(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5642954号
(P5642954)

(45)発行日　平成26年12月17日(2014.12.17)　(24)登録日　平成26年11月7日(2014.11.7)

(51)Int.Cl.		F I		
G06F 19/24	(2011.01)	G06F	19/24	
C12M 1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A

請求項の数 9　外国語出願　(全 24 頁)

(21)出願番号	特願2009-239192 (P2009-239192)
(22)出願日	平成21年10月16日 (2009.10.16)
(65)公開番号	特開2010-113711 (P2010-113711A)
(43)公開日	平成22年5月20日 (2010.5.20)
審査請求日	平成24年8月21日 (2012.8.21)
(31)優先権主張番号	12/253,676
(32)優先日	平成20年10月17日 (2008.10.17)
(33)優先権主張国	米国 (US)

(73)特許権者　591003013
エフ．ホフマン－ラ　ロシュ　アーゲー
F．　HOFFMANN－LA　ROCHE　AKTIENGESELLSCHAFT
スイス・シーエイチ－４０７０バーゼル・グレンツアーヘルストラツセ１２４
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次

最終頁に続く

(54)【発明の名称】式レス法による融解温度の測定

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ＤＮＡの融解温度Ｔｍを測定するためのコンピュータに実行させる方法であって、下記：

各々が座標値を有する複数のデータポイントを含む、ＤＮＡ試料についての融解曲線を表すデータセットを受け入れ、

該融解曲線のデータポイントについての第１の微分値を数値的に決定し、

該第１の微分値に対して基準を決定し、

該第１の微分値から基準を差し引いて、修正された（ｍｏｄｉｆｉｅｄ）第１の微分値を生じさせ、

該修正された第１の微分値の第１の最大値を決定し、

回帰プロセスをガウシアン混合モデル（Ｇａｕｓｓｉａｎ　Ｍｉｘｔｕｒｅ　Ｍｏｄｅｌ）関数に適用することによって、前記修正された第１の微分値を適合させる曲線に対する近似を計算し、

該ＤＮＡ試料の融解温度Ｔｍを表す該第１の最大値を出力し、並びに

前記第１の微分値が前記第１の最大値に近い肩値を含むかどうかを決定する

ことを含む方法であって、前記ガウシアン混合モデルが、形式：

【数１】

$$GMM_1 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)$$

（式中、μ１は第１のパラメーターであり、ａ１及びσ１は付加パラメーターである）の式を含む方法。

【請求項２】

前記回帰プロセスが、レーベンバーグ・マルカート（Ｌｅｖｅｎｂｅｒｇ－Ｍａｒｑｕａｒｄｔ：ＬＭ）回帰プロセスであって、該回帰プロセスをガウシアン混合モデル関数に適用することによって、前記修正された第１の微分値を適合させ、該関数の１以上のパラメーターを決定する曲線に対する近似を計算し、ここで、該パラメーターは初期条件を含み、該第１の最大値は第１のパラメーターに対する初期条件として使用され、

前記決定された第１のパラメーターは前記ＤＮＡ試料の融解温度Ｔｍを表す第１のパラメーターを出力する

工程を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

さらに、下記：

前記修正された第１の微分値の第２、第３又は第４の最大値を決定し、ここで、該第２、第３又は第４の最大値は、第２、第３又は第４のパラメーターについての初期条件として使用され、並びに

前記決定された第２、第３又は第４のパラメーターが、前記ＤＮＡ試料の第２の融解温度Ｔｍ２、第３の融解温度Ｔｍ３又は第４の融解温度Ｔｍ４を表す前記第２、第３又は第４のパラメーターを出力する

工程を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項４】

前記ガウシアン混合モデルが、形式：

【数２】

$$GMM_2 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right)$$

（式中、μ１は第１のパラメーターであり、μ２は第２のパラメーターであり、ａ１、σ１、ａ２及びσ２は付加パラメーターである）

の式を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項５】

前記ガウシアン混合モデルが、形式：

【数３】

$$GMM_3 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)+Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right)+$$
$$Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right)$$

（式中、μ_1は第１のパラメーターであり、μ_2は第２のパラメーターであり、μ_3は第３のパラメーターであり、a_1、σ_1、a_2、σ_2、a_3及びσ_3は付加パラメーターである）
の式を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記ガウシアン混合モデルが、形式：
【数４】

$$GMM_4 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)+Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right)+$$
$$Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right)+Exp(-a_4)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_4}{\sigma_4}\right)^2\right)$$

（式中、μ_1は第１のパラメーターであり、μ_2は第２のパラメーターであり、μ_3は第３のパラメーターであり、μ_4は第４のパラメーターであり、a_1、σ_1、a_2、σ_2、a_3、σ_3、a_4及びσ_4は付加パラメーターである）
の式を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
ＤＮＡの融解温度Ｔｍを決定する処理装置を制御するコードを含むコンピュータ読み取り可能な媒体であって、該コードは、下記：
各々が一対の座標値を有する複数のデータポイントを含む、ＤＮＡ試料についての融解曲線を表すデータセットを受け入れ、
該融解曲線のデータポイントについての第１の微分値を数値的に決定し、
該第１の微分値に対して基準を決定し、
該第１の微分値から基準を差し引いて、修正された（ｍｏｄｉｆｉｅｄ）第１の微分値を生じさせ、
該修正された第１の微分値の第１の最大値を決定し、
回帰プロセスをガウシアン混合モデル関数に適用することによって、前記修正された第１の微分値を適合させる曲線に対する近似を計算し、
該ＤＮＡ試料の融解温度Ｔｍを表す該第１の最大値を出力し、並びに
前記第１の微分値が前記第１の最大値に近い肩値を含むかどうかを決定する
という指示を含む媒体であって、前記ガウシアン混合モデルが、形式：

【数５】

$$GMM_1 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)$$

（式中、μ１は第１のパラメーターであり、ａ１及びσ１は付加パラメーターである）の式を含む媒体。

【請求項８】

動的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）システムであって、下記：

各々が一対の座標値を有する複数のデータポイントを含む、ＤＮＡ融解曲線を表す融解曲線データセットを生じさせる動的ＰＣＲ分析モジュール；並びに

下記：

各々が一対の座標値を有する複数のデータポイントを含む、ＤＮＡ試料についての融解曲線を表すデータセットを受け入れ、

該融解曲線のデータポイントについての第１の微分値を数値的に決定し、

該第１の微分値に対して基準を決定し、

該第１の微分値から基準を差し引いて、修正された（ｍｏｄｉｆｉｅｄ）第１の微分値を生じさせ、

該修正された第１の微分値の第１の最大値を決定し、

回帰プロセスをガウシアン混合モデル関数に適用することによって、前記修正された第１の微分値を適合させる曲線に対する近似を計算し、

該ＤＮＡ試料の融解温度Ｔｍを表す該第１の最大値を出力し、及び

前記第１の微分値が前記第１の最大値に近い肩値を含むかどうかを決定する

によって、Ｔｍ値を決定するために該融解曲線データセットを処理するように適用される情報（ｉｎｔｅｌｌｉｇｅｎｃｅ）モジュール

を含むシステムであって、前記ガウシアン混合モデルが、形式：

【数６】

$$GMM_1 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)$$

（式中、μ１は第１のパラメーターであり、ａ１及びσ１は付加パラメーターである）の式を含むシステム。

【請求項９】

前記動的ＰＣＲ分析モジュールが動的サーモサイクラーデバイスにあり、前記情報モジュールが該分析モジュールに伝達可能に連結されたプロセッサーを含むか、又は前記情報モジュールがネットワーク接続若しくは直接的な接続の１つによって該分析モジュールに連結されたコンピュータシステムにあるプロセッサーを含む、請求項８に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【０００１】

本発明は、概して、オリゴヌクレオチドの融解特徴を表すデータを処理することに関し、より具体的には、融解曲線データに基づくオリゴヌクレオチド試料についての１以上の融解温度を決定する方法に関する。

【０００２】

ＤＮＡ融解温度の決定は、通常は、ＰＣＲ実験後に直接的に実行され、遺伝子型を区別するために重要な方法である。例えば、最近、文献には、非小細胞肺癌の治療のためにどの患者が候補をなり得るかを決定するためのＫＲＡＳ遺伝子の試験の使用が開示されている。ＫＲＡＳ遺伝子が野生型である患者は、治療の恩恵を受けるが、患者がこの遺伝子の突然変異した改変を有する場合には、治療による恩恵は受けられない。これらの治療は、多くの場合、重大な副作用を有するため、患者の正確な遺伝子型を決定することが重要となる。融解ＫＲＡＳアッセイの使用は、患者の遺伝子型を区別するのに役立つ。したがって、ＤＮＡ試料の融解温度を正確かつ効率的に決定するシステム及び方法を提供することが望まれる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００３】

本発明は、融解曲線データに基づく、オリゴヌクレオチドに対する融解温度を決定するシステム及び方法を提供する。種々の態様では、融解曲線データセットの１次微分係数の数値的な決定がなされる。モデル関数、例えば、ガウシアン混合モデル（Ｇａｕｓｓｉａｎ　Ｍｉｘｔｕｒｅ　Ｍｏｄｅｌ：ＧＭＭ）関数は、レーベンバーグ・マルカート（Ｌｅｖｅｎｂｅｒｇ－Ｍａｒｑｕａｒｄｔ：ＬＭ）回帰プロセスを用いて決定されるパラメーターを含み、それを使用して、第１の微分曲線への近似を見出す。数値的に決定した第１の微分値の最大値は、モデル関数のパラメーターについての初期条件として使用される。決定したパラメーターは、分画（ｆｒａｃｔｉｏｎａｌ）融解温度値を提供し、それは戻され、例えば、表示され、あるいは更なる処置のために使用され得る。

【０００４】

本発明の１局面によれば、ＤＮＡの融解温度Ｔｍを測定するためのコンピュータに実行させる方法が提供される。この方法は、典型的には、各々が座標値を有する複数のデータポイントを含む、ＤＮＡ試料についての融解曲線を表すデータセットを受け入れることを含む。また、この方法は、典型的には、該融解曲線のデータポイントについての第１の微分値を数値的に決定し、該第１の微分値に対して基準を決定し、該第１の微分値から基準を差し引いて、修正された（ｍｏｄｉｆｉｅｄ）第１の微分値を生じさせ、該修正された第１の微分値の第１の最大値を決定することを含む。また、この方法は、典型的には、該ＤＮＡ試料の融解温度Ｔｍを表す該第１の最大値を出力することを含む。この方法は、さらに、レーベンバーグ・マルカート（Ｌｅｖｅｎｂｅｒｇ－Ｍａｒｑｕａｒｄｔ：ＬＭ）回帰プロセスをガウシアン混合モデル（Ｇａｕｓｓｉａｎ　Ｍｉｘｔｕｒｅ　Ｍｏｄｅｌ）関数に適用することによって、前記修正された第１の微分値を適合させ、該関数の１以上のパラメーターを決定する曲線に対する近似を計算し、ここで、該パラメーターは初期条件を含み、該第１の最大値は第１のパラメーターに対する初期条件として使用され、前記決定された第１のパラメーターは前記ＤＮＡ試料の融解温度Ｔｍを表す第１のパラメーターを出力する工程を含む。ある局面では、この方法は、さらに、第１の微分値が第１の最大値に近い肩値を含むかどうかを決定することを含む。ある種の態様では、ガウシアン混合モデルが、形式：

【０００５】

【数１】

$$GMM_1 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)$$

【０００６】

（式中、μ_1は第１のパラメーターであり、a_1及びσ_1は付加パラメーターである）

の式を含む。別の局面では、この方法は、さらに、第１のパラメーター値を表示すること

を含む。なお別の局面では、回帰プロセスはレーベンバーグ・マルカート（ＬＭ）回帰プロセスを含む。ある種の局面では、この方法は、修正された第１の微分値の第２、第３又は第４の最大値を決定することをさらに含み、ここで、該第２、第３又は第４の最大値は、第２、第３又は第４のパラメーターについての初期条件として使用され；前記決定された第２、第３又は第４のパラメーターが、前記ＤＮＡ試料の第２の融解温度Ｔｍ２、第３の融解温度Ｔｍ３又は第４の融解温度Ｔｍ４を表す前記第２、第３又は第４のパラメーターを出力する。この方法の別の局面では、ガウシアン混合モデルは、形式：

【０００７】

【数２】

$$GMM_2 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right)$$

【０００８】

（式中、μ_1は第１のパラメーターであり、μ_2は第２のパラメーターであり、a_1、σ_1、a_2及びσ_2は付加パラメーターである）

の式を含む。この方法のなお別の局面では、ガウシアン混合モデルは、形式：

【０００９】

【数３】

$$GMM_3 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right) + Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right)$$

【００１０】

（式中、μ_1は第１のパラメーターであり、μ_2は第２のパラメーターであり、μ_3は第３のパラメーターであり、a_1、σ_1、a_2、σ_2、a_3及びσ_3は付加パラメーターである）

の式を含む。この方法のなお別の局面では、ガウシアン混合モデルは、形式：

【００１１】

【数４】

$$GMM_4 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right) + Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right) + Exp(-a_4)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_4}{\sigma_4}\right)^2\right)$$

【００１２】

（式中、μ_1は第１のパラメーターであり、μ_2は第２のパラメーターであり、μ_3は第３のパラメーターであり、μ_4は第４のパラメーターであり、a_1、σ_1、a_2、σ_2、a_3、σ_3、a_4及びσ_4は付加パラメーターである）

の式を含む。この方法の別の局面では、第１の最大値を決定することは、修飾された第１の微分値にウィンドウプロセスを適用することを含み、ここで、該ウィンドウプロセスは

また、ガウシアン混合モデル関数パラメーターについての１以上の付加初期条件を決定する。

【００１３】

本発明の別の局面によれば、コンピュータ読み取り可能な媒体が提供され、それは、ＤＮＡの融解温度Ｔｍを決定するプロセッサーを制御するためのコードを格納する。格納されたコートは、典型的には、各々が一対の座標値を有する複数のデータポイントを含む、ＤＮＡ試料についての融解曲線を表すデータセットを受け入れ、該融解曲線のデータポイントについての第１の微分値を数値的に決定し、第１の微分値に対する基準を決定し、第１の微分値から基準を差し引いて、修正された第１の微分値を生じさせ、第１の微分値の第１の最大値を決定する指示を含む。また、コードは、典型的には、第１の最大値を出力する指示を含み、ここで、第１の最大値はＤＮＡ試料の融解温度Ｔｍを表す。また、コードは、典型的には、レーベンバーグ・マルカート（ＬＭ）回帰プロセスをガウシアン混合モデル関数に適用することによって修正された第１の微分値を適合して、この関数の１以上のパラメーターを決定する曲線の近似を計算し、ここで、該パラメーターは初期条件を含み、第１の最大値は第１のパラメーターについての初期条件として使用し、修正された第１のパラメーターはＤＮＡ試料の融解温度Ｔｍを表す第１のパラメーターを出力する指示を含む。本明細書では、ある種の局面では、ガウシアン混合モデルは、形式：

【００１４】

【数５】

$$GMM_1 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)$$

【００１５】

（式中、μ_1は第１のパラメーターであり、a_1及びσ_1は付加パラメーターである）

の式を含む。ある種の局面では、コードは、第１の微分値が第１の最大値に近い肩値を含むかどうかを決定するための指示をさらに含む。別の局面では、コードは、第１のパラメーター値を表示する指示をさらに含む。なお別の局面では、コードは、修正された第１の微分値の第２の最大値を決定し、ここで、第２の最大値は、第２のパラメーターについての初期条件として使用され；修正された第２のパラメーターはＤＮＡ試料の第２の融解温度Ｔｍを表す、第２のパラメーターを出力する指示を含む。ある種の局面では、ガウシアン混合モデルは、形式：

【００１６】

【数６】

$$GMM_2 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right)$$

【００１７】

（式中、μ_1は第１のパラメーターであり、μ_2は第２のパラメーターであり、a_1、σ_1、a_2及びσ_2は付加パラメーターである）

の式を含む。なお別の局面では、ガウシアン混合モデルは、形式：

【００１８】

【数７】

$$GMM_3 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right) + Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right)$$

【００１９】
（式中、μ_1は第１のパラメーターであり、μ_2は第２のパラメーターであり、μ_3は第３のパラメーターであり、a_1、σ_1、a_2、σ_2、a_3及びσ_3は付加パラメーターである）
の式を含む。なお別の局面では、ガウシアン混合モデルは、形式：
【００２０】
【数８】

$$GMM_4 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right) + Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right) + Exp(-a_4)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_4}{\sigma_4}\right)^2\right)$$

【００２１】
（式中、μ_1は第１のパラメーターであり、μ_2は第２のパラメーターであり、μ_3は第３のパラメーターであり、μ_4は第４のパラメーターであり、a_1、σ_1、a_2、σ_2、a_3、σ_3、a_4及びσ_4は付加パラメーターである）
の式を含む。コンピュータ読み取り可能な媒体の別の局面では、第１の最大値を決定する指示は、修正された第１の微分値へのウィンドウプロセスを適用する指示を含み、ここで、ウィンドウプロセスはまた、ガウシアン混合モデル関数パラメーターについての１以上の付加初期条件を決定する。
【００２２】
本発明のなお別の局面によれば、動的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）システムが提供され、それは、典型的には、各々が一対の座標値を有する複数のデータポイントを含む、ＤＮＡ融解曲線を表す融解曲線データセットを生じさせる動的ＰＣＲ分析モジュール；並びにＴｍ値を決定する融解曲線データセットを処理するように適合される情報（ｉｎｔｅｌｌｉｇｅｎｃｅ）を含む。この情報モジュールは、典型的には、該融解曲線のデータポイントについての第１の微分値を数値的に決定し、該第１の微分値に対して基準を決定し、該第１の微分値から基準を差し引いて、修正された第１の微分値を生じさせ、該修正された第１の微分値の第１の最大値を決定することによって、Ｔｍ値を決定する。また、情報モジュールは、典型的には、Ｔｍ値として修正された１次微分係数の決定した第１の最大値を使用して、該Ｔｍ値を出力することによってＴｍ値を決定する。ある種の態様では、情報モジュールは、レーベンバーグ・マルカート（ＬＭ）回帰プロセスをガウシアン混合モデル関数に適用することによって修正された第１の微分値を適合させ、この関数の１以上のパラメーターを決定する曲線の近似を計算し、ここで、該パラメーターは初期条件を含み、該第１の最大値は第１のパラメーターについての初期条件として使用され、並びに、該決定した第１のパラメーターはＤＮＡ試料の融解温度Ｔｍを表す、第１のパラメーターを出力することによって、Ｔｍ値を決定する。ある種の局面では、ガウシアン混合モデルは、形式：

【００２３】
【数９】

$$GMM_1 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)$$

【００２４】
（式中、μ$_1$は第１のパラメーターであり、ａ$_1$及びσ$_1$は付加パラメーターである）
の式を含む。別の局面では、情報モジュールは、第１の微分値が第１の最大値に近い肩値を含むかどうかを決定するためにさらに適合される。なお別の局面では、情報モジュールは、さらに、修正された第１の微分値の第２の最大値を決定し、ここで、第２の最大値は、第２のパラメーターについての初期条件として使用され；決定した第２のパラメーターはＤＮＡ試料の第２の融解温度Ｔｍを表す、第２のパラメーターを出力するようにさらに適合される。ある種の局面では、修正された第１の微分値の第２の最大値が決定され、ここで、第２の最大値は、第２のパラメーターについての初期条件として使用され、ガウシアン混合モデルは、形式：
【００２５】
【数１０】

$$GMM_2 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right)$$

【００２６】
（式中、μ$_1$は第１のパラメーターであり、μ$_2$は第２のパラメーターであり、ａ$_1$、σ$_1$、ａ$_2$、及びσ$_2$は付加パラメーターである）
の式を含む。ある種の局面では、修正された第１の微分値の第３の最大値が決定され、ここで、第３の最大値は、第３のパラメーターについての初期条件として使用され、ガウシアン混合モデルは、形式：
【００２７】
【数１１】

$$GMM_3 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right) +$$
$$Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right)$$

【００２８】
（式中、μ$_1$は第１のパラメーターであり、μ$_2$は第２のパラメーターであり、μ$_3$は第３のパラメーターであり、ａ$_1$、σ$_1$、ａ$_2$、σ$_2$、ａ$_3$及びσ$_3$は付加パラメーターである）
の式を含む。ある種の局面では、修正された第１の微分値の第４の最大値が決定され、ここで、第４の最大値は、第４のパラメーターについての初期条件として使用され、ガウシアン混合モデルは、形式：
【００２９】

【数１２】

$$GMM_4 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)+Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right)+$$
$$Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right)+Exp(-a_4)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_4}{\sigma_4}\right)^2\right)$$

【００３０】
（式中、μ_1は第１のパラメーターであり、μ_2は第２のパラメーターであり、μ_3は第３のパラメーターであり、μ_4は第４のパラメーターであり、a_1、σ_1、a_2、σ_2、a_3、σ_3、a_4及びσ_4は付加パラメーターである）
の式を含む。このシステムの別の局面では、情報モジュールは、修正された第１の微分値にウィンドウプロセスを適用することによって第１の最大値を決定し、ここで、ウィンドウプロセスはまた、ガウシアン混合モデル関数パラメーターについての１以上の付加初期条件を決定する。

【００３１】
図面及び特許請求の範囲を含む本発明の残り部分への参照は、本発明の他の特徴及び利点を実現する。本発明の更なる特徴及び利点、並びに本発明の種々の態様の構造及び操作は、添付の図面と比較しながら、下記に詳細に記載される。図面では、同様に、参考文献の番号は、同一又は機能的に類似した要素を指示する。

【図面の簡単な説明】

【００３２】
【図１】融解曲線の例を例示する。
【図２】図１の融解曲線に対する第１の微分曲線を例示する。
【図３】基準の差し引き後の図２の微分曲線を示す。
【図４】一態様による、融解温度（単数又は複数）を決定するためのプロセスを例示する。
【図５】一態様による、融解温度コンピュータ化プロセスを例示する。
【図６】一態様による、肩検出プロセスを例示する。
【図７ａ】図７ａは、それぞれ、１つの融解ピークの場合での生データ及び融解曲線の例示を示す。
【図７ｂ】図７ｂは、それぞれ、１つの融解ピークの場合での生データ及び融解曲線の例示を示す。
【図８ａ】図８ａは、それぞれ、２つの融解ピークの場合での生データ及び融解曲線の例示を示す。
【図８ｂ】図８ｂは、それぞれ、２つの融解ピークの場合での生データ及び融解曲線の例示を示す。
【図９ａ】図９ａは、それぞれ、２つの融解ピークの場合での生データ及び融解曲線の例示を示す。
【図９ｂ】図９ｂは、それぞれ、２つの融解ピークの場合での生データ及び融解曲線の例示を示す。
【図１０ａ】図１０ａは、それぞれ、１つの融解ピーク＋肩の場合での生データ及び融解曲線の例示を示す。
【図１０ｂ】図１０ｂは、それぞれ、１つの融解ピーク＋肩の場合での生データ及び融解曲線の例示を示す。
【図１１ａ】図１１ａは、それぞれ、１つの融解ピーク＋肩の場合での生データ及び融解曲線の例示を示す。

【図１１ｂ】図１１ｂは、それぞれ、１つの融解ピーク＋肩の場合での生データ及び融解曲線の例示を示す。
【図１２】本発明のプロセス及びシステムを実行するために使用することができるソフトウェアとハードウェア資源との間の関係を説明する一般的なブロック図を示す。
【図１３】サーモサイクラーとコンピュータシステムとの間の相互作用を例示する。
【発明を実施するための形態】
【００３３】
本発明は、ＤＮＡについての融解温度Ｔｍを決定するためのシステム及び方法を提供する。
【００３４】
本発明は、融解曲線を表すデータを分析することによる、融解温度を決定するためのシステム及び方法を提供する。ある種の局面では、融解曲線データセットの１次微分係数の数値的な決定がなされる。レーベンバーグ・マルカート（ＬＭ）回帰プロセスを用いて測定されたパラメーターを含むガウシアン混合モデル（ＧＭＭ）関数を使用して、第１の微分曲線への近似を見出す。数値的に決定した第１の微分値の最大値は、ＧＭＭ関数のパラメーターについての初期条件として使用される。決定したパラメーターは、分画融解温度Ｔｍ値を提供する。次に、Ｔｍ値（単数又は複数）は、戻され、表示されるか又は他には更なる処置のために使用されてもよい。
【００３５】
ＰＣＲプロセスとの関連における融解曲線の一例を図１に示す。図１に示されるように、典型的な融解曲線についてのデータは、２次元座標系で表すことができ、例えば、温度をｘ軸に定義し、蓄積されたポリヌクレオチドの指標をｙ軸にする。典型的には、蓄積されたポリヌクレオチドの指標は、蛍光マーカーの使用がおそらくは最も広く使用されている標識スキームであるため、蛍光強度値である。しかしながら、他の指標は、特定の標識及び／又は使用される検出スキームに依存して使用可能である。蓄積されたシグナルの他の有用な指標の例には、ルミネッセンス強度、ケミルミネッセンス強度、バイオルミネッセンス強度、リン光強度、電荷移動、電圧、電力、力、エネルギー、温度、粘度、光散乱、放射線強度、反射率、透過及び吸光度が挙げられる。
【００３６】
一般的プロセスの概要
図１に示される典型的な融解曲線を考慮されたい。図１に表されるデータからは１以上の融解温度を得ることが望まれる。一態様によれば、融解温度を決定するためのプロセス１００は、図４と比較して、簡潔に記載することができる。肯定１１０では、融解曲線を表す実験的データセットは、戻され、又は他には獲得される。プロットされた融解曲線データセットの例を図１に示す。ここでは、ｙ軸及びｘ軸は、それぞれ、融解曲線に対する蛍光強度及び温度を表す。ある種の局面では、データセットは、連続的であり、かつ軸に沿って等しく間隔を空けているデータを含まなければならない。
【００３７】
プロセス１００が、サーモサイクラーなどのＰＣＲデバイスにある情報モジュール（例えば、指示を施行するプロセッサー）において実行される場合、データセットは、データが回収されているので、リアルタイムで情報モジュールに提供されてもよく、あるいは、記憶ユニット又はバッファーに格納され、実験が完了後に情報モジュールに情報モジュールに適用されてもよい。同様に、データセットは、取得デバイスに対してネットワーク接続（例えば、ＬＡＮ、ＶＰＮ、イントラネット、インターネットなど）又は直接的な接続（例えば、ＵＳＢ又は他の直接的なワイヤー接続若しくはワイヤーレス接続）を介して、デスクトップコンピュータシステム又は他のコンピュータシステムなどの別々のシステムに提供されてもよく、あるいはＣＤ、ＤＶＤ、フロッピー（登録商標）ディスクなどのポータブル媒体に提供されてもよい。ある種の局面では、データセットには、一対の座標値を有するデータポイント（又は２次元ベクター）が含まれる。融解データに関しては、一対の座標値は、典型的には、温度及び蛍光強度値を表す。データセットが工程１１０で受

け入れられるか又は取得された後、このデータセットを分析して、融解温度（単数又は複数）を決定してもよい。

【００３８】

工程１２０では、データを数値的に処理して、微分値が決定される。これらの曲線の融解温度は、温度と比較した蛍光強度の１次微分係数（ｙ軸）の最大に対応する（分画）温度値（ｘ軸）を見出すことによって得られる。図１に示されるデータを用いて、１次微分係数に関する対応図を図２に示す。一態様では、基準の差し引きは、微分曲線データで実行され、修正された微分係数データを生じさせる。一態様では、基準差し引きは、最初に、図２における最初の５点の蛍光値の中央値として「中央値左（ＭｅｄｉａｎＬｅｆｔ）」を決定し、次に、図２における最後の５点の蛍光値の中央値として「中央値右（ＭｅｄｉａｎＲｉｇｈｔ）」を決定することによって実行される。その後、図２における「中央値左」点（ｘ，ｙ）と「中央値右」点（ｘ，ｙ）とを結ぶ直線が特定される。次に、この直線の傾き及び切片は、全ての座標対から差し引かれる。図３は、基準差し引き後の微分曲線を示す。

【００３９】

一態様では、微分係数は、Ｓａｖｉｔｚｋｙ－Ｇｏｌａｙ（ＳＧ）法の使用によって得られる。［Ａ．Ｓａｖｉｔｚｋｙ ａｎｄ Ｍａｒｃｅｌ Ｊ．Ｅ．Ｇｏｌａｙ（１９６４）．Ｓｍｏｏｔｈｉｎｇ ａｎｄ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ｏｆ Ｄａｔａ ｂｙ Ｓｉｍｐｌｉｆｉｅｄ Ｌｅａｓｔ Ｓｑｕａｒｅｓ Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ．Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３６：１６２７－１６３９ ａｎｄ Ｐｒｅｓｓ，Ｗ．Ｈ．，ｅｔ ａｌ．“Ｎｕｍｅｒｉｃａｌ Ｒｅｃｉｐｅｓ ｉｎ Ｃ，２ｎｄ Ｅｄ．，”Ｓａｖｉｔｚｋｙ－Ｇｏｌａｙ Ｓｍｏｏｔｈｉｎｇ Ｆｉｌｔｅｒｓ，Ｓｅｃｔｉｏｎ １４．８，６５０－６５５を参照されたい］。ＳＧ－２－２－２形態（左に２点、右に２点、２次多項式を意味する）を用いて、一態様では、生の融解データ曲線の１次微分係数を計算する。一般に、ＳＧ法の他の形態は、例えば、ＳＧ－１－１－２からＳＧ－５０－５０－２なども用いてもよい。より一般には、ＳＧ－ｘ－ｙ－ｚを使用してもよく、この場合、ｘ及びｙは１～５０の数であり、ｚは１～５の数である。

【００４０】

微分係数のスケール不変形

ある種の態様では、代替法を用いて、融解温度をスケール不変であるようにするために微分係数が計算される。スケール不変は、蛍光値が定数で乗じられる場合、得られるＴｍ値（単数又は複数）は変化しない。

【００４１】

一方法によれば、蛍光値は、平均した蛍光値によって除され、その後、微分融解曲線を計算し、例えば、ｙは、

【００４２】

【数１３】

$$y / y_{mean}, \text{ where } y_{mean} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} y_i . \qquad (1)$$

【００４３】

によって置換される。

【００４４】

別の方法によれば、蛍光値は、（最大蛍光－最少蛍光）によって除され、その後、微分融解温度が計算される。

【００４５】

別の方法によれば、蛍光値の微分係数は、蛍光値によって除され、その後、融解温度が計算される。

【００４６】
なお別の方法によれば、蛍光値の微分係数は、蛍光値の平均した微分係数によって除され、その後、融解温度が計算される。
【００４７】
さらに別の方法によれば、蛍光値の微分係数は、蛍光値の（最大－最少）微分係数によって除され、その後、融解温度が計算される。
【００４８】
図４に戻ると、工程１３０では、最初の微分係数データにおける多数のピークは決定される。一態様では、極大プロセスを用いて、１次微分係数データにおける０、１、２、３又は４つのピークが決定され、これは、より詳細には下記に検討される。生の微分係数データを使用してもよく、あるいは基準を差し引いた微分係数データを使用してもよい。
【００４９】
一態様では、分画Ｔｍ値は、工程１４０で決定される。例えば、図２又は３に示されるように、曲線の最大値を見出すために、一態様では、ガウシアン混合モデルがデータに適合される。ガウシアン混合モデルの平均は、最大値、即ち、Ｔｍ値に対応する。一態様では、曲線の当てはめは、決定された１次微分係数値、又は修正された（基準を差し引いた）微分係数値を適合する曲線の近似を計算し、回帰プロセスをガウシアン混合モデル関数に適用することによってなされ、この関数の１以上のパラメーターを決定する。ある種の局面では、レーベンバーグ・マルカート回帰プロセスが使用される。一態様では、単一ピークの場合に関しては、単一ピークに対するガウシアン混合モデルが、式（２）に示されるように使用される。２つのピークが存在する場合、２つのピークに対するガウシアン混合モデルが、式（３）に示されるように使用される。３つのピークが存在する場合、３つのピークに対するガウシアン混合モデルが、式（４）に示されるように使用される。４つのピークが存在する場合、４つのピークに対するガウシアン混合モデルが、式（５）に示されるように使用される。係数μ_1又は（μ_1，μ_2）に対する回帰された値は、それぞれ、１つ又は２つのピークに対するＴｍ値に対応する。ガウシアン混合モデルは、最大を見出すために付加的な微分係数を採用することよりはむしろ、一態様として使用され、微分係数のオーダーが高くなるにつれて（３次、４次）不安定となる可能性がある。
【００５０】

【数１４】

$$GMM_1 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) \quad (2)$$

$$GMM_2 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right) \quad (3)$$

$$GMM_3 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right) + Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right) \quad (4)$$

$$GMM_4 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right) + Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right) + Exp(-a_4)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_4}{\sigma_4}\right)^2\right) \quad (5)$$

【００５１】

当業者に明らかとなるように、他のモデル／関数がガウシアン混合モデルの代わりに使用可能であることは承認される。他のモデルの例には、Ｂｅｔａ、Ｂｉｎｏｍｉａｌ、Ｃａｕｃｈｙ、Ｃｈｉ、ＣｈｉＳｑｕａｒｅ、Ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ、Ｅｘｔｒｅｍｅ Ｖａｌｕｅ、ＦＲａｔｉｏ、Ｇａｍｍａ、Ｇｕｍｂｅｌ、Ｌａｐｌａｃｅ、Ｌｏｇｉｓｔｉｃ、Ｍａｘｗｅｌｌ、Ｐａｒｅｔｏ、Ｒａｙｌｅｉｇｈ、Ｓｔｕｄｅｎｔ Ｔ、及びＷｅｉｂｕｌｌモデルが挙げられる。

【００５２】

２を超えるピークを含む１次微分係数データを用いて、上記態様が適用可能であることが理解されなければならない。この場合、極大による係数μ_1、μ_2、μ_3、μ_4に対する初期概算は、最終の融解温度に対応する。

【００５３】

一態様では、レーベンバーグ・マルカート（ＬＭ）法を使用して、式（２）（又は式（３）、式（４）、式（５））を曲線当てはめされる。この方法の詳細は、参考文献［Ｍｏｒｅ，Ｊ．Ｊ．，“Ｔｈｅ Ｌｅｖｅｎｂｅｒｇ－Ｍａｒｑｕａｒｄｔ Ａｌｇｏｒｉｔｈｍ，Ｉｍｐｌｅｍｅｎｔａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｈｅｏｒｙ，”Ｎｕｍｅｒｉｃａｌ Ａｎａｌｙｓｉｓ，ｅｄ．Ｗａｔｓｏｎ，Ｇ．Ａ．Ｌｅｃｔｕｒｅ Ｎｏｔｅｓ ｉｎ Ｍａｔｈｅｍａｔｉｃｓ ６３０，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，１９７７］に見出すことができる。周知である他の回帰法を使用してもよいことは承認されなければならない。一般に、ＬＭ回帰法は、種々のインプットを必要とし、アウトプットを提供するアルゴリズムを含む。一局面では、インプットは、処理されるべきデータセット、このデータを適合するために使用される関数（例えば、ガウシアン混合モデル）、並びにこの関数のパラメーター又は変数についての初期推測を含む。アウトプットは、関数とデータセットとの間の距離の二乗の合成を最少にする関数に関する一連の１以上のパラメーターを含む。当業者に明らかとのなるように、他の回帰プロセスを使用してもよいことは承認されなければならない。

【００５４】
レーベンバーグ・マルカート法の１つの特徴は、回帰を実行する前にパラメーター値の良好な概算を必要とすることである。パラメーターa_1（又はa_1、a_2、a_3、a_4）及びσ_1（又はσ_1、σ_2、σ_3、σ_4）に関して、初期条件は、全ての場合において定数（例えば、１又は２）に等しいように設定可能である。これらのパラメーターは、一般に、影響を受けず、一般に、使用される初期条件に関わらずに収束する。パラメーターμ_1（又はμ_1、μ_2、μ_3、μ_4）は、各曲線について決定されるべきであるより正確な初期条件を必要としてもよい。一態様では、ウィンドウプロセスを用いて、下記により詳細に記載されるように、パラメーターμ_1（又はμ_1、μ_2、μ_3、μ_4）に関する初期条件を計算する。

【００５５】
任意工程１５０では、１以上のエキスパートシステムチェックを行い、下記により詳細に検討されるように、結果が有効であるかどうかを評価する。例えば、実行されると、エキスパートシステムチェックは、決定された結果が無効であることを判断することができる。

【００５６】
工程１６０では、Ｔｍ値（単数又は複数）が、例えば、表示又は他の処理のために戻されてもよい。グラフ表示は、図４の分析を実行したシステムと連結された、モニタースクリーン又はプリンターなどの表示デバイスを用いて表すことができ、あるいは、データは表示デバイス上で表すための別々のシステムに提供されてもよい。

【００５７】
ある態様では、R^2統計及び／又は信頼（例えば、９５％信頼性）区間は、GMM_1、GMM_2、GMM_3、GMM_4パラメーターについて計算される。これらの値は、曲線当てはめの質を評価し、計算されたＴｍ値が有効であるか、無効であるか、又はゼロである（試料が存在しない）かを決定するのを助けるためにエキスパートシステム（後述）において使用されてもよい。また、これらの値は、工程１６０で表示されてもよい。

【００５８】
曲線における最大の決定
一態様では、ウィンドウプロセスは、パラメーターμ_1、μ_2、μ_3、μ_4についての初期条件を決定するためにデータセットに使用される。下記のウィンドウプロセスは、最大２つのピークを含む１次微分係数について記載される。それにもかかわらず、上述されるように、このウィンドウプロセスは、最大４つのピークを示す１次微分係数データに適用可能であることは理解されなければならない。一態様では、ウィンドウプロセスは、下記の手法を使用することによって、潜在的な極大について検索する。

【００５９】
１．第１の点から開始して、データセットの第１のいくつかの（例えば、５個の）ポイント（ポイント１～５）を調べる。
２．中間のｙポイントがこれらの５ポイントにおいて最大でない場合、これらの５ポイントにおいて潜在的な最大はない。中間のｙポイントがこれらの５ポイントの最大であり、（一連の潜在的な最大に、０の正確な値を有するより長いポイント配列の中間の点を加えることを避けるために）０よりも大きな値を有する場合、潜在的な最大がある。一連の潜在的な最大Ｓにこのポイントを加える。
３．１ポイント（例えば、現にポイント２～６）によって滑りウィンドウを進め、２項に記載のプロセスを繰り返す。再度、これらの５ポイントのインデックス３で最大のみを受け入れる。全データセットを通じてこのプロセスを継続する。
４．可能性のある最大の結果セットＳを調べ、インデックス３で可能性の最大のセットを表し、可能性のある最大のこのセットＳ（Ｓｍａｘ）を見出す。
５．Ｓｍａｘが、マックスノイズ（ＭａｘＮｏｉｓｅ）インプットパラメーター（ユーザーによってインプットされるか、又は自動的に決定されてもよいノイズパラメーター）に等しいか又はそれよりも小さい場合、曲率データにおいてピークはない。

６．このセットＳからの残りの可能性のある最大データポイントを維持し、それらが、Ｓｍａｘ　ｘ　ＲｅｌａｔｉｖｅＭｉｎインプットパラメーターより大きく、ＡｂｓｏｌｕｔｅＭｉｎインプットパラメーターより大きいことを与える。

７．残されたデータポイントがただ１つである場合、ただ１つのピークが存在し、曲線はただ１つの最大を有する。この１つのピークをpk_1として特定する。残されたデータポイントが２つある場合、これは２つの最大を有する曲線を表す。２を超えるピークが存在する場合、データセットＳの最大値を有する２つのピークを採用し、これらの２つのうちのより低いサイクル数を有するピークをpk_1とし、より高いサイクル数を有するピークをpk_2として戻す。

８．μ_1についての初期条件はpk_1であり、（μ_1，μ_2）についての初期条件は（pk_1，pk_2）である。

【００６０】

融解温度計算（ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎ）

一態様に従う融解温度計算は、図５に例証される。工程２１０では、１次微分係数データセットが１つ又は２つ（又は３つ、４つ）のピークを含むどうかの決定がなされる。工程２２０では、融解データの１次微分係数が単一のピークを有するものとして同定される場合、融解曲線の最大は、式（２）に記載される単一成分のガウシアン関数の非線形回帰（例えば、レーベンバーグ・マルカート法又は他の回帰法を用いる）によって見出される。初期条件は、極大検索によって与えられる。工程２３０では、融解データセットの１次微分係数が２つのピーク（又は３つ、４つ）を有するものとして同定される場合、融解曲線の両方の極大は、式（３）に記載される二重成分のガウス関数の非線形回帰（例えば、レーベンバーグ・マルカート法を用いる）によって見出され、パラメーターμ_1、μ_2（又はμ_3及びμ_4）（Ｔｍ１、Ｔｍ２、又はＴｍ３及びＴｍ４に対応する）が戻される。初期条件は、極大検索によって与えられる。たとえ図５が１つ又は２つのピークについての融解温度計算を示す場合であっても、２つのピークについて使用される同じ融解温度計算は３つ及び４つのピークについても使用可能であることは承認されなければならない。

【００６１】

工程２４０では、肩検出プロセスは、一態様に従う単一の微分係数ピークについて肩が存在するかどうかを決定天然に存在しない微生物値する。２つ（又は３つ、４つ）のピークがＭＥＬＴアルゴリズムにおいて見出される場合、さらに処理されない。その代わりに、１つのピークが見出された場合、このピークに肩が存在することはあり得る。一態様に従う肩検出プロセスの詳細は、後に検討される。肩が検出されない場合、μ_1（Ｔｍ１に対応する）が戻される。工程２５０では、信頼区間は、種々のパラメーターについて決定される。工程２６０では、R^2値は、使用されるガウシアン混合モデルについて計算される。一態様では、ＧＭＭＡ（又はＧＭＭ２、ＧＭＭ３、ＧＭＭ４）フィットのR^2値が＞０．９であるか、又はパラメーター（μ_1，σ_1）、又は（μ_1，σ_1，μ_2，σ_2，μ_3，σ_3，μ_4，σ_4）がゼロを含まない場合、Ｔｍ１（又はＴｍ１、Ｔｍ２、ＴＭ３、Ｔｍ４）の値は、工程２７０で許容される。そうでなければ、Ｔｍ１、（又はＴｍ１、Ｔｍ２、ＴＭ３、Ｔｍ４）は工程２８０では、標的が検出されない（ＴＮＤ）として設定され、工程２９０での任意のエキスパートシステムは、ＴＮＤの最終コールとなるか又は無効である。

【００６２】

肩検出

一態様に従う肩検出プロセスは、図６に示される。工程３１０では、二重成分ガウシアンモデルは、初期条件として$a_{1,2}=2$、$\mu_{1,2}=m\pm2$、$\sigma_{1,2}=2$（ここで、ｍは単一ピークの融解温度である）を用いた同じ１次微分係数に適合される。工程３２０では、潜在的な主ピーク及び肩（低い）ピークが上述のように決定される。工程３３０では、より低いピークの高さが少なくともより高いピークのある種のパーセント（例えば、０．０５倍以上高いピーク）であるかどうかについて決定される。そうでない場合、コールを示さない肩は戻され、Ｔｍ決定処理が図５の工程２５０により継続する。そうである

場合、工程３４０では、信頼区間は、種々のパラメーターについて決定され、工程３５０では、R^2値は、ＧＭＭ２式について決定される。工程３６０では、平均の信頼区間が、互いに離れた少なくともある種の数値の℃（例えば、３℃以上）であるかどうかについて決定される。そうでない場合、コールを示さない肩は戻され、Ｔｍ決定処理が図５の工程２５０により継続する。そうである場合、工程３７０では、信頼区間がゼロを含むかどうか、又はR^2値が閾値（例えば、０．９）よりも大きいかどうかについての決定がされる。そうでない場合、コールを示さない肩は戻され、Ｔｍ決定処理が図５の工程２５０により継続する。μ１及びμ２の両方で評価される二重成分のガウシアンモデル（ＧＭＭ２）の二次（２ｄ）微分係数が負であるかどうかの決定。そうである場合、肩を検出するコールがなされる。

【００６３】

このようにして、収束されたＬＭ法を前提とすると、一態様では、肩は、下記の条件の全てが当てはまる場合に検出される。

・１次微分係数データが正確に１つの極大を有するように同定された。
・低いピークが高さにして高いピークの少なくとも０．５倍である（例えば、「ｅｘｐ（－ａ）」を用いる）。
・平均の信頼区間が互いに少なくとも３℃離れている。
・μ_1、μ_2、σ_1及びσ_2の信頼区間はゼロを含まないか、又はR^2＞０．９である。
・μ_1及びμ_2の両方で評価される二重成分のガウシアンモデル（ＧＭＭ２）の２次微分係数が負である。

【００６４】

これらの条件が満たされる場合、肩検出フラグが生じる。上記の肩検出プロセスは、１つ又は２つのピークを含む１次微分係数についての図６と関連して記載される。それにもかかわらず、上述されるように、この肩検出プロセスは、最大４つのピークを示す１次微分係数データに適用可能であることは理解しなければならない。

【００６５】

エキスパートシステムチェック

一態様では、１以上のエキスパートシステムチェックは、工程２９０（図５）で実行される。１つのチェックでは、全部の全融解曲線の中央値が＞０であるかどうかが決定される。これが誤りである場合、結果は、無効としてレポートされる。別のチェックでは、融解ピーク（Ｍｅｌｔ　Ｐｅａｋ）蛍光データの最大の絶対値が融解ピーク蛍光データの最少の絶対値よりも大きいかどうかが決定される。これが誤りである場合、結果は、無効としてレポートされる。別のチェックでは、生の蛍光の中央値 対 第１のいくつかの（例えば、５個の）サイクルからの温度値が、生の蛍光の中央値 対 少なくともいくつかの（例えば、５個の）サイクルからの温度値よりも大きいかどうかの決定がされる。これが誤りである場合、結果は、無効としてレポートされる。なお別のチェックでは、二次多項式が、生の蛍光 対 温度データセットに適合される。この適合におけるＲ２が閾値（０．９９）よりも高い場合、ピークは存在せず、結果は、標的が検出されない（ＴＮＤ）としてレポートされる。

【実施例】

【００６６】

図７ａ及び７ｂは、それぞれ、１つの融解ピークの場合の生のデータ曲線及び融解曲線を示す。計算された融解温度はＴｍ＝６７．８である。

【００６７】

図８ａ及び８ｂは、それぞれ、２つの融解ピークの場合の生のデータ曲線及び融解曲線を示す。計算された融解温度は、Ｔｍ１＝５８．８、Ｔｍ２＝６７．８である。

【００６８】

図９ａ及び９ｂは、それぞれ、２つの融解ピークの場合の生のデータ曲線及び融解曲線を示す。計算された融解温度は、Ｔｍ１＝５７．９、Ｔｍ２＝６８．６である。

【００６９】

図１０ａ及び１０ｂは、それぞれ、１つの融解ピーク＋肩の場合の生のデータ曲線及び融解曲線を示す。計算された融解温度は、Ｔｍ１＝６２．４、Ｔｍ２＝６８．８である。

【００７０】

図１１ａ及び１１ｂは、それぞれ、１つの融解ピーク＋肩の場合の生のデータ曲線及び融解曲線を示す。計算された融解温度は、Ｔｍ１＝６１．３、Ｔｍ２＝６８．１である。

【００７１】

ある種の態様では、本発明に従うＴｍ決定プロセスは、従来のパーソナルコンピュータシステムの使用によって実行可能であり、このシステムには、限定されないが、キーボード、マウスなどのデータセットをインプットするためのインプットデバイス；モニターなどの、曲線領域において対象とする特定のポイントを表すための表示デバイス；ＣＰＵなどの、この方法における各工程を実行するために必要な処理デバイス；モデムなどのネットワークインターフェイス、データセットを格納するためのデータ格納デバイス、プロセッサー上で稼働するコンピュータコードなどが含まれる。さらに、プロセッサーもまた、本発明に従うＰＣＲプロセス、又は本発明に従うＰＣＲシステムにおいて実行されてもよい。

【００７２】

微分係数及び肩決定プロセスを含むＴｍ決定プロセスは、コンピュータシステムのプロセッサー上で稼働するコンピュータコードにおいて実行可能であることが承認されなければならない。このコードは、Ｔｍ決定プロセスの種々の局面及び工程を実行するためのプロセッサーを制御する指示を含む。このコードは、典型的には、ハードディスク、ＲＡＭ、又はＣＤ、ＤＶＤなどのポータブル媒体に格納される。同様に、このプロセスは、サーモサイクラーなどのＰＣＲデバイス、又は他の特殊なデバイスにおいて実行されてもよく、それには、プロセッサーに連結された記憶ユニットに格納された指示を実行するプロセッサーが含まれる。このような指示を含むコードは、コード供給源へのネットワーク接続若しくは直接的な接続を介して、又は周知であるポータブル媒体を用いて、デバイス記憶ユニットにダウンロードされてもよい。

【００７３】

当業者は、本発明のＴｍ決定プロセスが、種々のプログラム言語、例えば、Ｃ、Ｃ＋＋、Ｃ＃、Ｆｏｒｔｒａｎ、ＶｉｓｕａｌＢａｓｉｃなど、並びに、データ視覚化及び分析に有用な予めパックされたルーチン、関数及び手法を提供するＭａｔｈｅｍａｔｉｃａ（登録商標）などのアプリケーションを用いてコードされ得ることを承認しなければならない。後者の別の例は、ＭＡＴＬＡＢ（登録商標）である。

【００７４】

本発明に従うシステムの例は、図１２及び１３に示される。図１２は、本発明のプロセス及びシステムを実行するために使用されてもよいソフトウェアとハードウェア供給源との間の関連を説明する一般的なブロック図を示す。図１３に示されるシステムは、サーモサイクラーデバイスに位置されてもよい動的ＰＣＲ分析モジュール、コンピュータシステムの一部である情報モジュールを含む。データセット（ＰＣＲデータセット）は、ネットワーク接続若しくは直接的な接続を介して、分析モジュールから情報モジュール（又はその反対）に転送される。データセットは、例えば、図４、５及び６に示されるフローチャートに従って処理されてもよい。これらのフローチャートは、都合良くは、例えば、図１２に示されるフローチャートに従って、コンピュータシステムのハードウェアに格納されるソフトウェアによって実行されてもよい。図１２を参照すると、コンピュータシステム（４００）は、例えば、ＰＣＲ反応中に得られる蛍光データを受け入れるための受信手段（４１０）、本発明のプロセスに従って該データを処理するための計算手段（４２０）、この計算手段によって得られる結果を適用するための適用手段（４３０）、並びにコンピュータスクリーンに結果を表示するための表示手段（４４０）を含んでもよい。図１３は、サーモサイクラーデバイスとコンピュータシステムとの間の相互作用を例証する。このシステムは、サーモサイクラーデバイスに位置されてもよい動的ＰＣＲ分析モジュール、並びにコンピュータシステムの一部である情報モジュールを含む。データセット（ＰＣＲ

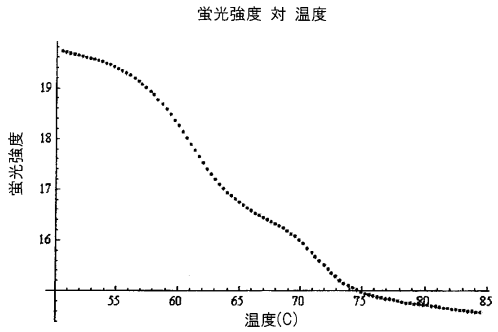
データセット）は、ネットワーク接続若しくは直接的な接続を介して、分析モジュールから情報モジュール（又はその反対）に転送される。データセットは、図１２に従って、プロセッサー上で稼働するコンピュータコードによって処理され、情報モジュールの格納デバイスに格納されてもよく、処理後、分析モジュールの格納デバイスに戻されてもよい。この場合、修正されたデータは、表示デバイス上に表示可能である。

【００７５】

本発明は、例示の目的で、特定の態様に関して記載されているが、本発明は、開示された態様に限定されないことを理解しなければならない。これとは反対に、当業者に明らかとなるように、種々の変更及び類似の処置を覆うことが意図される。

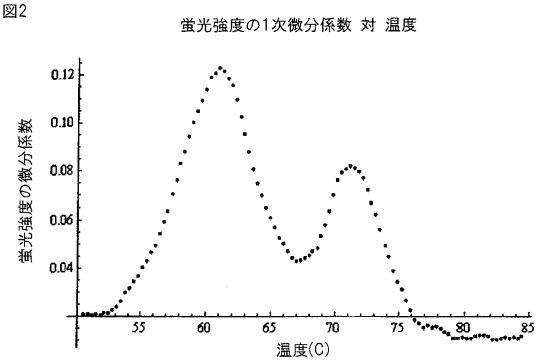
【図１】

図1



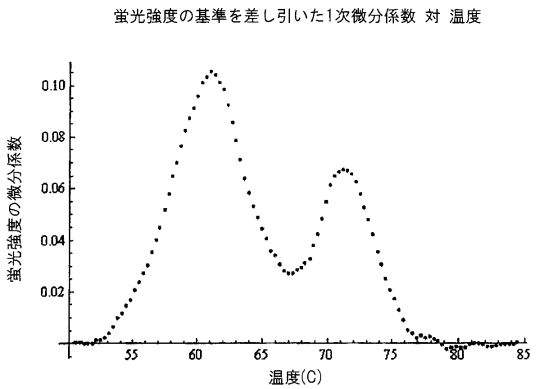
【図２】

図2



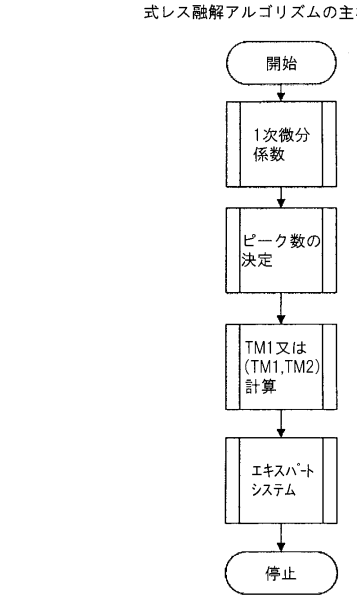
【図３】

図3



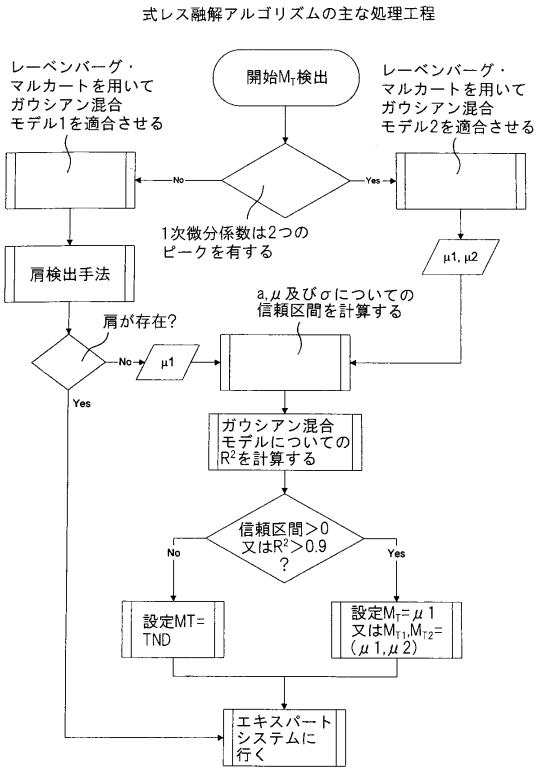
【図４】

図4



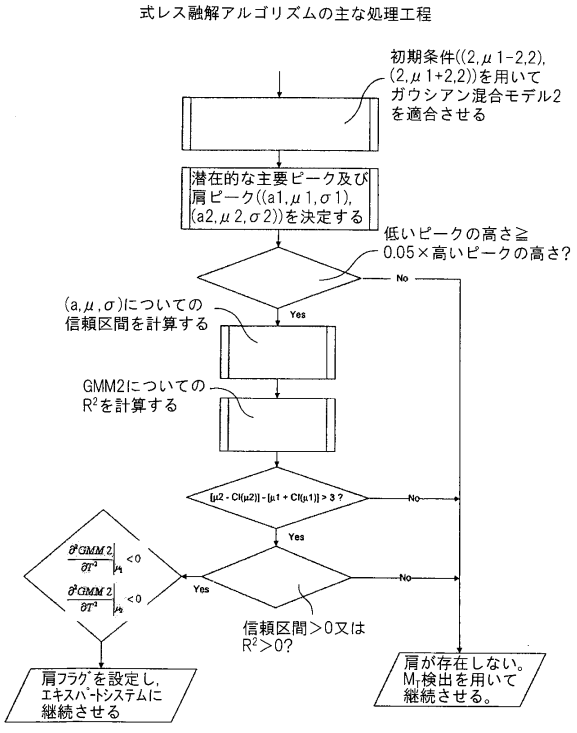
【図５】

図5



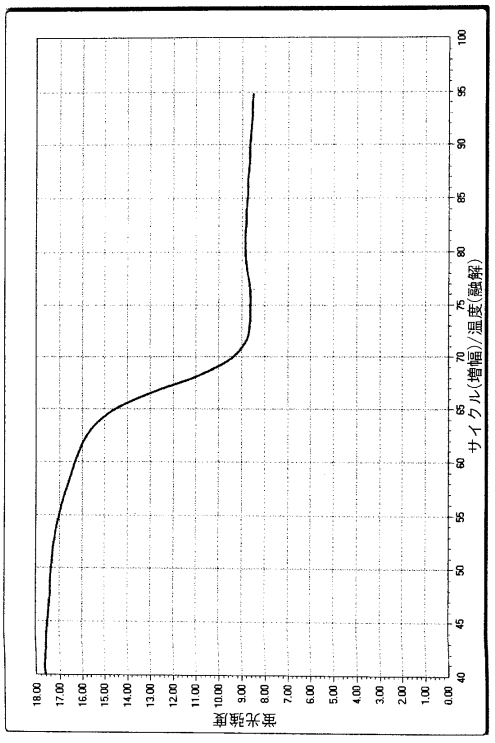
【図６】

図6



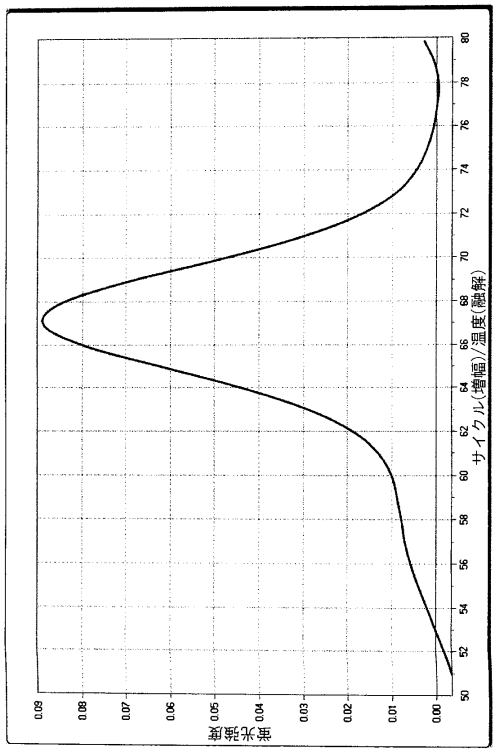
【図７ａ】

図7a



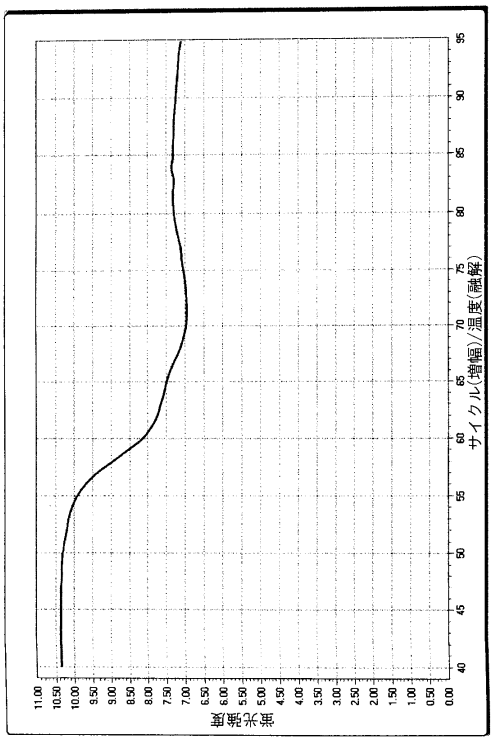
【図７ｂ】

図7b



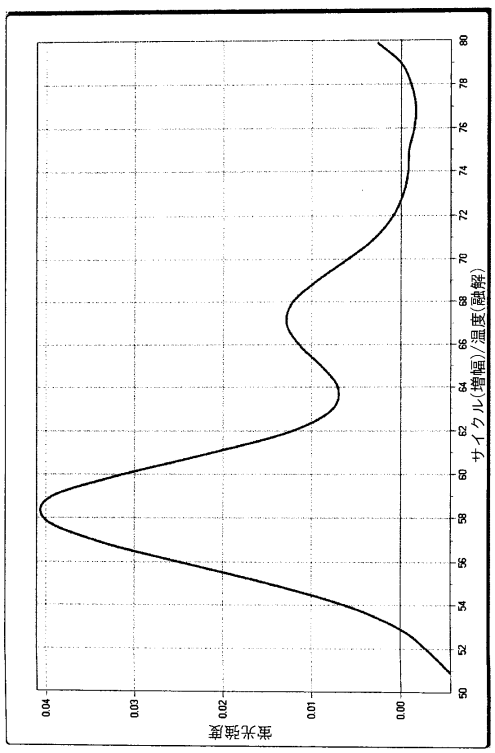
【図８ａ】

図8a



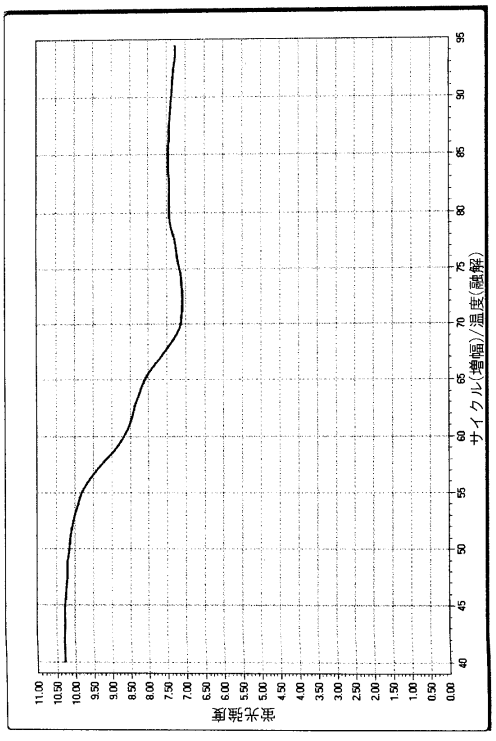
【図８ｂ】

図8b



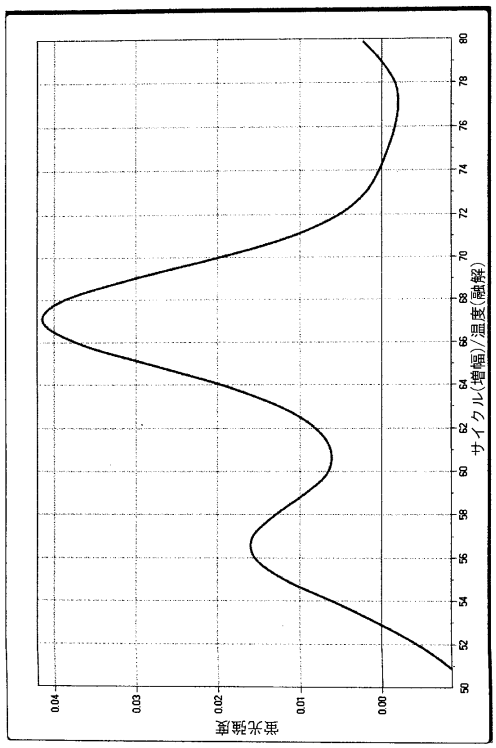
【図９ａ】

図9a



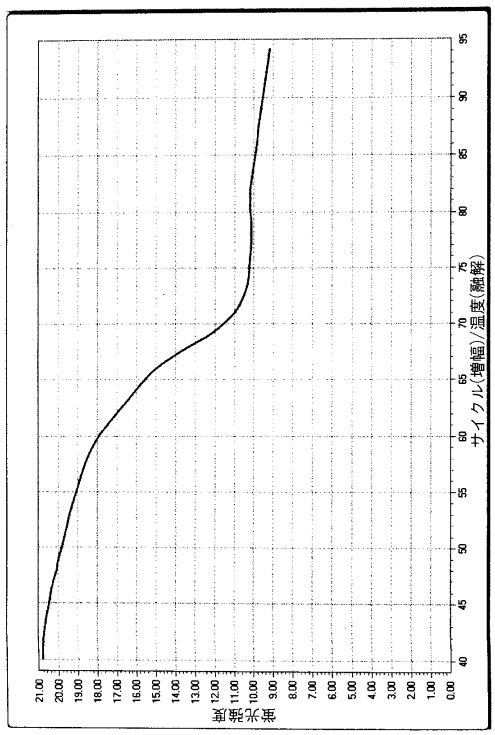
【図９ｂ】

図9b



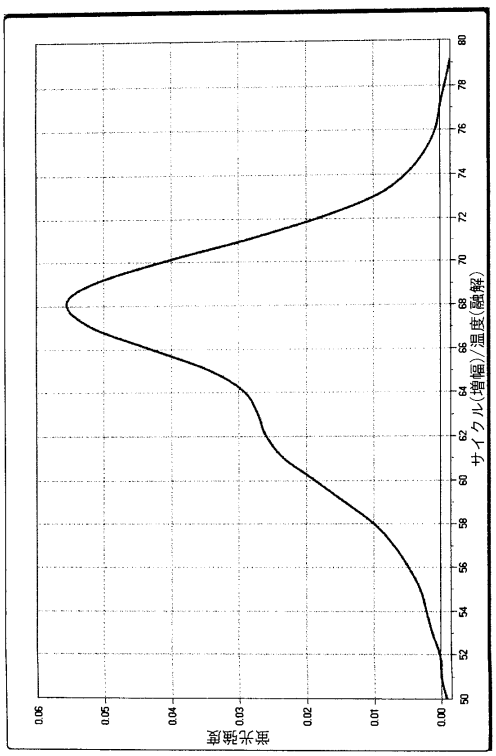
【図１０ａ】

図10a



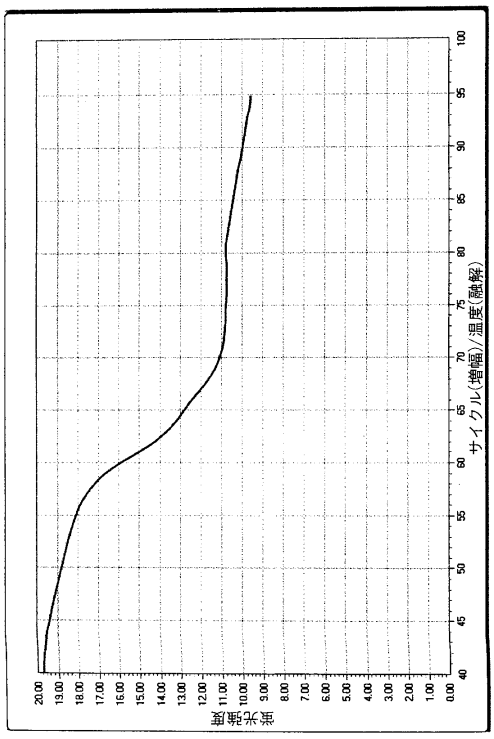
【図１０ｂ】

図10b



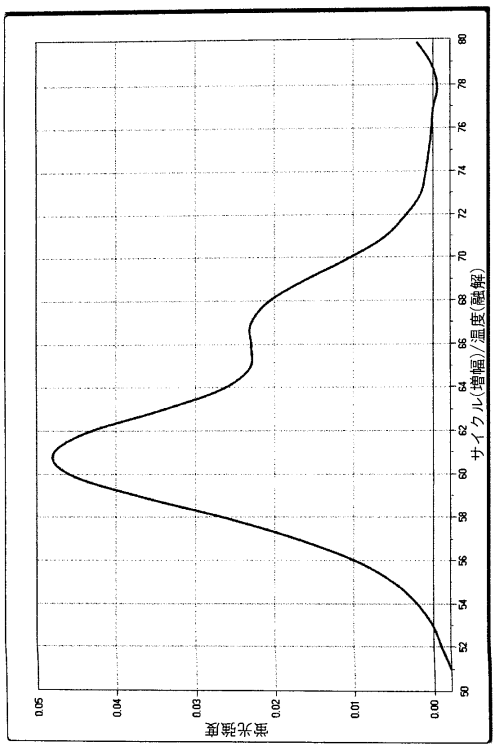
【図１１ａ】

図11a



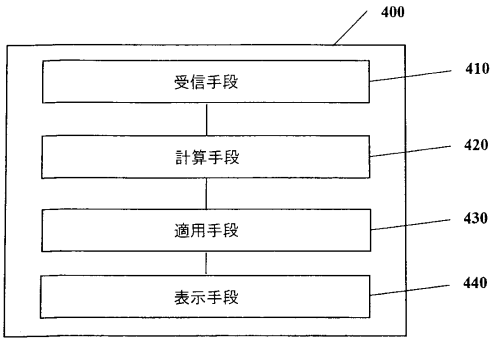
【図１１ｂ】

図11b



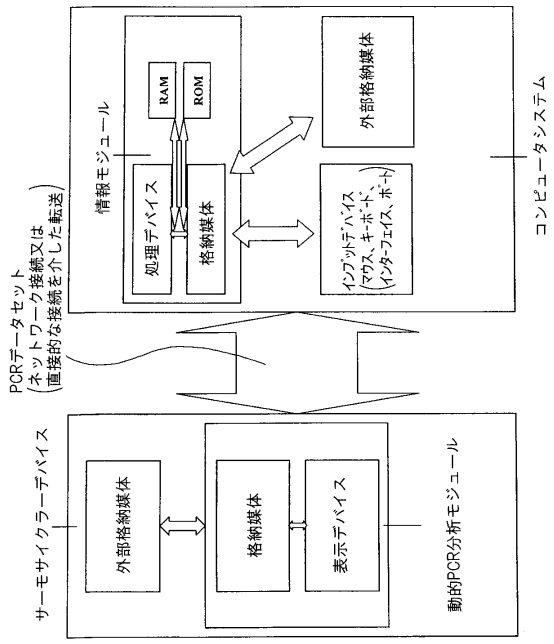
【図１２】

図12



【図１３】

図13



フロントページの続き

(74)代理人 100108903
弁理士 中村 和広
(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
(72)発明者 ロナルド ティー. カーニク
アメリカ合衆国, カリフォルニア ９４４０４, フォスター シティ, ハドック ストリート ９６１

審査官 松野 広一

(56)参考文献 国際公開第２００７／１０５６７３（WO, Ａ1）
特表２００８－５１０６９８（ＪＰ, Ａ）
国際公開第２００７／０３５８０６（WO, Ａ2）
国際公開第２００７／０６４９６４（WO, Ａ2）
特開２００２－０８８１４３（ＪＰ, Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｇ０６Ｆ １９／１０－１９／２８
Ｃ１２Ｍ １／００
Ｃ１２Ｎ １５／０９