中,采用数字PCR法,与人EGFR基因T790M突变分析试剂盒(数字PCR法),在临床上用于对来源于人体的血浆游离DNA样本中的被分析物进行定性检测,包括非小细胞肺癌的EGFR基因T790M突变型的检测项目。

[0097] 根据本发明上述实施例的装置,数字PCR芯片阅读器是专门用于对数字PCR芯片进行读取分析的仪器,可以对经过PCR扩增的芯片进行成像与分析,并给出目标核酸序列的相对丰度,从而判断检测样本中是否含有目标核酸序列,将数字PCR芯片阅读器下机数据图形化,让没有信息分析经验的医学工作者可以更方便地出具临床检测报告。装置主要用于数字PCR芯片阅读器的数据分析,可以半自动化分析数据并出具报告。该装置对“数字PCR芯片阅读器”下机“.eds”数据,进行绘图、分析,得到突变率及阴阳性判断信息,储存信息,并出具pdf格式报告。

[0098] 本发明经过试验、模拟其可行性,其中阴性样本106个,符合率为100%;阳性样本98个,符合率为97.86%。

[0099] 上述本发明实施例序号仅仅为了描述,不代表实施例的优劣。

[0100] 在本发明的上述实施例中,对各个实施例的描述都各有侧重,某个实施例中沒有详述的部分,可以参见其他实施例的相关描述。

[0101] 在本申请所提供的几个实施例中,应该理解到,所揭露的技术内容,可通过其它的方式实现。其中,以上所描述的装置实施例仅仅是示意性的,例如所述单元的划分,可以为一种逻辑功能划分,实际实现时可以有另外的划分方式,例如多个单元或组件可以结合或者可以集成到另一个系统,或一些特征可以忽略,或不执行。另一点,所显示或讨论的相互之间的耦合或直接耦合或通信连接可以是通过一些接口,单元或模块的间接耦合或通信连接,可以是电性或其它的形式。

[0102] 所述作为分离部件说明的单元可以是或者也可以不是物理上分开的,作为单元显示的部件可以是或者也可以不是物理单元,即可以位于一个地方,或者也可以分布到多个单元上。可以根据实际的需要选择其中的部分或者全部单元来实现本实施例方案的目的。

[0103] 另外,在本发明各个实施例中的各功能单元可以集成在一个处理单元中,也可以是各个单元单独物理存在,也可以两个或两个以上单元集成在一个单元中。上述集成的单元既可以采用硬件的形式实现,也可以采用软件功能单元的形式实现。

[0104] 所述集成的单元如果以软件功能单元的形式实现并作为独立的产品销售或使用时,可以存储在一个计算机可读取存储介质中。基于这样的理解,本发明的技术方案本质上

或者说对现有技术做出贡献的部分或者该技术方案的全部或部分可以以软件产品的形式体现出来,该计算机软件产品存储在一个存储介质中,包括若干指令用以使得一台计算机设备(可为个人计算机、服务器或者网络设备等)执行本发明各个实施例所述方法的全部或部分步骤。而前述的存储介质包括:U盘、只读存储器(ROM,Read-Only Memory)、随机存取存储器(RAM,Random Access Memory)、移动硬盘、磁碟或者光盘等各种可以存储程序代码的介质。

[0105] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

序列表

<110> 天津诺禾致源生物信息科技有限公司

<120> 数字 PCR 检测基因点突变方法及装置

<130> PN64200NHZY

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EGFR-T790M 第一上游引物

<400> 1

[0106] cctcacctccaccgtgc

17

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EGFR-T790M 第一下游引物

<400> 2

accagttgagcaggtactgg

20

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

	<223> EGFR-T790M 第二上游引物	
	<400> 3	
	tgccctcacctccaccg	16
	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> EGFR-T790 第二下游 M 引物	
	<400> 4	
	accagttgagcaggtactgg	20
	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
[0107]	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> EGFR-T790M 第三上游引物	
	<400> 5	
	gcatctgcctcacctccacc	20
	<210> 6	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> EGFR-T790M 第三下游引物	
	<400> 6	
	accagttgagcaggtactgggagc	24
	<210> 7	
	<211> 21	

	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> EGFR-T790M 第四上游引物	
	<400> 7	
	gggcatctgcctcacctccac	21
	<210> 8	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> EGFR-T790M 第四下游引物	
	<400> 8	
	acaccagttgagcaggtactgggag	25
[0108]	<210> 9	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> EGFR-T790M 第一探针	
	<400> 9	
	agctcatcatgcagctcat	19
	<210> 10	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> EGFR_T790M 第二探针	
	<400> 10	
[0109]	agctcatcacgcagctcat	19

序列表

<110> 天津诺禾致源生物信息科技有限公司

<120> 数字PCR检测基因点突变方法及装置

<130> PN64200NHZY

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EGFR-T790M第一上游引物

<400> 1

cctcacctcc accgtgc

17

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EGFR-T790M第一下游引物

<400> 2

accagttgag caggtactgg

20

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EGFR-T790M第二上游引物

<400> 3

tgcctcacct ccaccg

16

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EGFR-T790第二下游M引物

<400> 4

accagttgag caggtactgg

20

<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> EGFR-T790M第三上游引物	
<400> 5	
gcatctgcct cacctccacc	20
<210> 6	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> EGFR-T790M第三下游引物	
<400> 6	
accagttgag caggtactgg gagg	24
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> EGFR-T790M第四上游引物	
<400> 7	
gggcatctgc ctcacctcca c	21
<210> 8	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> EGFR-T790M第四下游引物	
<400> 8	
acaccagttg agcaggtact gggag	25
<210> 9	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> EGFR-T790M第一探针	
<400> 9	

agctcatcat gcagctcat	19
<210> 10	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> EGFR_T790M第二探针	
<400> 10	
agctcatcac gcagctcat	19

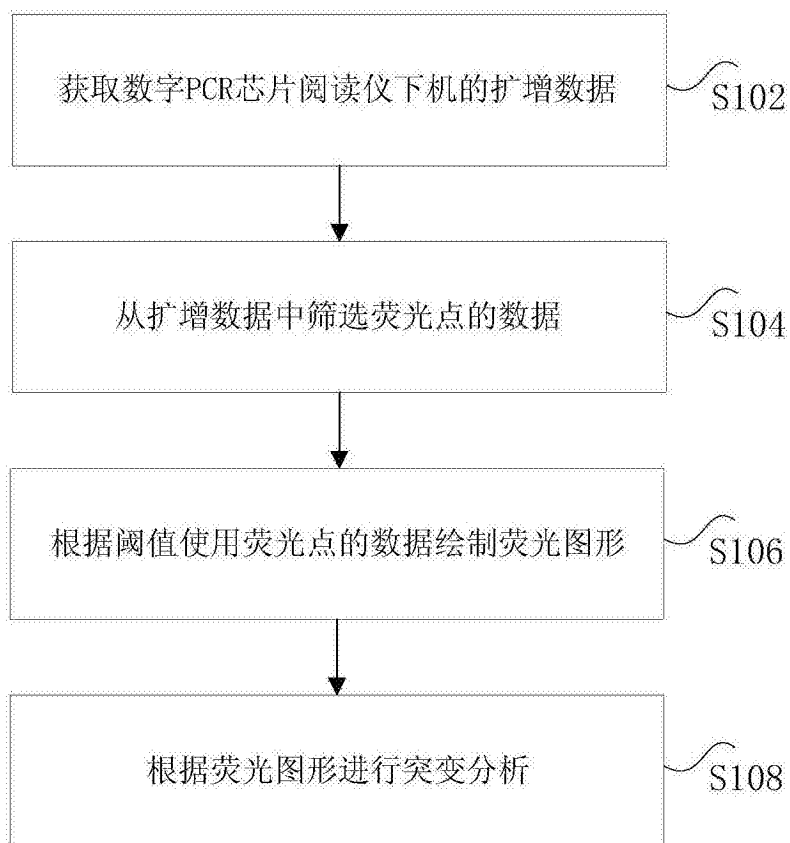


图1



图2



图3

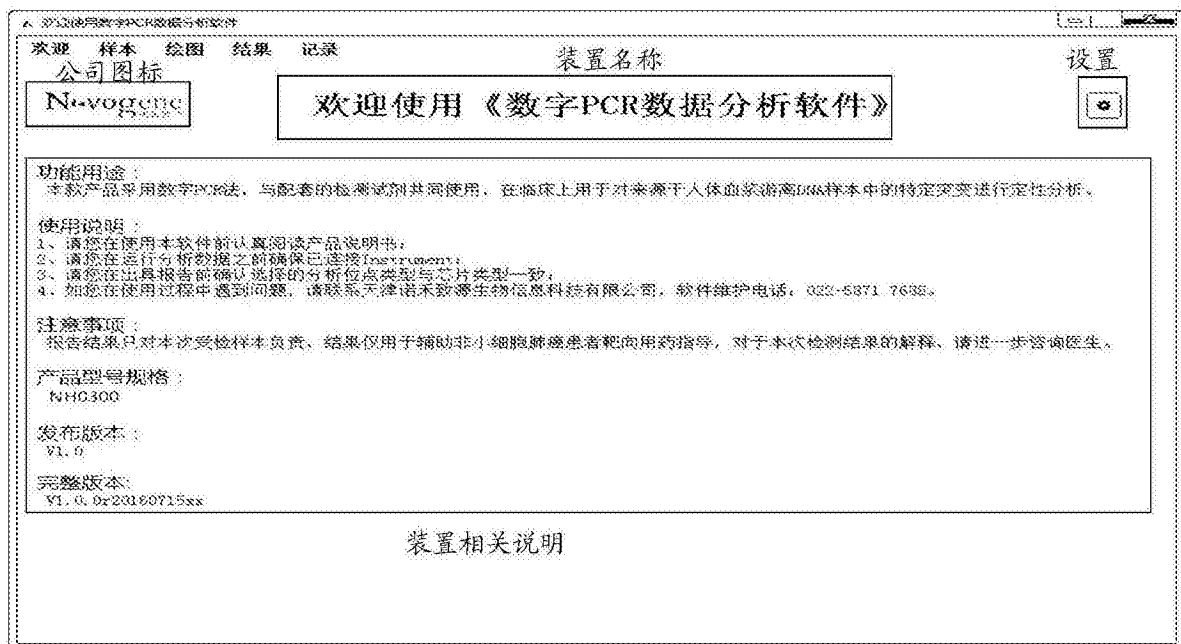


图4

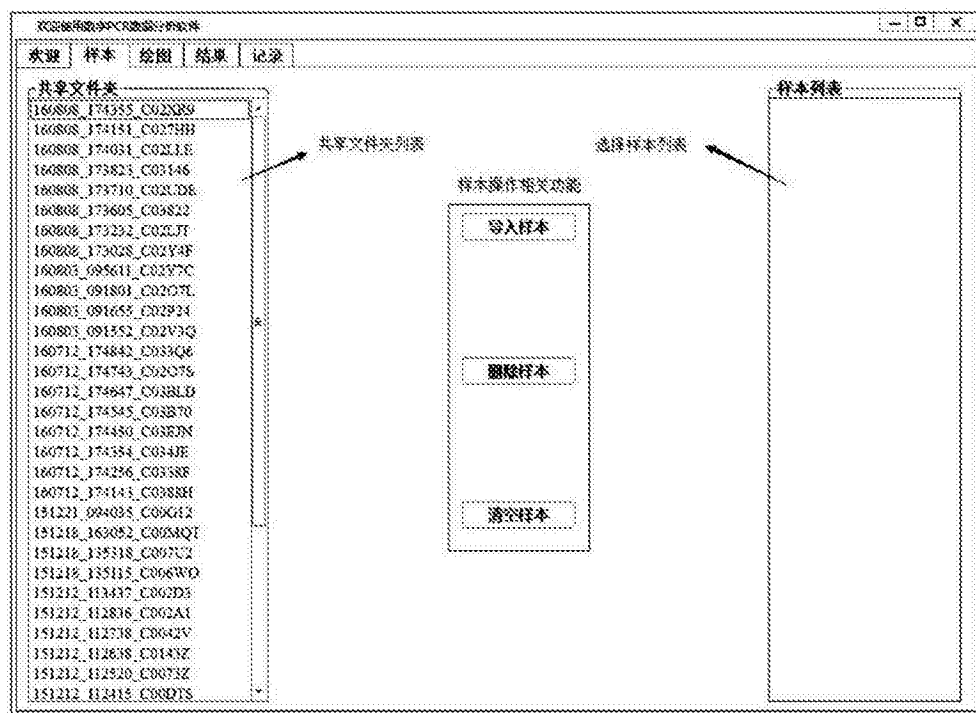


图5

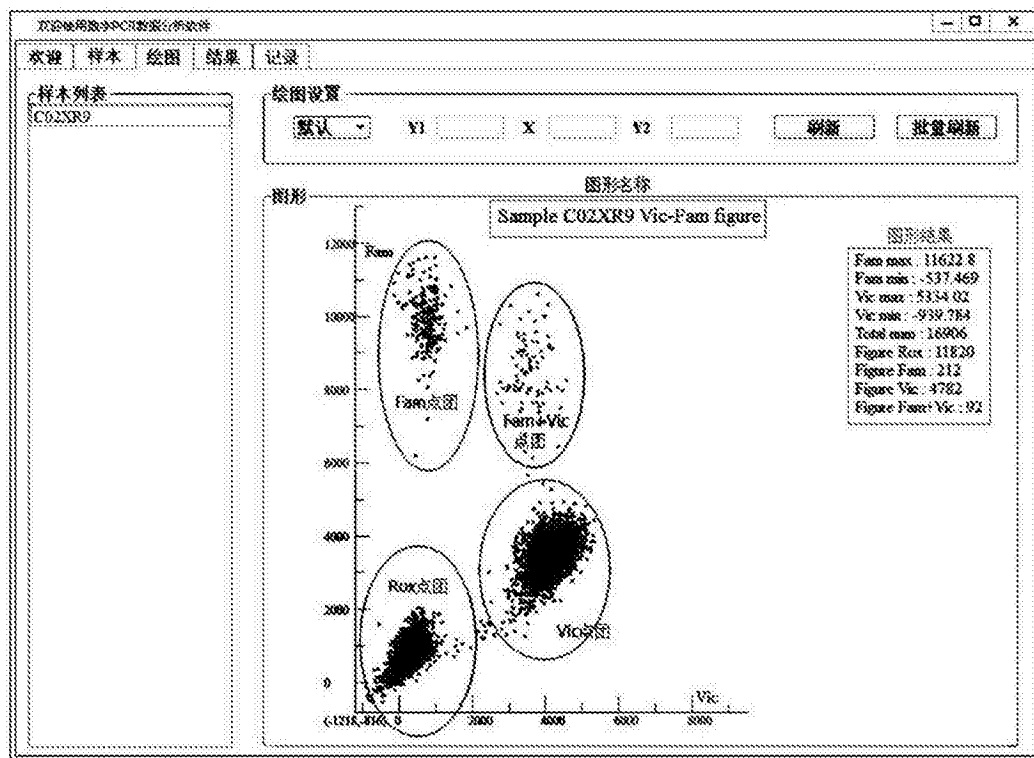


图6

双击使用脚本PCR数据综合分析软件

欢迎 样本 绘图 结果 记录

勾选后才可使用该按钮

检测结果

全选 打印报告

选择	芯片编号	样本编号	姓名	项目	突变类型	突变频率	(+/-)
☒	CD2KR9			8688 EGFR-T790M	20号外显子T790M	5.065 %	+

检测结果表格

分析结果

芯片编号	检测编号	Run name	File name	Total	突变频率	(+/-)
CD2KR9	237270792	308.768	9748.711	9058.477	5.065 %	+

分析结果表格

图7

双击使用脚本PCR数据综合分析软件

欢迎 样本 绘图 结果 记录

记录表格

操作时间	检测编号	芯片编号	样本编号	姓名	项目	突变类型	突变频率	(+/-)
2015-06-10 14:24:10 周三	237270792	CD2KR9	1111111	李西	8688 EGFR-T790M	20号外显子T790M	5.065 %	+

操作时间排序

图8