(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101782940 B
(45)授权公告日 2014.06.11

(21)申请号 200910207618.4
(22)申请日 2009.10.16
(30)优先权数据
12/253676 2008.10.17 US
(73)专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司
地址 瑞士巴塞尔
(72)发明人 R·T·克尼克
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 朱海煜 王忠忠
(51)Int.Cl.
G06F 19/00(2011.01)
C12M 1/40(2006.01)
(56)对比文件
US 2008/0193934 A1,2008.08.14, 全文.

审查员 沈乐平

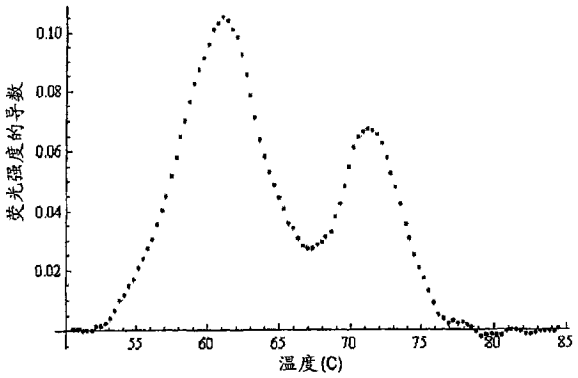
权利要求书3页 说明书11页 附图12页

(54)发明名称

通过无公式方法确定熔融温度

(57)摘要

本发明名称为通过无公式方法确定熔融温度。进行熔融曲线数据集的一阶导数的数值确定。对于一阶导数值确定基线,并且从一阶导数值减去基线以产生修正的一阶导数值。确定修正的一阶导数值的第一最大值,并且所述第一最大值表示DNA样本的熔融温度Tm。例如高斯混合模型(GMM)函数等具有使用列文伯格-马夸尔特(LM)回归过程所确定的参数的模型函数也可用于查找对一阶导数曲线的近似。数值确定的一阶导数值的最大值用作模型函数的参数的初始条件。所确定参数提供一个或多个分步熔融温度值,它们可被返回,例如被显示或者以其它方式使用,供进一步处理。



减去基线的荧光强度一阶导数对温度

CN 101782940 B

1. 一种确定 DNA 的熔融温度 Tm 的计算机实现方法，所述方法包括：

- 接收表示 DNA 样本的熔融曲线的数据集，所述数据集包括各具有一对坐标值的多个数据点；

- 数值确定所述熔融曲线的数据点的一阶导数值；

- 确定所述一阶导数值的基线；

- 从所述一阶导数值减去所述基线，以产生修正的一阶导数值；

- 确定所述修正的一阶导数值的第一最大值；以及

- 输出所述第一最大值，其中所述第一最大值表示 DNA 样本的熔融温度 Tm。

2. 如权利要求 1 所述的方法，还包括以下步骤：

- 通过对高斯混合模型函数应用列文伯格 - 马夸尔特 (LM) 回归过程以确定所述函数的一个或多个参数来计算拟合所述修正的一阶导数值的曲线的近似，其中所述参数包括初始条件，并且其中所述第一最大值用作第一参数的初始条件；以及

- 输出所述第一参数，其中所述第一参数表示 DNA 样本的第一熔融温度 Tm1。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中，所述高斯混合模型包括如下形式的表达：

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

其中，μ_1 是所述第一参数，以及其中 α_1 和 σ_1 是附加参数。

4. 如权利要求 1 所述的方法，进一步包括：确定所述一阶导数值是否包括最接近所述第一最大值的台肩值。

5. 如权利要求 2 所述的方法，进一步包括：显示所述第一参数值。

6. 如权利要求 2 所述的方法，进一步包括以下步骤：

- 确定所述修正的一阶导数值的第二、第三或第四最大值，其中所述第二、第三或第四最大值用作第二、第三或第四参数的初始条件；以及

- 输出所述第二、第三或第四参数，其中所确定的第二、第三或第四参数表示 DNA 样本的第二、第三或第四熔融温度 Tm2、Tm3 或 Tm4。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其中，所述高斯混合模型包括如下形式的表达：

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

其中，μ_1 是所述第一参数，μ_2 是所述第二参数，以及其中 α_1、σ_1、α_2 和 σ_2 是附加参数。

8. 如权利要求 6 所述的方法，其中，所述高斯混合模型包括如下形式的表达：

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

其中，μ_1 是所述第一参数，μ_2 是所述第二参数，μ_3 是所述第三参数，以及其中 α_1、σ_1、α_2、σ_2、α_3 和 σ_3 是附加参数。

9. 如权利要求 6 所述的方法，其中，所述高斯混合模型包括如下形式的表达：

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

其中，μ_1 是所述第一参数，μ_2 是所述第二参数，μ_3 是所述第三参数，μ_4 是所述第四参数，以及其中 α_1、σ_1、α_2、σ_2、α_3、σ_3、α_4 和 σ_4 是附加参数。

10. 一种用于确定 DNA 的熔融温度 Tm 的设备，所述设备包括：

- 用于接收表示 DNA 样本的熔融曲线的数据集的部件，所述数据集包括各具有一对坐标值的多个数据点；

- 用于数值确定所述熔融曲线的数据点的一阶导数值的部件；

- 用于确定所述一阶导数值的基线的部件；

- 用于从所述一阶导数值减去所述基线以产生修正的一阶导数值的部件；

- 用于确定所述修正的一阶导数值的第一最大值的部件；以及

- 用于输出所述第一最大值的部件，其中所述第一最大值表示 DNA 样本的熔融温度 Tm。

11. 如权利要求 10 所述的设备，其中，所述设备还包括：

- 用于通过对高斯混合模型函数应用列文伯格 - 马夸尔特 (LM) 回归过程以确定所述函数的一个或多个参数来计算拟合所述修正的一阶导数值的曲线的近似的部件，其中所述参数包括初始条件，并且其中所述第一最大值用作第一参数的初始条件；以及

- 用于输出所述第一参数的部件，其中所述第一参数表示 DNA 样本的第一熔融温度 Tm1。

12. 一种动力聚合酶链反应 PCR 系统，包括：

- 生成表示 DNA 熔融曲线的熔融曲线数据集的动力 PCR 分析模块，所述数据集包括各具有一对坐标值的多个数据点；以及

- 智能模块，适合于通过以下来处理熔融曲线数据集以确定熔融温度 Tm 的值：

- 接收表示 DNA 样本的熔融曲线的数据集，所述数据集包括各具有一对坐标值的多个数据点；

- 数值确定所述熔融曲线的数据点的一阶导数值；

- 确定所述一阶导数值的基线；

- 从所述一阶导数值减去所述基线，以产生修正的一阶导数值；

- 确定所述修正的一阶导数值的第一最大值；以及

- 输出所述第一最大值，其中所述第一最大值表示 DNA 样本的熔融温度 Tm。

13. 如权利要求 12 所述的系统，其中，所述动力 PCR 分析模块驻留在动力热循环装置中，以及其中所述智能模块包括通信耦合到所述动力 PCR 分析模块的处理器或者其中所述智能模块包括驻留在计算机系统中的处理器，所述计算机系统通过网络连接或直接连接其中之一耦合到所述动力 PCR 分析模块。

14. 如权利要求 12 所述的系统，还包括：显示模块，其中输出包括在所述显示模块上显示所述熔融温度 Tm 的值。

15. 如权利要求 12 所述的系统，其中，所述智能模块还适合于通过下述内容来处理熔融曲线的数据集以便确定熔融温度 Tm 的值：

- 通过对高斯混合模型函数应用列文伯格 - 马夸尔特 (LM) 回归过程以确定所述函数的一个或多个参数来计算拟合所述修正的一阶导数值的曲线的近似，其中所述参数包括初始条件，并且其中所述第一最大值用作第一参数的初始条件；以及

- 输出所述第一参数，其中所述第一参数表示 DNA 样本的第一熔融温度 Tm1。

通过无公式方法确定熔融温度

技术领域

[0001] 一般来说，本发明涉及处理表示寡核苷酸的熔融特性的数据，更具体来说，涉及用于根据熔融曲线数据来确定寡核苷酸样本的一个或多个熔融温度的系统和方法。

背景技术

[0002] 通常在PCR实验之后直接执行的DNA熔融温度的确定是区分基因型的一个重要方法。例如，文献中近来论述的是将检查KRAS基因用于确定哪些患者可能是非小细胞肺癌的治疗的候选者。其KRAS基因属于野生型的患者会获益于该治疗，而如果患者具有这种基因的突变型变异，则治疗没有有益效果。由于这些治疗往往具有较大副作用，所以确定患者的正确基因型是非常重要的。熔融KRAS化验的使用可帮助区分患者的基因型。因此，希望提供准确有效地确定DNA样本的熔融温度的系统和方法。

发明内容

[0003] 本发明提供用于根据熔融曲线数据来确定寡核苷酸的熔融温度Tm的系统和方法。在各个实施例中，进行熔融曲线数据集的一阶导数的数值确定。例如高斯混合模型(GMM)函数等具有使用列文伯格－马夸尔特(Levenberg-Marquardt)(LM)回归过程所确定的参数的模型函数用于查找一阶导数曲线的近似。数值确定的一阶导数值的最大值用作模型函数的参数的初始条件。所确定参数提供分步熔融温度值，它们可被返回，例如被显示或者以其它方式使用，供进一步处理。

[0004] 根据本发明的一个方面，提供一种确定DNA的熔融温度Tm的计算机实现方法。该方法通常包括接收表示DNA样本的熔融曲线的数据集，数据集包括各具有一对坐标值的多个数据点。该方法通常还包括：数值确定熔融曲线的数据点的一阶导数值；确定一阶导数值的基线；从一阶导数值减去基线以产生修正的一阶导数值；以及确定修正的一阶导数值的第一最大值。该方法通常还包括输出所述最大值，其中所述第一最大值表示DNA样本的熔融温度Tm。该方法还包括以下步骤：通过对高斯混合模型函数应用列文伯格－马夸尔特(LM)回归过程以确定函数的一个或多个参数来计算拟合修正的一阶导数值的曲线的近似，其中所述参数包括初始条件，并且第一最大值用作第一参数的初始条件；以及输出第一参数，其中所确定的第一参数表示DNA样本的熔合温度Tm。在某些方面，该方法还包括确定一阶导数值是否包括最接近第一最大值的台肩值。在某些实施例中，高斯混合模型包括如下形式的表达：

[0005] $$GMM_1 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)$$

[0006] 其中，μ_1是第一参数，以及α_1和σ_1是附加参数。在另一个方面，该方法进一步包括显示第一参数值。在又另一个方面，回归过程包括列文伯格－马夸尔特(LM)回归过程。在某些方面，该方法进一步包括以下步骤：确定修正的一阶导数值的第二、第三或第四最大

值，其中第二、第三或第四最大值用作第二、第三或第四参数的初始条件；以及输出第二、第三或第四参数，其中所确定的第二、第三或第四参数表示 DNA 样本的第二、第三或第四熔融温度 Tm2、Tm3 或 Tm4。在该方法的另一个方面，高斯混合模型包括如下形式的表达：

[0007] $$GMM_2 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)+Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right)$$

[0008] 其中，μ_1 是第一参数，μ_2 是第二参数，以及 α_1、σ_1、α_2 和 σ_2 是附加参数。在该方法的又另一个方面，高斯混合模型包括如下形式的表达：

[0009] $$GMM_3 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)+Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right)+$$

[0010] $$Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right)$$

[0011] 其中，μ_1 是第一参数，μ_2 是第二参数，μ_3 是第三参数，以及 α_1、σ_1、α_2、σ_2、α_3 和 σ_3 是附加参数。在该方法的又另一个方面，高斯混合模型包括如下形式的表达：

[0012] $$GMM_4 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)+Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right)+$$

[0013] $$Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right)+Exp(-a_4)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_4}{\sigma_4}\right)^2\right)$$

[0014] 其中，μ_1 是第一参数，μ_2 是第二参数，μ_3 是第三参数，μ_4 是第四参数，以及 α_1、σ_1、α_2、σ_2、α_3、σ_3、α_4 和 σ_4 是附加参数。在该方法的另一个方面，确定第一最大值包括对修正的一阶导数值应用加窗过程 (windowing process)，其中加窗过程还确定高斯混合模型函数参数的一个或多个附加初始条件。

[0015] 根据本发明的另一个方面，提供一种计算机可读介质，它存储用于控制处理器来确定 DNA 的熔融温度 Tm 的代码。该所存储代码通常包括指令以用于：接收表示 DNA 样本的熔融曲线的数据集，该数据集包括各具有一对坐标值的多个数据点；数值确定熔融曲线的数据点的一阶导数值；确定一阶导数值的基线；从一阶导数值减去基线以产生修正的一阶导数值；以及确定修正的一阶导数值的第一最大值。该代码通常还包括用于输出第一最大值的指令，其中所述第一最大值 表示 DNA 样本的熔融温度 Tm。该代码通常还包括指令以用于：通过对高斯混合模型函数应用列文伯格－马夸尔特 (LM) 回归过程以确定函数的一个或多个参数来计算拟合修正的一阶导数值的曲线的近似，其中所述参数包括初始条件，并且第一最大值用作第一参数的初始条件；以及输出第一参数，其中所确定的第一参数表示 DNA 样本的熔融温度 Tm。本文中，在某些方面，高斯混合模型包括如下形式的表达：

[0016] $$GMM_1 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)$$

[0017] 其中，μ_1 是第一参数，α_1 和 σ_1 是附加参数。在某些方面，该代码进一步包括用

于确定一阶导数值是否包括最接近第一最大值的台肩值的指令。在另一个方面，该代码进一步包括用于显示第一参数值的指令。在又另一个方面，该代码进一步包括指令以用于：确定修正的一阶导数值的第二最大值，其中第二最大值用作第二参数的初始条件；以及输出第二参数，其中所确定的第二参数表示 DNA 样本的第二熔融温度 Tm2。在某些方面，高斯混合模型包括如下形式的表达：

[0018] $$GMM_2 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)+Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right)$$

[0019] 其中，μ_1 是第一参数，μ_1 是第二参数，以及 α_1、σ_1、α_2 和 σ_2 是附加参数。在又另一个方面，高斯混合模型包括如下形式的表达：

[0020] $$GMM_3 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)+Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right)+$$

[0021] $$Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right)$$

[0022] 其中，μ_1 是第一参数，μ_2 是第二参数，μ_3 是第三参数，以及 α_1、σ_1、α_2、σ_2、α_3 和 σ_3 是附加参数。在又另一个方面，高斯混合模型包括如下形式的表达：

[0023] $$GMM_4 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)+Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right)+$$

[0024] $$Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right)+Exp(-a_4)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_4}{\sigma_4}\right)^2\right)$$

[0025] 其中，μ_1 是第一参数，μ_2 是第二参数，μ_3 是第三参数，μ_4 是第四参数，以及 α_1、σ_1、α_2、σ_2、α_3、σ_3、α_4 和 σ_4 是附加参数。在计算机可读介质的另一个方面，用于确定第一最大值的指令包括用于对修正的一阶导数值应用加窗过程的指令，其中加窗过程还确定高斯混合模型函数参数的一个或多个附加初始条件。

[0026] 根据本发明的又一个方面，提供一种动力聚合酶链反应 (PCR) 系统，它通常包括：生成表示 DNA 熔融曲线的熔融曲线数据集的动力 PCR 分析模块，该数据集包括各具有一对坐标值的多个数据点；以及适合于处理熔融曲线数据集以确定 Tm 值的智能模块。智能模块通常通过以下来确定 Tm 值：数值确定熔融曲线的数据点的一阶导数值；确定一阶导数值的基线；从一阶导数值减去基线以产生修正的一阶导数值；以及确定修正的一阶导数值的第一最大值。智能模块通常还通过将修正的一阶导数的所确定第一最大值用作 Tm 值并输出所述 Tm 值来确定 Tm 值。在某些方面，智能模块通过以下来确定 Tm 值：通过对高斯混合模型函数应用列文伯格 - 马夸尔特 (LM) 回归过程以确定函数的一个或多个参数来计算拟合修正的一阶导数值的曲线的近似，其中所述参数包括初始条件，并且第一最大值用作第一参数的初始条件；以及输出第一参数，其中所确定的第一参数表示 DNA 样本的熔合温度 Tm。在某些方面，高斯混合模型包括如下形式的表达：

[0027] $$GMM_1 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right)$$

[0028] 其中，μ_1 是第一参数，以及 α_1 和 σ_1 是附加参数。在另一个方面，智能模块进一步适合于确定一阶导数值是否包括最接近第一最大值的台肩值。在又另一个方面，智能模块进一步适合于：确定修正的一阶导数值的第二最大值，其中第二最大值用作第二参数的初始条件；以及输出第二参数，其中所确定的第二参数表示 DNA 样本的第二熔融温度 Tm2。在某些方面，确定修正的一阶导数值的第二最大值，其中第二最大值用作第二参数的初始条件，以及高斯混合模型包括如下形式的表达：

[0029] $$GMM_2 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right)$$

[0030] 其中，μ_1 是第一参数，μ_2 是第二参数，以及 α_1、σ_1、α_2 和 σ_2 是附加参数。在某些方面，确定修正的一阶导数值的第三最大值，其中第三最大值用作第三参数的初始条件，以及高斯混合模型包括如下形式的表达：

[0031] $$GMM_3 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right) +$$

[0032] $$Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right)$$

[0033] 其中，μ_1 是第一参数，μ_2 是第二参数，μ_3 是第三参数，以及 α_1、σ_1、α_2、σ_2、α_3 和 σ_3 是附加参数。在某些方面，确定修正的一阶导数值的第四最大值，其中第四最大值用作第四参数的初始条件，以及高斯混合模型包括如下形式的表达：

[0034] $$GMM_4 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right) +$$

[0035] $$Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right) + Exp(-a_4)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_4}{\sigma_4}\right)^2\right)$$

[0036] 其中，μ_1 是第一参数，μ_2 是第二参数，μ_3 是第三参数，μ_4 是第四参数，以及 α_1、σ_1、α_2、σ_2、α_3、σ_3、α_4 和 σ_4 是附加参数。在该系统的另一个方面，智能模块通过对修正的一阶导数值应用加窗过程来确定第一最大值，其中加窗过程还确定高斯混合模型函数参数的一个或多个附加初始条件。

[0037] 参照说明书的其余部分、包括附图和权利要求将会了解本发明的其它特征和优点。下面针对附图详细描述本发明的其它特征和优点以及本发明的各个实施例的结构和操作。图中，相似的参考标号表示相同或功能上相似的元件。

[0038] 附图说明

[0039] 图 1 图示熔融曲线的一个示例（荧光强度对温度）。

[0040] 图 2 图示图 1 的熔融曲线的一阶导数曲线（荧光强度的一阶导数对温度）。

[0041] 图 3 示出基线减法之后的图 2 的导数曲线（减去基线的荧光强度一阶导数对温度）。

[0042] 图 4 图示根据一个实施例、用于确定熔融温度的过程（无公式熔融算法的主要处理步骤）。

[0043] 图 5 图示根据一个实施例的熔融温度计算过程（无公式熔融算法的主要处理步骤）。

[0044] 图 6 图示根据一个实施例的台肩检测过程（无公式熔融算法的主要处理步骤）。

[0045] 图 7a 和图 7b 分别示出单个熔融峰值的情况下的原始数据曲线和熔融曲线的示例。

[0046] 图 8a 和图 8b 分别示出两个熔融峰值的情况下的原始数据曲线和熔融曲线的示例。

[0047] 图 9a 和图 9b 分别示出两个熔融峰值的情况下的原始数据曲线和熔融曲线的示例。

[0048] 图 10a 和图 10b 分别示出单个熔融峰值加上台肩的情况下的原始数据曲线和熔融曲线的示例。

[0049] 图 11a 和图 11b 分别示出单个熔融峰值加上台肩的情况下的原始数据曲线和熔融曲线的示例。

[0050] 图 12 示出说明可用于实现本发明的过程和系统的软件与硬件资源之间的关系的总体框图。

[0051] 图 13 图示热循环装置与计算机系统之间的交互。

具体实施方式

[0052] 本发明提供用于确定 DNA 的熔融温度 Tm 的系统和方法。

[0053] 本发明提供用于通过分析表示熔融曲线的数据来确定熔融温度的系统和方法。在某些方面，进行熔融曲线数据集的一阶导数的数值确定。具有使用列文伯格 - 马夸尔特 (LM) 回归过程所确定的参数的高斯混合模型 (GMM) 函数用于查找对一阶导数曲线的近似。数值确定的一阶导数值的最大值用作 GMM 函数的参数的初始条件。所确定的参数提供分步熔融 (fractional melting) 温度 Tm 值。然后 Tm 值被返回，并且可显示或者以其它方式使用，供进一步处理。

[0054] PCR 过程的上下文中的熔融曲线的一个示例如图 1 所示。如图 1 所示，典型熔融曲线的数据可在二维坐标系中来表示，例如其中温度定义 x 轴，而累积多核苷酸的指标定义 y 轴。通常，累积多核苷酸的指标是荧光强度值 (fluorescent intensity value)，因为荧光标记的使用也许是最广泛使用的加标方案。但是应当理解，根据所使用的特定加标和 / 或检测方案，可使用其它指标。累积信号的其它有用指标的示例包括发光强度、化学发光强度、生物发光强度、磷光强度、电荷转移、电压、电流、功率、能量、温度、粘度、光散射、辐射强度、反射率、透射率和吸收率。

[0055] 一般过程概述

[0056] 考虑图 1 所示的典型熔融曲线。希望从图 1 所示的数据获得一个或多个熔融温度。根据一个实施例，可参照图 4 简要地描述用于确定熔融温度的过程 100。在步骤 110，接收

或者以其它方式获取表示熔融曲线的实验数据集。绘制的熔融曲线数据集的一个示例如图1所示，其中y轴和x轴分别表示熔融曲线的荧光强度和温度。在某些方面，数据集应当包括连续的并且沿轴等距间隔的数据。

[0057] 在过程100在驻留在例如热循环器等PCR装置中的智能模块（例如运行指令的处理器）中来实现的情况下，数据集可在收集数据时实时地提供给智能模块，或者可存储在存储器单元或缓冲器中并且在完成实验之后提供给智能模块。类似地，数据集可经由网络连接（例如LAN、VPN、内联网、因特网等）或者与获取装置的直接连接（例如USB或其它直接有线或无线连接）提供给例如台式计算机系统或其它计算机系统等独立系统，或者在例如CD、DVD、软盘等便携介质上提供。在某些方面，数据集包括具有一对坐标值（或2维向量）的数据点。对于熔融数据，坐标值对通常表示温度和荧光强度值。在步骤110已经接收或者获取数据集之后，可分析数据集以确定熔融温度。

[0058] 在步骤120，数据经数值处理以确定导数值。这些曲线的熔融温度通过查找与荧光强度相对于温度的一阶导数（y轴）的最大值对应的（分步）温度值（x轴）来获得。使用图1所示的数据，一阶导数的对应曲线图如图2所示。在一个实施例中，对导数曲线数据执行基线减法，以便产生修正的导数数据。在一个实施例中，基线减法通过以下来执行：首先将“MedianLeft”定义为图2中的前五个点的荧光值的中值，然后将“MedianRight”定义为图2中的后五个点的荧光值的中值。然后定义连接图2中的“MedianLeft”点(x，y)与“MedianRight”点(x,y)的直线。然后从所有坐标对减去这个直线的斜率(slope)和截距。图3示出基线减法之后的导数曲线。

[0059] 在一个实施例中，导数通过使用Savitzky-Golay(SG)方法来获得。[参见A.Savitzky和Marcel J.E.Golay(1964)，Smoothing andDifferentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures(通过简化最小平方过程的数据的平滑和差分)，Analytical Chemistry,36:1627-1639，以及Press,W.H.等人，“Numerical Recipes in C，2nd Ed.(C的数值方法，第2版)”，Savitzky-Golay平滑滤波器，14.8小节，650-655。]。在一个实施例中，SG-2-2-2配置（意思是左侧两个点、右侧两个点和二次多项式）用于计算原始熔融数据曲线的一阶导数。一般来说，可使用SG方法的其它配置，例如SG-1-1-2至SG-50-50-2。更一般来说，可使用SG-x-y-z，其中x和y是从1至50的数，而z是从1至5的数。

[0060] 导数的标量不变形式

[0061] 在某些实施例中，备选方法用于计算导数，以便允许熔融温度是标量不变的。标量不变意味着，如果荧光值与常数相乘，则所得Tm值未改变。

[0062] 根据一种方法，在计算导数熔融曲线之前将荧光值除以平均荧光值，例如，y替换为：

[0063] y/y_{mean}，其中 $y_{mean}=\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}y_i$ (1)

[0064] 根据另一种方法，在计算导数熔融温度之前将荧光值除以（最大荧光-最小荧光）。

[0065] 根据另一种方法，在计算熔融温度之前将荧光值的导数除以荧光值。

[0066] 根据又另一种方法，在计算熔融温度之前将荧光值的导数除以荧光值的平均导

数。

[0067] 根据又另一种方法，在计算熔融温度之前将荧光值的导数除以荧光值的（最大值－最小值）导数。

[0068] 回到图 4，在步骤 130，确定一阶导数数据中的多个峰值。在一个实施例中，局部最大化过程用于确定一阶导数中的零、一个、两个、三个或四个峰值，下面更详细地论述。可使用原始导数数据，或者可使用减去基线的导数数据。

[0069] 在一个实施例中，在步骤 140 确定分步 Tm 值。为了查找曲线的最大值，例如图 2 或图 3 所示，在一个实施例中，将高斯混合模型拟合到数据。高斯混合模型的平均值对应于最大值，因此对应于 Tm 值。在一个实施例中，曲线拟合通过以下来进行：计算拟合所确定一阶导数值或修改（减去基线的）导数值的曲线的近似，对高斯混合模型函数应用回归过程以确定函数的一个或多个参数。在某些方面，使用列文伯格－马夸尔特回归过程。在一个实施例中，对于单峰值的情况，使用对于一个峰值的高斯混合模型，如公式 (2) 所示。如果存在两个峰值，则使用对于两个峰值的高斯混合模型，如公式 (3) 所示。如果存在三个峰值，则可使用对于三个峰值的高斯混合模型，如公式 (4) 所示。如果存在四个峰值，则可使用对于四个峰值的高斯混合模型，如公式 (5) 所示。系数的 μ_1 或（μ_1，μ_2）的回归值分别对应于对于一个和两个峰值的 Tm 值。在一个实施例中使用高斯混合模型，而不是取附加导数来查找最大值，因为更高阶导数 (3 阶或 4 阶）可变得不稳定。

[0070] $$GMM_1 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) \quad (2)$$

[0071] $$GMM_2 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right) \quad (3)$$

[0072] $$GMM_3 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right) + \quad (4)$$

[0073] $$Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right)$$

[0074] $$GMM_4 = Exp(-a_1)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_1}{\sigma_1}\right)^2\right) + Exp(-a_2)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_2}{\sigma_2}\right)^2\right) + \quad (5)$$

[0075] $$Exp(-a_3)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_3}{\sigma_3}\right)^2\right) + Exp(-a_4)\cdot Exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_4}{\sigma_4}\right)^2\right)$$

[0076] 应当理解，其它模型／函数可用于代替高斯混合模型，这是本领域的技术人员显而易见的。其它模型的示例包括 Beta、Binomial、Cauchy、Chi、ChiSquare、Exponential、Extreme Value、FRatio、Gamma、Gumbel、Laplace、Logistic、Maxwell、Pareto、Rayleight、StudentT 和 Weibull 模型。

[0077] 大家要理解，对于包含两个以上峰值的一阶导数数据，上述实施例适用。在这种情况下，通过局部最大值的系数 μ_1、μ_2、μ_3、μ_4 的初始估计（回归值）对应于最终熔融温度。

[0078] 在一个实施例中，列文伯格－马夸尔特 (LM) 方法用于曲线拟合公式 (2)（或者公式 (3)、公式 (4)、公式 (5)）。这种方法的细节可见于参考文献 [Moré, JJ.,“Levenberg-Marquardt Algorithm, Implementation andtheory（列文伯格－马夸尔特算法、实现和理论）”,Numerical Analysis,ed.Watson,G.A.Lecture Notes in Mathematics 630,Springer-Verlag,1977]。应当理解，可使用其它众所周知的回归方法。一般来说，LM 回归方法包括需要各种输入并且提供输出的算法。在一个方面，该输入包括待处理的数据集、用于拟合数据的函数（例如高斯混合模型）以及函数的参数或变量的初始猜测。该输出包括使函数与数据集之间的距离的平方之和为最小的该函数的一组一个或多个参数。应当理解，可使用其它回归过程，这是本领域的技术人员显而易见的。

[0079] 列文伯格－马夸尔特方法的一个特征在于，它在执行回归之前需要参数值的良好估计。对于参数 α_1（或 α_1，α_2，α_3，α_4）和 σ_1（或 σ_1，σ_2，σ_3，σ_4），初始条件在所有情况下可设置成等于常数（例如 1 或 2）。这 些参数一般不是敏感的，并且一般将收敛而不管所使用的初始条件。参数 μ_1（或 μ_1，μ_2，μ_3，μ_4）可需要应当对各曲线确定的更准确初始条件。在一个实施例中，加窗方法用于计算参数 μ_1（或 μ_1，μ_2，μ_3，μ_4）的初始条件，下面更详细地描述。

[0080] 在可选步骤 150，执行一个或多个专家系统校验，以便评估结果是否有效，下面更详细地论述。例如，如果经过实现，则专家系统校验可确定所确定结果是无效的。

[0081] 在步骤 160，返回 Tm 值，例如供显示或者进一步处理。图形显示可采用与执行图 4 的分析的系统耦合的例如监视器屏幕或打印机等显示装置来呈现，或者数据可提供给独立系统以便在显示装置上呈现。

[0082] 在一些实施例中，对于 GMM_1、GMM_2、GMM_3 和 GMM_4 参数计算 R^2 统计和 / 或置信（例如 95％置信）区间。这些值评估曲线拟合的质量，并且可在专家系统（下面进行描述）中用于帮助确定所计算 Tm 值是有效、无效还是零（不存在样本）。这些值还可在步骤 160 显示。

[0083] 曲线的最大值的确定

[0084] 在一个实施例中，对数据集使用加窗过程以用于确定参数 μ_1、μ_2、μ_3、μ_4 的初始条件。对于包含总共两个峰值的一阶导数描述以下加窗过程。然而，如上所述，大家要理解，这个加窗过程可适用于提供总共四个峰值的一阶导数。在一个实施例中，加窗过程通过使用以下过程来搜索潜在局部最大值：

[0085] 1. 在第一点开始，检查数据集的前数个（五个）点（点 1-5）。

[0086] 2. 如果中间 y 点不是这五个点中的最大值，则在这五个点中不存在潜在最大值。如果中间 y 点是这五个点的最大值，并且具有大于 0 的值（以避免将较长序列的点中具有准确值 0 的中点加入潜在最大值的集合），则存在潜在最大值。将这个点加入潜在最大值的集合 S。

[0087] 3. 使滑动窗口前进一个点（例如这时是点 2-6），并且重复进行第 2 项所述的过程，再次仅接受这五个点的索引 3 处的最大值。对整个数据集继续进行这个过程。

[0088] 4. 检查表示索引 3 处的潜在最大值的集合的潜在最大值的结果集合 S，并且查找这个潜在最大值的集合 S 中的最大数据点 (Smax)。

[0089] 5. 如果 Smax 等于或小于最大噪声输入参（可由用户输入或者自动确定的噪声参数），则曲率数据中没有峰值。

[0090] 6. 保持来自这个集合 S 的其余潜在最大数据点，只要它们大于 Smax× 相对最小输入参数并且大于绝对最小输入参数。

[0091] 7. 如果只留下一个数据点，则仅存在一个峰值，并且曲线仅具有一个最大值。将这个单峰值定义为 pk_1。如果留下两个数据点，则这表示具有两个最大值的曲线。如果存在两个以上峰值，则取具有数据集 S 的最高值的两个峰值，并且将具有这两个的较低循环数的峰值作为 pk_1 返回，而将具有较高循环数的峰值作为 pk_2 返回。

[0092] 8. μ_1 的初始条件则为 pk_1，而（μ_1，μ_2）的初始条件为 (pk_1，pk_2)。

[0093] 熔融温度计算

[0094] 根据一个实施例的熔融温度计算如图 5 所示。在步骤 210，确定关于一阶导数数据集是包括一个还是两个（还是三个、四个）峰值。如果熔融数据集的一阶导数识别为具有单个峰值，则在步骤 220，通过公式 (2) 所述的单分量高斯函数的非线性回归（例如使用列文伯格 - 马夸尔特方法或者其它回归方法）来找到熔融曲线的最大值。初始条件通过局部最大值搜索给出。如果熔融数据集的一阶导数识别为具有两个（或者三个、四个）峰值，则在步骤 230，通过公式 (3) 所述的双分量高斯函数的非线性回归（例如使用列文伯格 - 马夸尔特方法）来找到熔融曲线的两个局部最大值，并且返回参数 μ_1、μ_2（或者 μ_3 和 μ_4）（与 Tm1、Tm2 或者 Tm3 和 Tm4 对应）。初始条件通过局部最大值搜索给出。应 当理解，即使图 5 示出对于一个或两个峰值的熔融温度计算，但是用于两个峰值的相同熔融温度计算也可用于三个和四个峰值。

[0095] 在步骤 240，台肩检测过程确定对于根据一个实施例的单导数峰值情形是否存在台肩。如果在 MELT 算法中找到两个（或三个、四个）峰值，则不采取进一步行动。如果相反找到一个峰值，则可能的是这个峰值存在台肩。下面论述根据一个实施例的台肩检测的细节。如果没有检测到台肩，则返回 μ_1（对应于 Tm1）。在步骤 250，对于各个参数确定置信区间。在步骤 260，对于所使用的高斯混合模型计算 R^2 值。在一个实施例中，如果 GMM1（或 GMM2、GMM3、GMM4）拟合的 R^2 值＞ 0.9，或者参数（μ_1，σ_1）或（μ_1，σ_1，μ_2，σ_2，μ_3，σ_3，μ_4，σ_4）的置信区间不包括零，则在步骤 270 接受 Tm1（或 Tm1，Tm2，Tm3，Tm4）的值。否则，在步骤 280，Tm1、（或者 Tm1，Tm2，Tm3，Tm4）设置作为未检测到目标 (TND)，以及在步骤 290，可选专家系统进行 TND 的最终调用或者使无效 (Invalid)。

[0096] 台肩检测

[0097] 根据一个实施例的台肩检测过程如图 6 所示。在步骤 310，双分量高斯模型拟合到使用 $a_{1,2} = 2$、$\mu_{1,2} = m \pm 2$、$\sigma_{1,2} = 2$ 作为初始条件的相同一阶导数数据，其中 m 是单峰值的熔融温度。在步骤 320，潜在主峰值和台肩（较低）峰值按以上所述来确定。在步骤 330，确定关于较低峰值的高度是否至少为较高峰值的某个百分比（例如较高峰值的 0.05 倍或以上）。如果不是，则返回台肩不存在的调用，并且 Tm 确定处理按照图 5 的步骤 250 继续进行。如果是，则在步骤 340，对于各个参数确定置信区间，以及在步骤 350，对于 GMM2 公式确定 R^2 值。在步骤 360，确定关于平均数的置信区间是否至少为相互分离的某个百分度数

（例如 3 度或以上）。如果不是，则返回台肩不存在调用，并且 Tm 确定处理按照图 5 的步骤 250 继续进行。如果是，则在步骤 370，确定置信区间是否不包含零，或者 R^2 值是否大于阈值（例如 0.9）。如果不是，则返回台肩不存在调用，并且 Tm 确定处理按照图 5 的步骤 250 继续进行。如果是，则在步骤 380，确定在 μ_1 和 μ_2 所评估的双分量高斯模型 (GMM2) 的二阶导数是否为负。如果是，则进行台肩检测调用。

[0098] 因此，假定 LM 方法收敛，在一个实施例中，如果下列条件全部成立，则检测到台肩：

[0099] - 一阶导数数据识别为具有正好一个局部最大值。

[0100] - 较低峰值的高度至少为较高峰值的 0.05 倍（例如使用“exp(-a)”）。

[0101] - 平均数的置信区间相互分离至少 3 百分度。

[0102] - μ_1、μ_2、σ_1 和 σ_2 的置信区间不包含零或者 $R^2 > 0.9$。

[0103] - 在 μ_1 和 μ_2 所评估的双分量高斯模型 (GMM2) 的二阶导数为负。

[0104] 在满足这些条件的情况下，建立台肩检测标志。结合图 6、对于包含一个或两个峰值的一阶导数描述上述台肩检测过程。然而，如上所述，应当理解，这个台肩检测过程可适用于提供总共四个峰值的一阶导数。

[0105] 专家系统校验

[0106] 在一个实施例中，在步骤 290（图 5）实现一个或多个专家系统校验。在一个校验中，确定全部整个熔融曲线数据的中值是否 > 0。如果这不成立，则结果报告为无效。在另一个校验中，确定熔融峰值荧光数据的最大值的绝对值是否大于熔融峰值荧光数据的最小值的绝对值。如果这不成立，则结果报告为无效。在另一个校验中，确定来自前数个（例如五个）循环的原始荧光对温度值的中值是否大于来自最后数个（例如五个）循环的原始荧光对温度值的中值。如果这不成立，则结果报告为无效。在又另一个校验中，二阶多项式拟合于原始荧光 对温度数据集。如果这个拟合的 R^2 大于阈值（例如 0.99），则不存在峰值，并且结果报告为未检测到目标 (TND)。

[0107] 示例

[0108] 图 7a 和图 7b 分别示出单个熔融峰值的情况下的原始数据曲线和熔融曲线。所计算的熔融温度为 Tm = 67.8。

[0109] 图 8a 和图 8b 分别示出两个熔融峰值的情况下的原始数据曲线和熔融曲线。所计算的熔融温度为 Tm1 = 58.8 和 Tm2 = 67.8。

[0110] 图 9a 和图 9b 分别示出两个熔融峰值的情况下的原始数据曲线和熔融曲线。所计算的熔融温度为 Tm1 = 57.9 和 Tm2 = 68.6。

[0111] 图 10a 和图 10b 分别示出单个熔融峰值加上台肩的情况下的原始数据曲线和熔融曲线。所计算的熔融温度为 Tm1 = 62.4 和 Tm2 = 68.8。

[0112] 图 11a 和图 11b 分别示出单个熔融峰值加上台肩的情况下的原始数据曲线和熔融曲线。所计算的熔融温度为 Tm1 = 61.3 和 Tm2 = 68.1。

[0113] 在某个实施例中，根据本发明的 Tm 确定过程可通过以下来实现：使用常规个人计算机系统，其包括但不限于：输入数据集的输入装置，如键盘、鼠标等；表示曲线的区域中的特定感兴趣点的显示装置，如监视器；实施方法中的每个步骤所需的处理装置，如 CPU；网络接口，如调制解调器，存储数据集的数据存储装置，运行于处理器的计算机代码等。此

外，过程还可在根据本发明的 PCR 过程中或者在根据本发明的 PCR 系统中来实现。

[0114] 应当理解，Tm 确定过程、包括导数和台肩确定过程，可在运行于计算机系统的处理器上的计算机代码来实现。代码包括用于控制处理器来实现 Tm 确定过程的各个方面和步骤的指令。代码通常存储在硬盘、RAM 或便携介质、如 CD、DVD 等中。类似地，过程可在例如热循环器等 PCR 装置或者包括运行与处理器耦合的存储器单元中存储的指令的处理器的其它专用装置中实现。包括这类指令的代码可 通过网络连接或者到代码源的直接连接或者使用便携介质下载到装置存储器单元，这是众所周知的。

[0115] 本领域的技术人员应当理解，本发明的 Tm 确定过程可使用例如 C、C++、C#、Fortran、VisualBasic 等各种编程语言以及例如 Mathematica® 等提供对数据可视化和分析有用的预打包的例程、函数和过程的应用程序来编码。后者的另一个示例是 MATLAB®。

[0116] 根据本发明的系统的一个示例如图 12 和图 13 所示。图 12 示出说明可用于实现本发明的过程和系统的软件与硬件资源之间的关系的总体框图。图 13 所示的系统包括可位于热循环装置中的动力 PCR 分析模块以及作为计算机系统的组成部分的智能模块。数据集 (PCR 数据集) 经由网络连接或者直接连接从分析模块传递到智能模块或者反之。数据集例如可按照图 4、图 5 和图 6 所示的流程图来处理。这些流程图可方便地通过计算机系统的硬件上存储的软件例如按照图 12 所示的流程图来实现。参照图 12，计算机系统 (400) 可包括例如用于接收在 PCR 反应期间所得到的荧光数据的接收部件 (410)、用于根据本发明的过程来处理所述数据的计算部件 (420)、用于应用计算部件所得到的结果的应用部件 (430) 以及用于在计算机屏幕上显示结果的显示部件 (440)。图 13 示出热循环装置与计算机系统之间的交互。该系统包括可位于热循环器装置中的动力 PCR 分析模块以及作为计算机系统的组成部分的智能模块。数据集 (PCR 数据集) 经由网络连接或者直接连接从分析模块传递到智能模块或者反之。数据集可通过运行于处理器并且存储于智能模块的存储装置的计算机代码按照图 12 来处理，并且在处理之后回传给分析模块的存储装置，其中修正的数据可在显示装置上显示。

[0117] 虽然作为示例并且根据具体实施例描述了本发明，但是大家要理解，本发明并不局限于所公开的实施例。相反，意在涵盖本领域的技术人员显而易见的各种修改和类似布置。

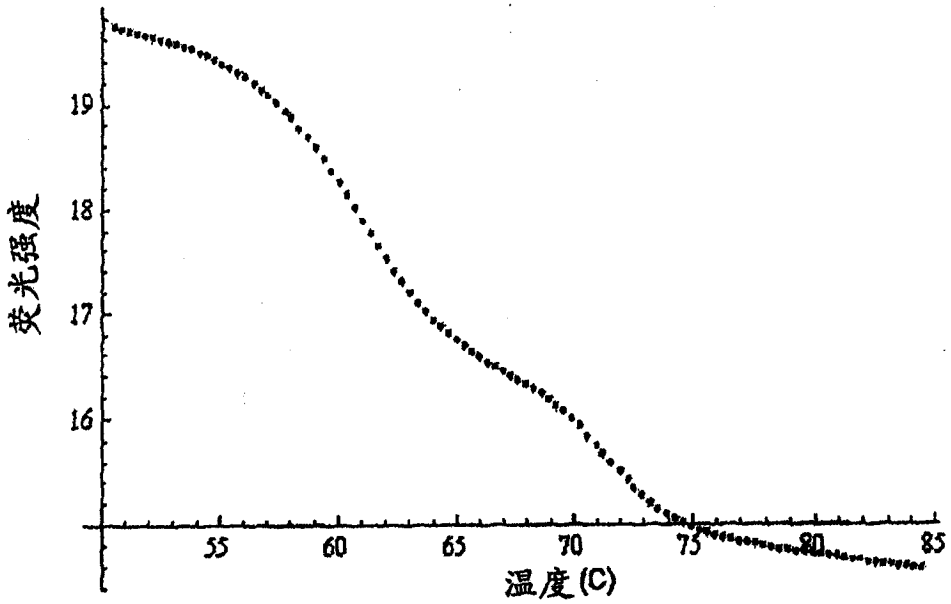

荧光强度
19
18
17
16
55
60
65
70
75
80
85
温度(C)

图 1

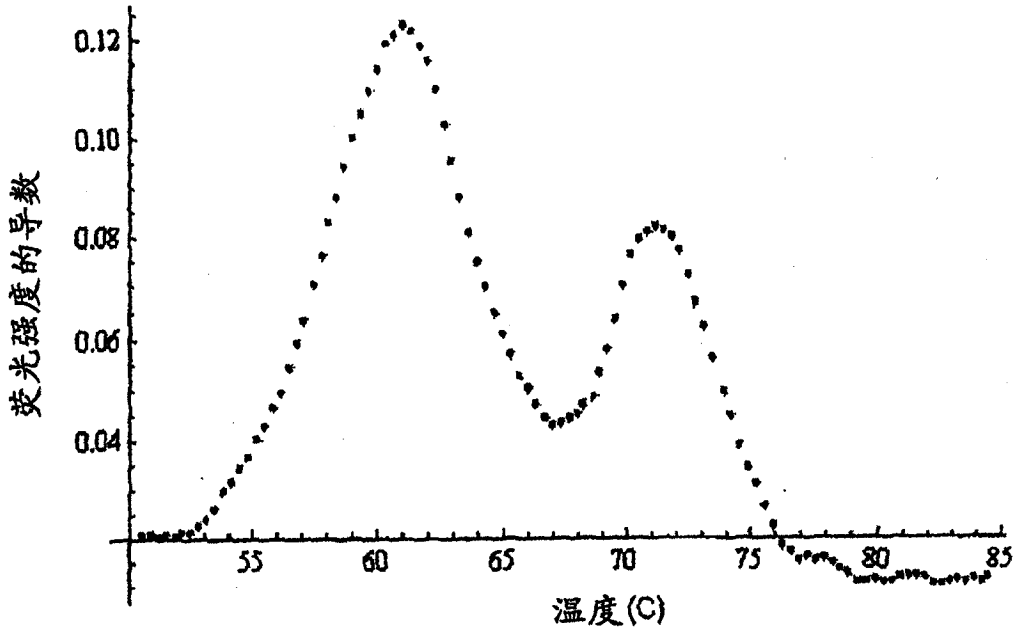

荧光强度的导数
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
55
60
65
70
75
80
85
温度(C)

图 2

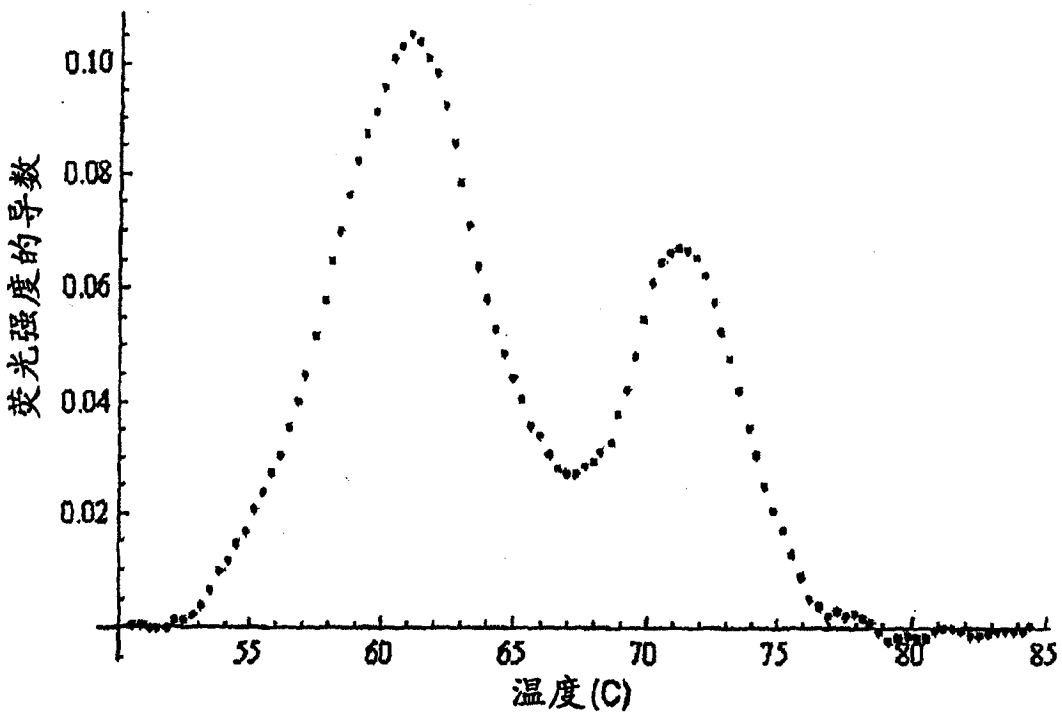


图 3

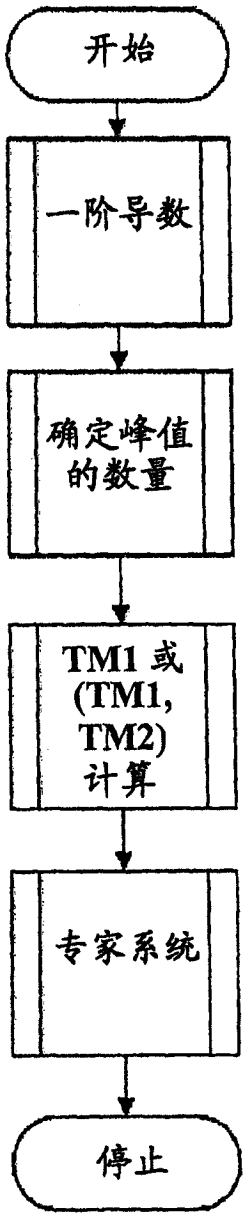


图 4

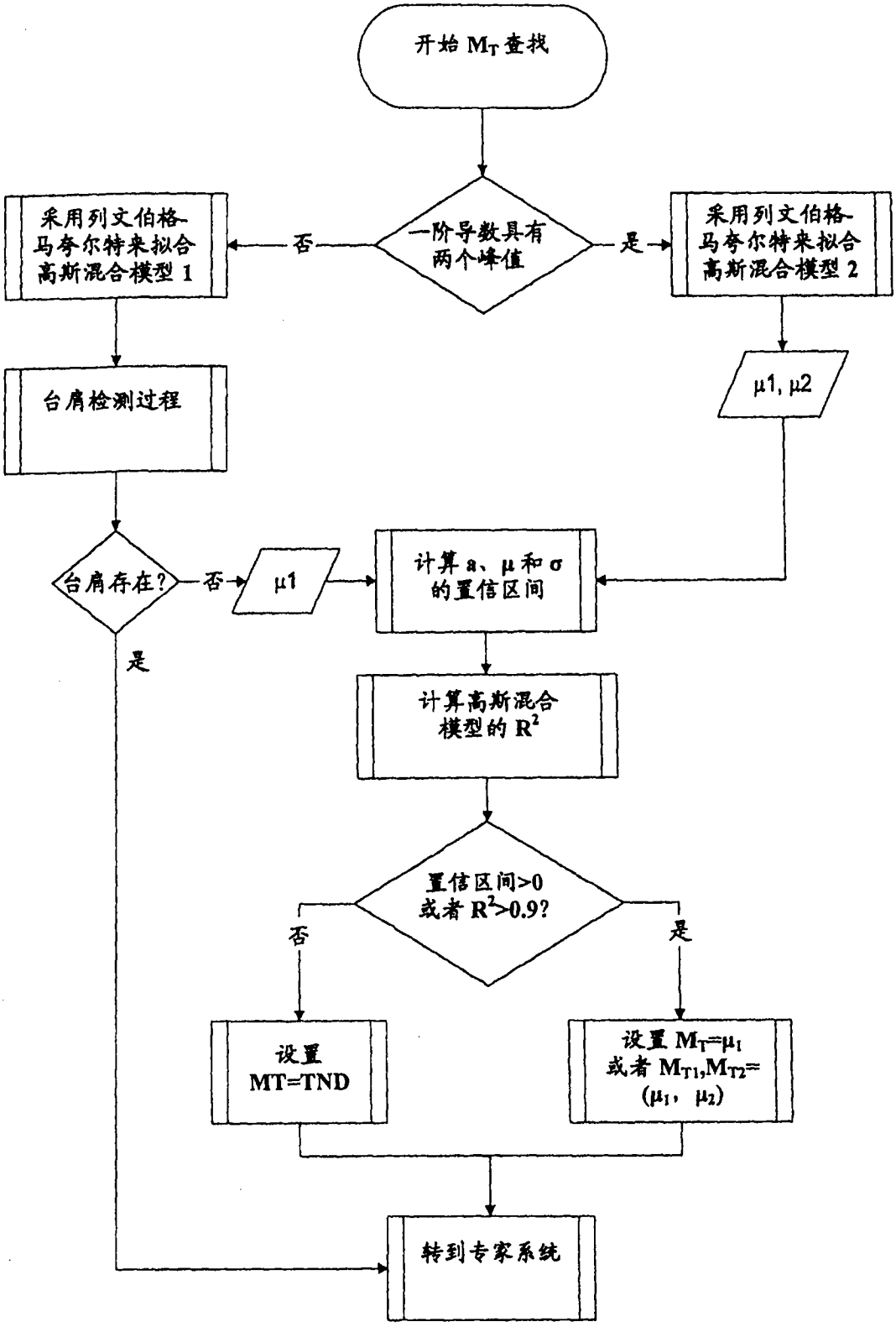

开始 M_T 查找
一阶导数具有两个峰值
否
是
采用列文伯格-马夸尔特来拟合高斯混合模型 1
采用列文伯格-马夸尔特来拟合高斯混合模型 2
台肩检测过程
μ1, μ2
台肩存在?
否
μ1
是
计算 a、μ 和 σ 的置信区间
计算高斯混合模型的 R^2
置信区间>0 或者 R^2>0.9?
否
是
设置 MT=TND
设置 $M_T=\mu_1$ 或者 $M_{T1},M_{T2}=(\mu_1, \mu_2)$
转到专家系统

图 5

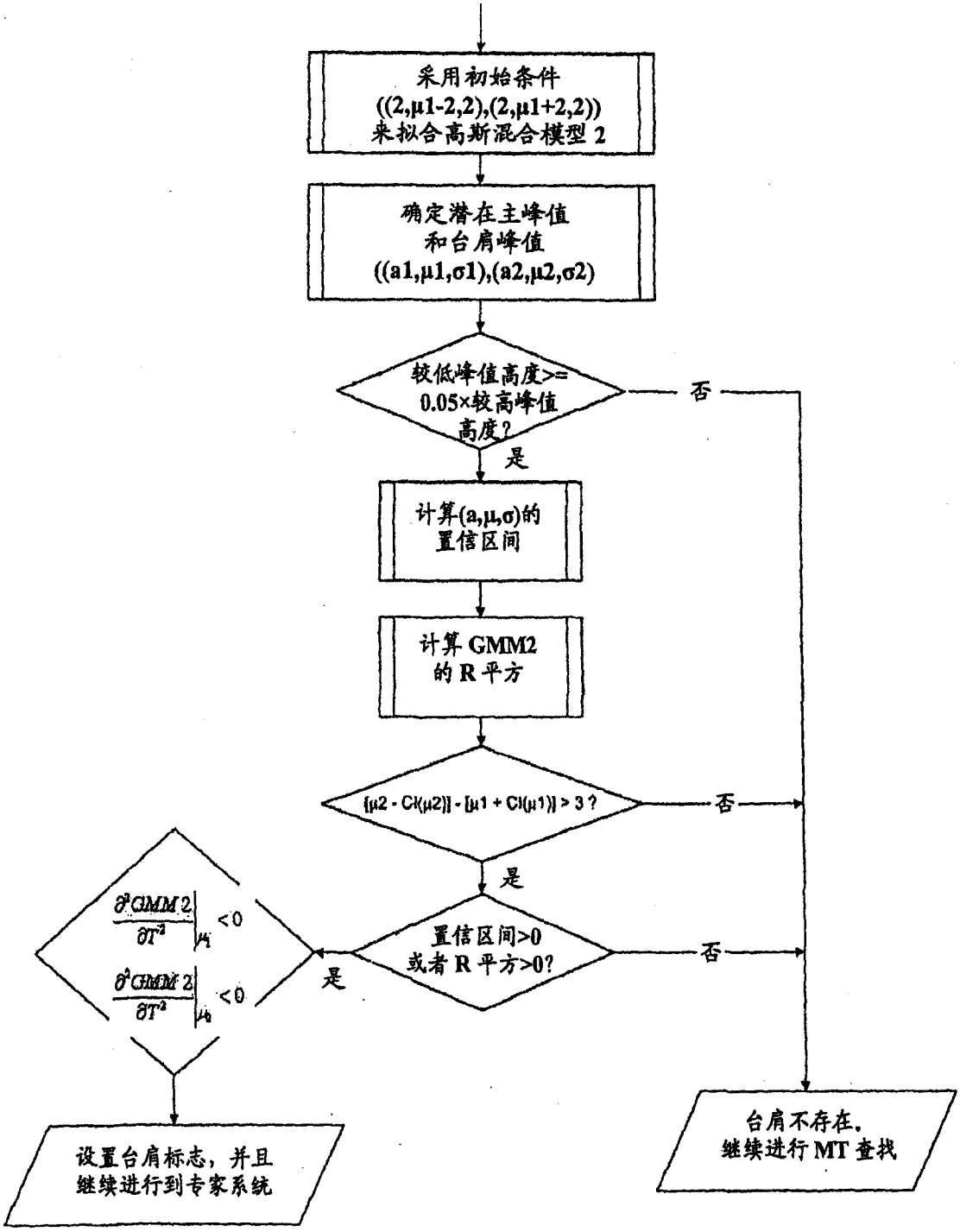

采用初始条件
((2,μ1-2,2),(2,μ1+2,2))
来拟合高斯混合模型 2
确定潜在主峰值
和台肩峰值
((a1,μ1,σ1),(a2,μ2,σ2)
较低峰值高度>=
0.05×较高峰值
高度?
否
是
计算(a,μ,σ)的
置信区间
计算 GMM2
的 R 平方
{μ2 - CI(μ2)} - {μ1 + CI(μ1)} > 3 ?
否
是
置信区间>0
或者 R 平方>0?
否
是
台肩不存在,
继续进行 MT 查找
设置台肩标志，并且
继续进行到专家系统

图 6

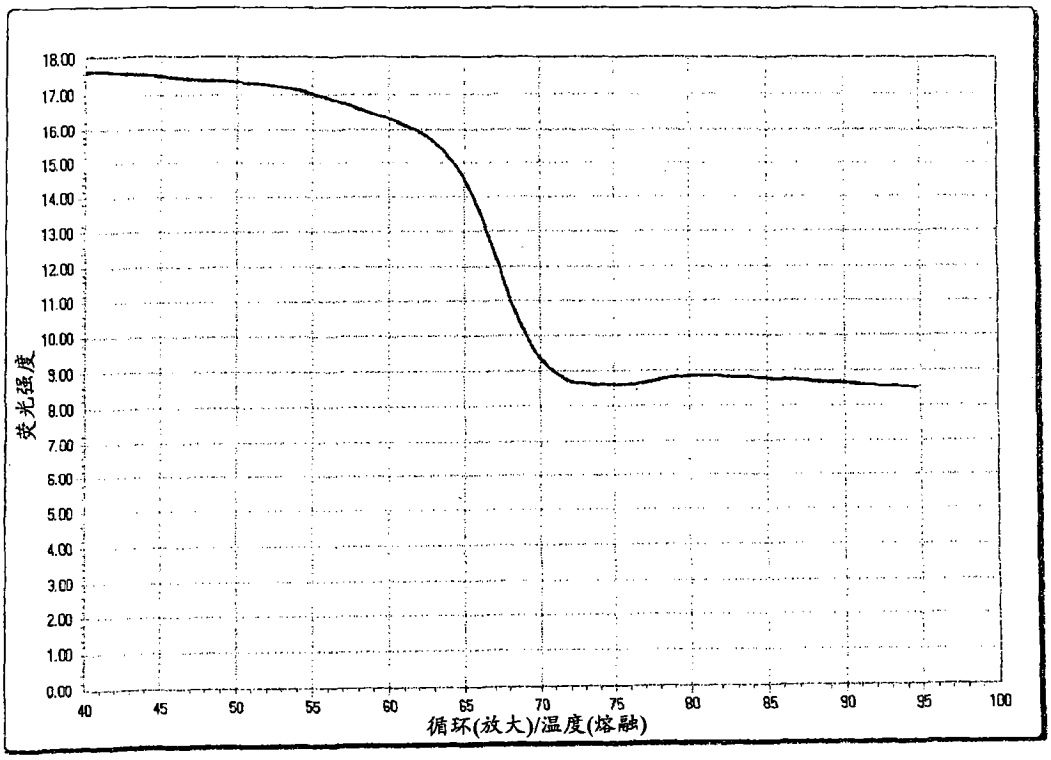

荧光强度
18.00
17.00
16.00
15.00
14.00
13.00
12.00
11.00
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
循环(放大)/温度(熔融)

图 7a

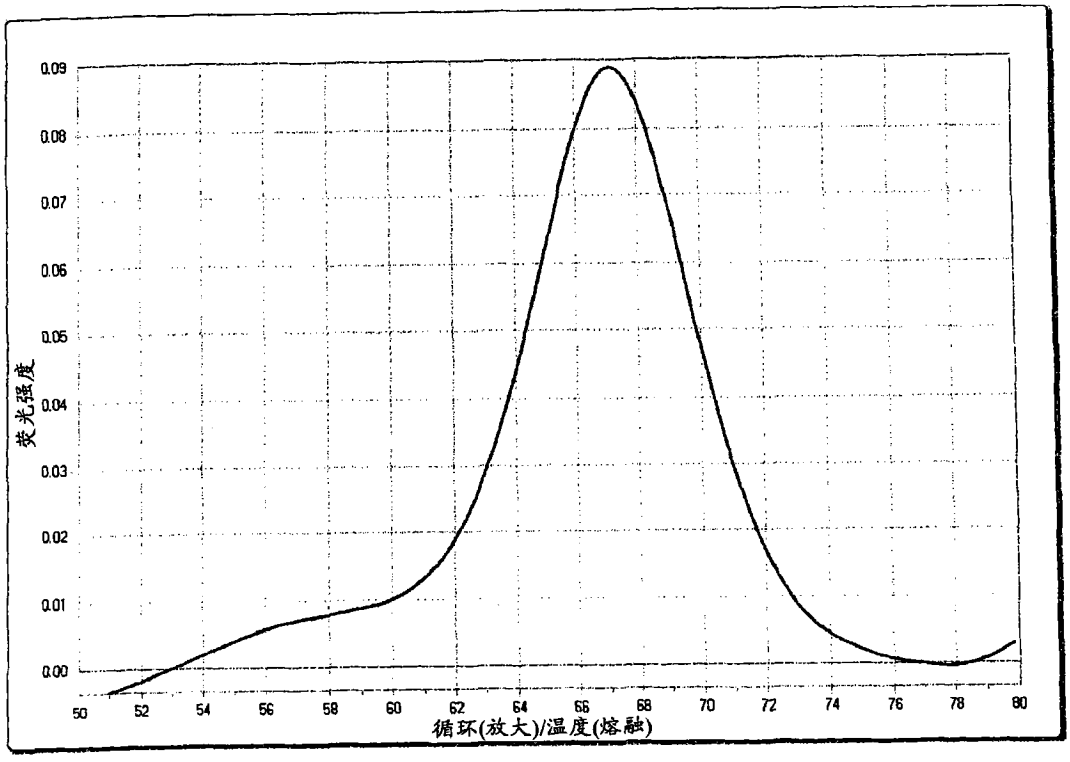

荧光强度
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
50
52
54
56
58
60
62
64
66
68
70
72
74
76
78
80
循环(放大)/温度(熔融)

图 7b

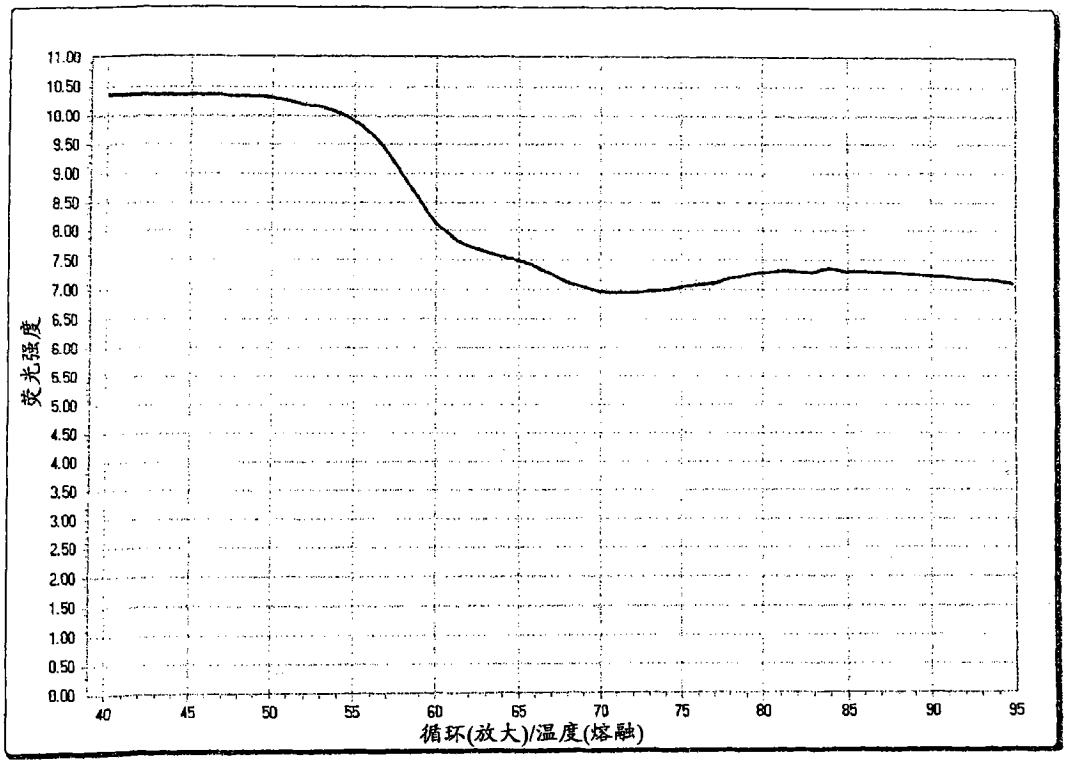


图 8a

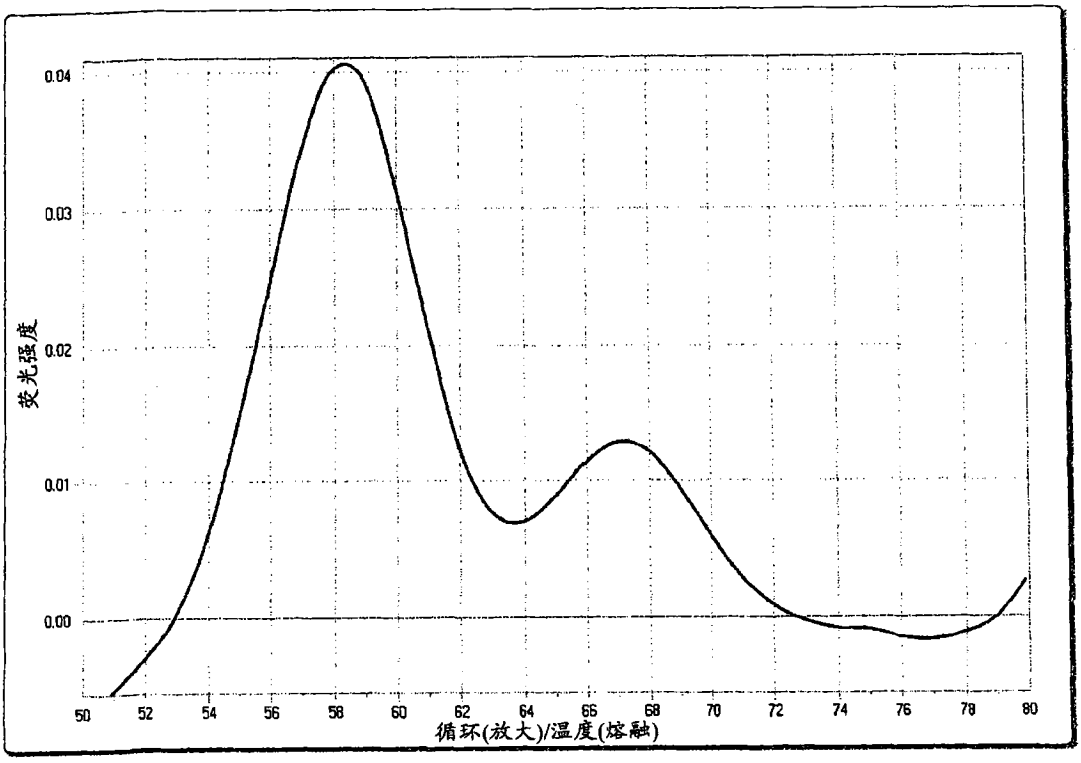


图 8b

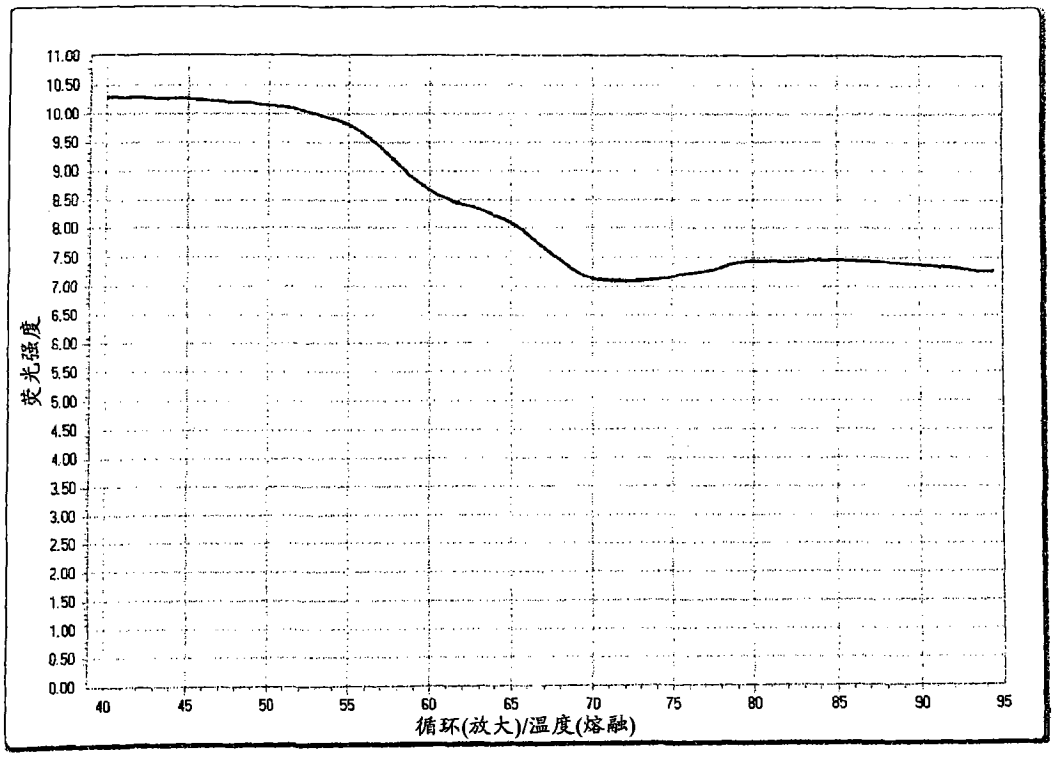


图 9a

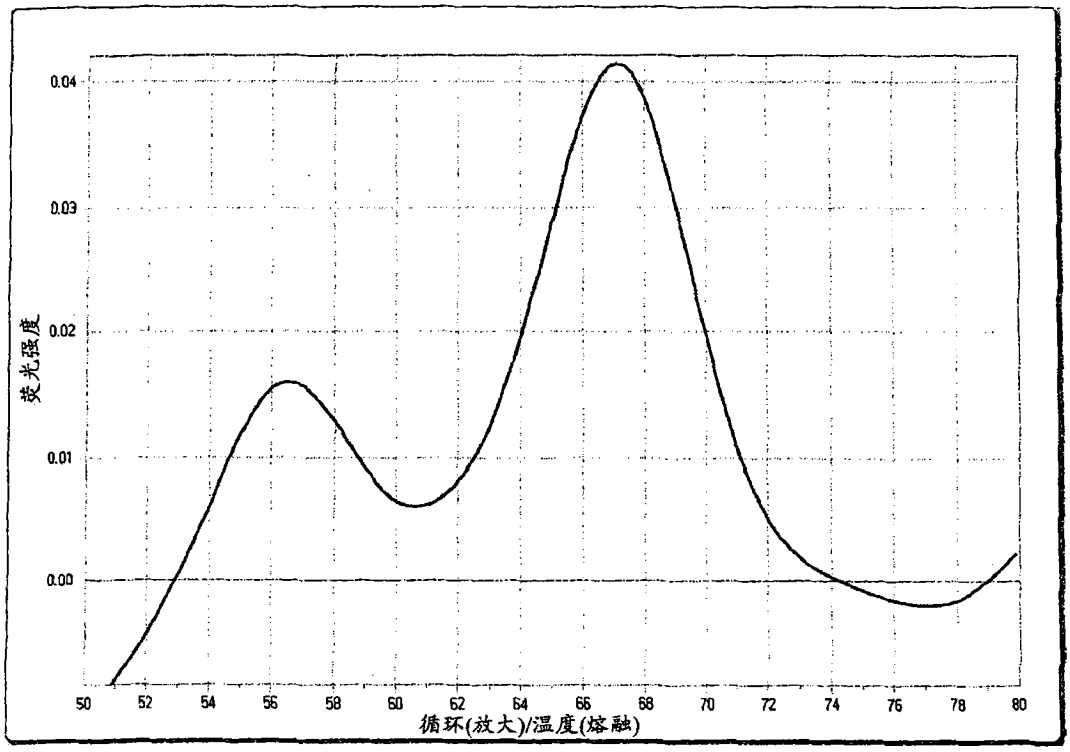


图 9b

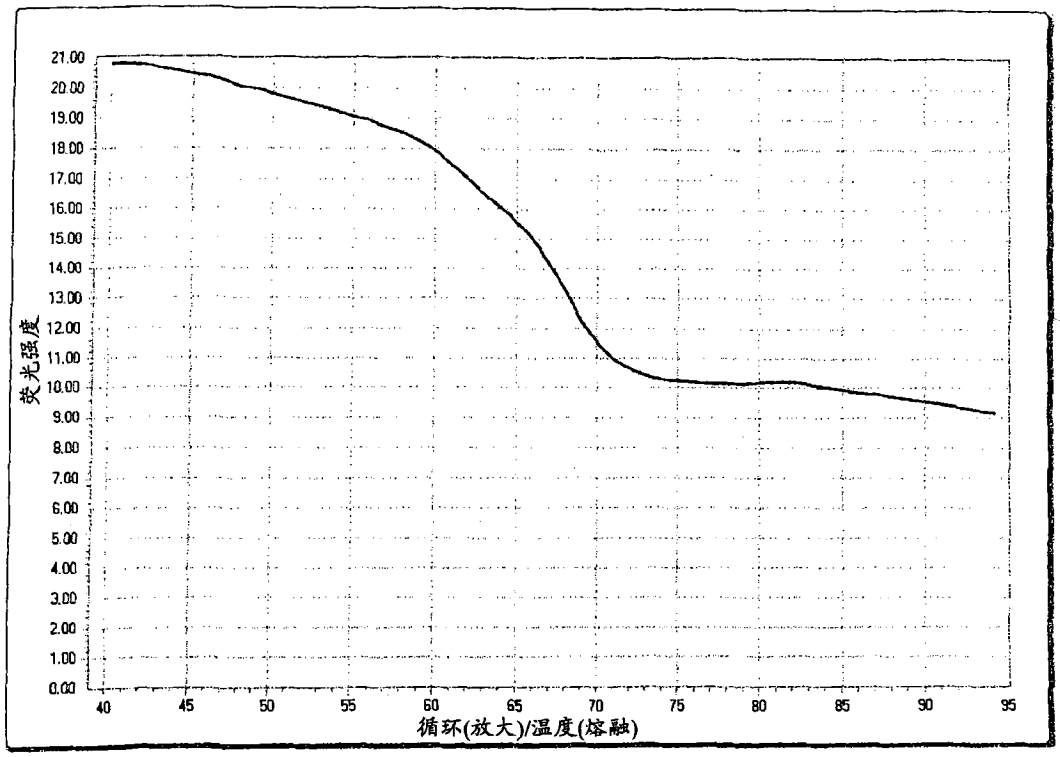

荧光强度
21.00
20.00
19.00
18.00
17.00
16.00
15.00
14.00
13.00
12.00
11.00
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
循环(放大)/温度(熔融)

图 10a

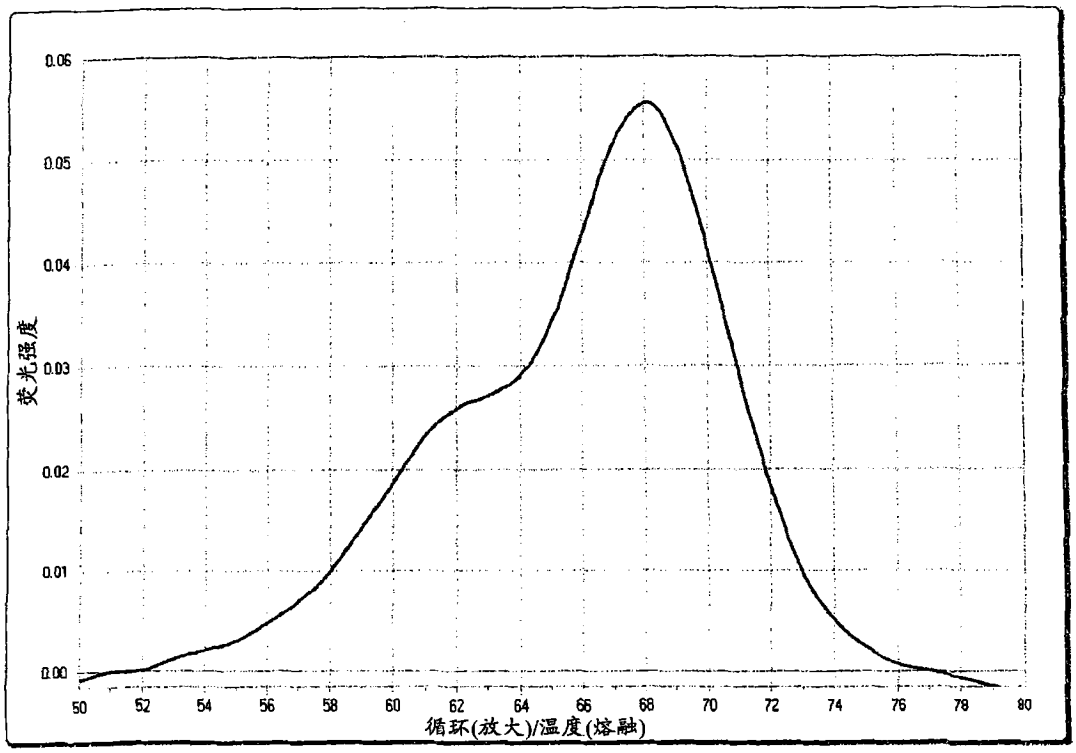

荧光强度
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
50
52
54
56
58
60
62
64
66
68
70
72
74
76
78
80
循环(放大)/温度(熔融)

图 10b

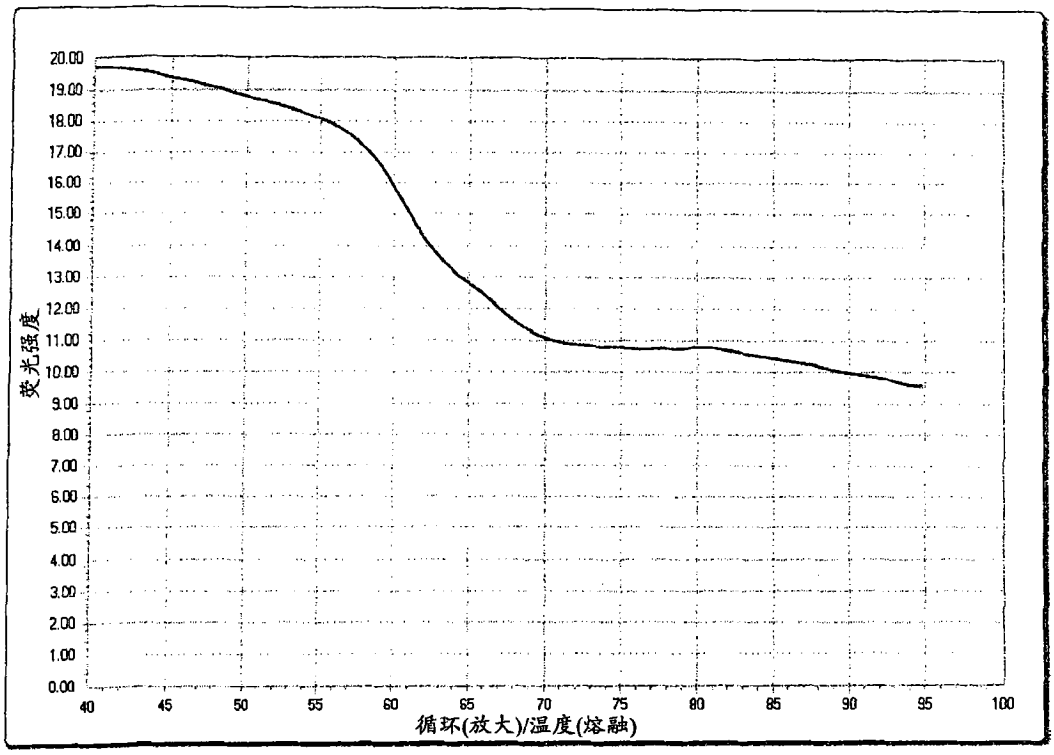

荧光强度
20.00
19.00
18.00
17.00
16.00
15.00
14.00
13.00
12.00
11.00
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
循环(放大)/温度(熔融)

图 11a

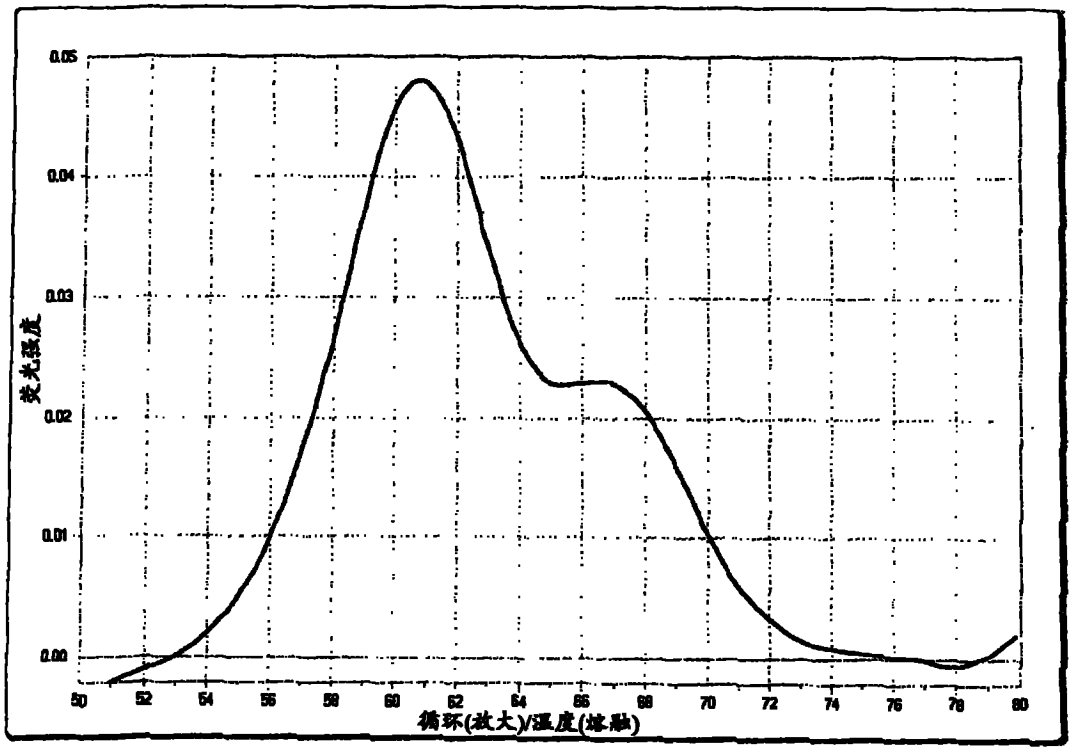

荧光强度
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
50
52
54
56
58
60
62
64
66
68
70
72
74
76
78
80
循环(放大)/温度(熔融)

图 11b

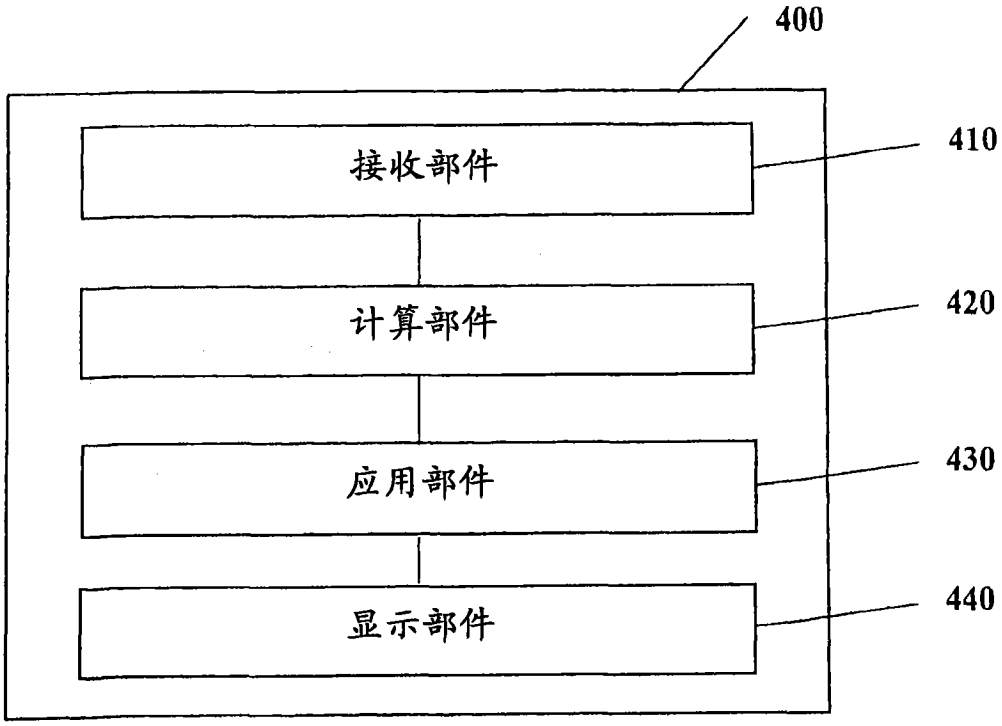


图 12

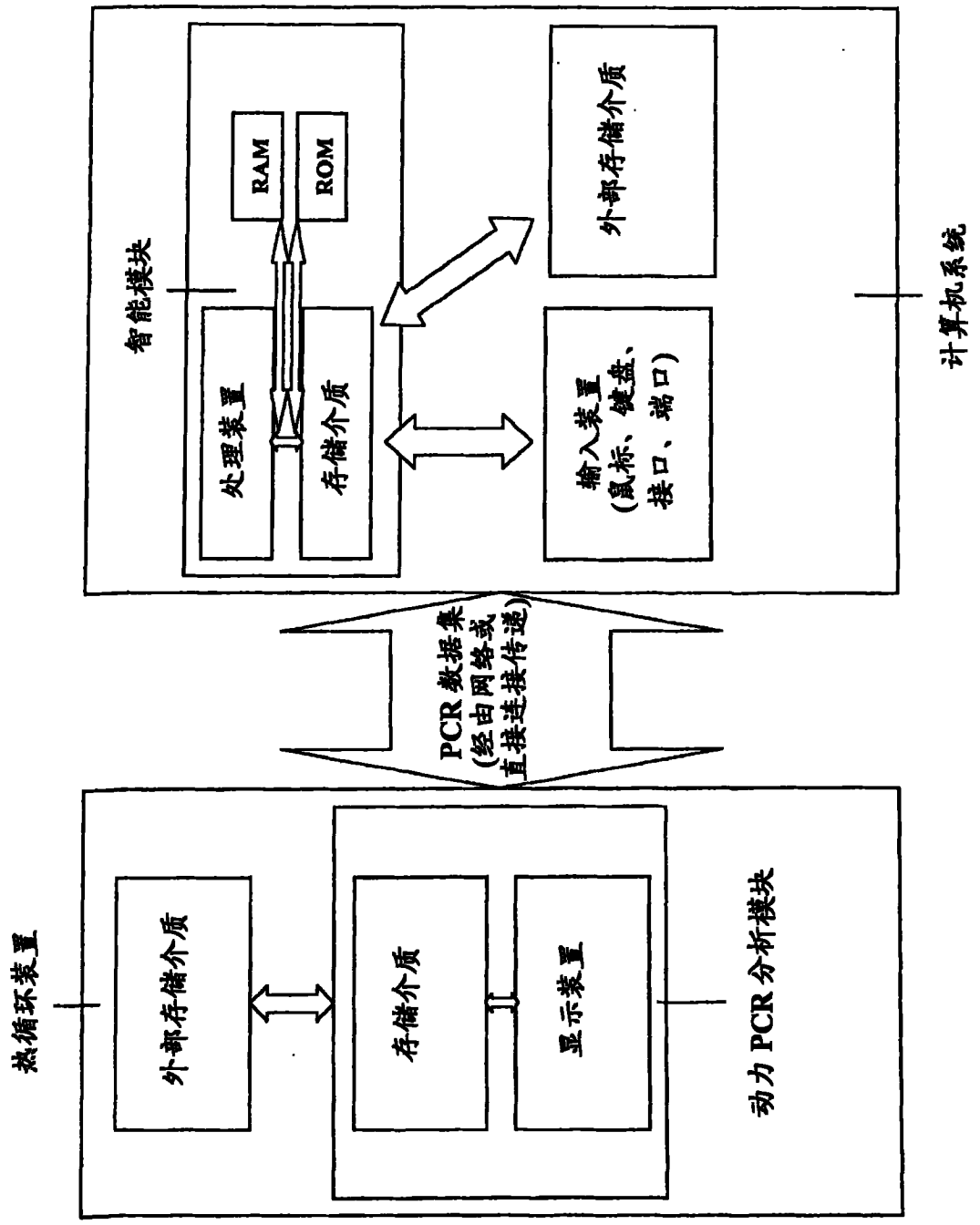

智能模块
RAM
ROM
处理装置
存储介质
外部存储介质
输入装置
(鼠标、键盘、
接口、端口)
计算机系统
PCR 数据集
(经由网络或
直接连接传递)
热循环装置
外部存储介质
存储介质
显示装置
动力 PCR 分析模块

图 13