



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116206686 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 02

(21) 申请号 202310212001.1

(22) 申请日 2023.03.07

(71) 申请人 深圳市天大生物医疗器械有限公司
地址 518000 广东省深圳市南山区西丽街
道曙光社区中山园路1001号TCL科学
园区F1栋201

(72) 发明人 赖楚明 汤兴良 黄丽青

(74) 专利代理机构 深圳市鼎圣霏凡专利代理事
务所(普通合伙) 44759
专利代理人 徐晶

(51) Int. Cl.

G16B 25/20 (2019.01)

G16B 30/00 (2019.01)

G16B 50/00 (2019.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

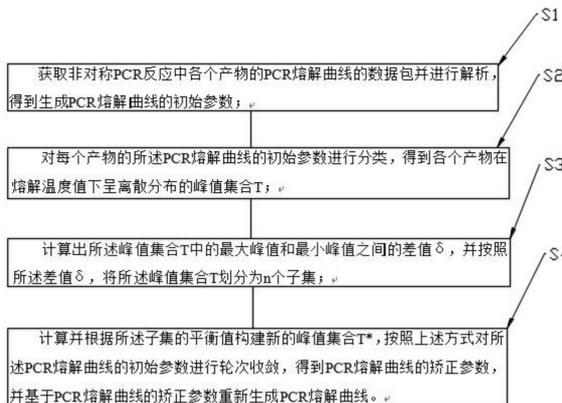
权利要求书2页 说明书11页 附图3页

(54) 发明名称

非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法
及其应用

(57) 摘要

本申请涉及一种非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法,能够重新得到可用于适当精确参数分析的PCR熔解曲线。该PCR熔解曲线经过两次降噪、收敛处理,将多余的杂峰去除,使得在利用PCR熔解曲线上的峰值信息进行产物特异性分析之前,对杂峰进一步地降噪处理,避免杂峰峰值范围过大而对特异产物的峰值造成影响,导致产物在结尾进行分型区分时出现较大的分型偏差。采用本方案,能够降低各个产物在熔解温度上的不同杂峰对特异性分型分析的影响,使得分型结果更为准确。



1. 非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法,其特征在于,包括如下步骤:

获取非对称PCR反应中各个产物的PCR熔解曲线的数据包并进行解析,得到生成PCR熔解曲线的初始参数;

对每个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数进行分类,得到各个产物在熔解温度值下呈离散分布的峰值集合T;

计算出所述峰值集合T中的最大峰值和最小峰值之间的差值 δ ,并按照所述差值 δ ,将所述峰值集合T划分为n个子集;

计算并根据所述子集的平衡值构建新的峰值集合T*,按照上述方式对所述PCR熔解曲线的初始参数进行轮次收敛,得到PCR熔解曲线的矫正参数,并基于PCR熔解曲线的矫正参数重新生成PCR熔解曲线。

2. 根据权利要求1所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法,其特征在于,获取非对称PCR反应中各个产物的PCR熔解曲线的数据包并进行解析,得到生成PCR熔解曲线的初始参数,包括:

预设数据包解析格式;

从生成PCR熔解曲线的应用中,导出非对称PCR反应中各个产物的PCR熔解曲线的数据包;

按照所述数据包解析格式,对所述PCR熔解曲线的数据包进行解析,得到生成所述PCR熔解曲线的初始参数;

将各个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数按照预先部署的第三方应用格式,分别导入并保存在第三方应用的数据库中。

3. 根据权利要求2所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法,其特征在于,在将各个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数导入并保存在第三方应用的数据库之前,还包括:

获取非对称PCR反应中的各个产物属性;

根据各个产物属性,在预先部署的第三方应用的数据库中,建立与各个产物属性相对应的存储空间。

4. 根据权利要求1所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法,其特征在于,对每个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数进行分类,得到各个产物在熔解温度值下呈离散分布的峰值集合T,包括:

获取每个产物的熔解温度值;

根据所述熔解温度值,从每个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数中,找到与所述熔解温度值相对应的所有的峰值;

将各个产物在熔解温度值下的所有峰值,组成一个峰值呈离散分布的峰值集合T,并存储至各个产物在数据库中对应的存储空间中。

5. 根据权利要求1所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法,其特征在于,在得到各个产物在熔解温度值下呈离散分布的峰值集合T之后,还包括:

预设有序排列规则;

对各个产物的所述峰值集合T中呈离散分布的的峰值进行有序排列处理,按照从低到高的顺序进行排列。

6. 根据权利要求5所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法,其特征在于,在对

所述峰值集合T进行有序排列处理之后,还包括:

计算出所述峰值集合T中的相邻两个峰值之间的差值 T^{δ} 和最小差值 T_{\min} ;

以所述最小峰值 T_{\min} 为基准,判断相邻两个峰值之间的差值 T^{δ} 是否满足:

$T^{\delta} > nT_{\min}$, n 为2-2.5的自然数,

若满足,则将当前两个相邻峰值中远离所述峰值集合T中心的峰值排除。

7. 根据权利要求5所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法,其特征在于,计算并根据所述子集的平衡值构建新的峰值集合 T^* ,按照上述方式对所述PCR熔解曲线的初始参数进行轮次收敛,得到PCR熔解曲线的矫正参数,并基于PCR熔解曲线的矫正参数重新生成PCR熔解曲线,包括:

计算出各个产物的所述峰值集合T中每个子集的平均峰值;

根据所述峰值集合T中所有子集的平均峰值,构建与各个产物相对应的首轮峰值集合 T^* ,所述首轮峰值集合 T^* 为各个产物在熔解温度值下峰值经过首轮收敛处理得到的峰值集合。

8. 根据权利要求7所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法,其特征在于,计算并根据所述子集的平衡值构建新的峰值集合 T^* ,按照上述方式对所述PCR熔解曲线的初始参数进行轮次收敛,得到PCR熔解曲线的矫正参数,并基于PCR熔解曲线的矫正参数重新生成PCR熔解曲线。

预设收敛轮次条件;

继续进行收敛处理,对首轮所述的新的峰值集合 T^* ,直到满足收敛轮次条件,停止迭代,得到最终的峰值集合 $T^{\#}$;

以最终的峰值集合 $T^{\#}$ 为生成PCR熔解曲线的矫正参数,并导入生成PCR熔解曲线的应用中,重新生成对应的PCR熔解曲线。

9. 权利要求1-8中任一项所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法的应用,其特征在于,采用重新生成的PCR熔解曲线,根据曲线上的熔解温度值来进行基因分型。

10. 电子设备,其特征在于,包括:

处理器;

用于存储处理器可执行指令的存储器;

其中,所述处理器被配置为执行所述可执行指令时实现权利要求1-8中任一项所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法。

非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法及其应用

技术领域

[0001] 本公开涉及生物基因工程技术领域,尤其涉及一种非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法及其应用。

背景技术

[0002] 基因测序技术,是生物基因工程中常用的特异性产物分型测定方式。对于某种DNA基因分型的测定,其是通过使用生物学试验检查个体的DNA序列,将目标序列与另一个体的序列或参考序列进行比较来确定个体的遗传构成(基因型)差异的过程。

[0003] 叶酸是机体所需要的重要营养素,为水溶性B族维生素,参与一系列涉及一碳单位(如甲基,甲烯基,甲酰基等)转运的重要生化反应,参加体内氨基酸,嘌呤,嘧啶的合成。叶酸代谢能力基因分型检测可评估叶酸利用能力,检测结果可为个体化增补叶酸、预防新生儿出生缺陷提供科学依据。

[0004] 目前对人叶酸代谢能力基因分型的检测,常见的方法有直接测序法,基因芯片杂交法,PCR-Taqman探针分型法,PCR-RFLP法,PCR熔解曲线法。

[0005] 现有的基因测序技术,主要有如下几类:

[0006] 1、直接测序法,是SNP位点分析的金标准,但该检测方法受到测序仪器的限制,测序仪器昂贵,推广困难。另外直接测序对模板量要求高,通常需要通过PCR扩增富集目的片段后,进行测序,操作复杂,周期长,且为开管操作,容易造成污染。

[0007] 2、基因芯片杂交法,操作步骤烦琐,易出错,实验耗时4个小时以上,耗时较长。PCR结束后需开管操作,易造成污染的问题。此外,该检测方法用肉眼来对结果判读,准确性会受到影响,会出现假阳性、假阴性的结果判读。

[0008] 3、PCR探针分型法,因其操作简单,分型准确,全程闭管操作,检测周期短等特点,是目前比较主流的SNP分型方法。目前市面上已有通过CFDA认证的成型检测试剂盒,如苏州旷远生物分子技术有限公司的“人MTHFR基因多态性检测试剂盒(荧光PCR法)”,然而其产品检测需要两管反应液分别鉴定两个型别,使仪器的检测通量变小;反应液与酶还是分开两个试剂,使用时需要现配,增加了手工操作,容易出错。

[0009] 4、PCR-RFLP法将PCR与限制性酶切相结合的传统方法,由于酶切操作烦琐及污染风险已经很少在临床使用。

[0010] 5、PCR熔解曲线法是在做实时荧光定量PCR分析时,用来确定不同反应产物,包括非特异性产物的分析方法。原理是在PCR扩增反应完成后,通过逐渐增加温度的同时监测每一步的荧光信号来产生熔解曲线,随着反应中双链DNA变性,荧光染料又恢复到游离状态导致荧光信号降低,用荧光信号改变的负的一次导数与温度作图(-d—T),得到PCR熔解曲线图(见说明书附图1所示),在扩增产物的熔解温度上产生特征峰,所以用这个特征峰就可以将特异产物与其他的产物分开。这项技术主要优势在于可以利用不同荧光通道和不同荧光探针熔解峰温度的组合同时检测多个检测位点,从而大大节约了检测的时间与成本,与既往的Taqman终点荧光法相比,不仅可以在一个荧光通道上检测多个位点,而且设计良好的

探针可以通过熔解峰的变化分辨不同的亚型,而非仅仅区分野生型和突变型两种差异。

[0011] 目前已有的方法在推广上都或多或少存在如试剂检测成本高,操作复杂,易产生污染,产生一定的假阴性和假阳性等缺陷。

[0012] 比如PCR熔解曲线法,在非对称PCR的反应分析中,非对称PCR是利用不等量的一对引物来产生大量单链DNA的方法,其能够通过不对称PCR反应制备的单链DNA在用于序列测定时,不必在测序之前除去剩余引物,简化操作、节约人力物力。不对称PCR主要为测序制备大量单链DNA,尤其是利用c-DNA经不对称PCR进行DNA序列分析、研究真核DNA外显子。

[0013] 在PCR反应中生成的PCR熔解曲线,虽然在扩增产物的溶解温度上有特征峰,可以用这个特征峰就可以将特异产物与其他的产物分开,但是在非对称PCR反应中生成的PCR熔解曲线上,会存在杂峰的出现,这是因为:

[0014] PCR熔解曲线分析过程,实际上利用PCR熔解曲线上的峰值信息进行产物特异性分析,以此分别出基因分型。但是PCR熔解曲线上的峰值信息包含了PCR仪器的精度误差,在此误差上,PCR熔解曲线上的峰值信息在推导计算的结果中难免会引起计算误差,导致各个温度值处出现若干杂峰。

[0015] 见说明书附图2所示产物A在熔解曲线上的峰值,实际上存在多个杂峰。若是在PCR非特异性扩增中,温度A在PCR熔解曲线上的特征峰周围出现杂峰,则表明产物在PCR中的特异性反应差,峰值有待进一步确认,暂不适宜对结果进行分型判断。

[0016] 因此有必要在利用PCR熔解曲线上的峰值信息进行产物特异性分析之前,对杂峰进一步地降噪处理,避免杂峰峰值范围过大而对特异产物的峰值造成影响,导致产物在结尾进行分型区分时出现较大的分型偏差。

发明内容

[0017] 为了解决上述问题,本申请提出一种非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法及其应用和电子设备。

[0018] 本申请一方面,提出一种非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法,包括如下步骤:

[0019] 获取非对称PCR反应中各个产物的PCR熔解曲线的数据包并进行解析,得到生成PCR熔解曲线的初始参数;

[0020] 对每个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数进行分类,得到各个产物在熔解温度值下呈离散分布的峰值集合T;

[0021] 计算出所述峰值集合T中的最大峰值和最小峰值之间的差值 δ ,并按照所述差值 δ ,将所述峰值集合T划分为n个子集;

[0022] 计算并根据所述子集的平衡值构建新的峰值集合T*,按照上述方式对所述PCR熔解曲线的初始参数进行轮次收敛,得到PCR熔解曲线的矫正参数,并基于PCR熔解曲线的矫正参数重新生成PCR熔解曲线。

[0023] 作为本申请的一可选实施方案,可选地,获取非对称PCR反应中各个产物的PCR熔解曲线的数据包并进行解析,得到生成PCR熔解曲线的初始参数,包括:

[0024] 预设数据包解析格式;

[0025] 从生成PCR熔解曲线的应用中,导出非对称PCR反应中各个产物的PCR熔解曲线的

数据包；

[0026] 按照所述数据包解析格式,对所述PCR熔解曲线的数据包进行解析,得到生成所述PCR熔解曲线的初始参数；

[0027] 将各个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数按照预先部署的第三方应用格式,分别导入并保存在第三方应用的数据库中。

[0028] 作为本申请的一可选实施方案,可选地,在将各个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数导入并保存在第三方应用的数据库之前,还包括：

[0029] 获取非对称PCR反应中的各个产物属性；

[0030] 根据各个产物属性,在预先部署的第三方应用的数据库中,建立与各个产物属性相对应的存储空间。

[0031] 作为本申请的一可选实施方案,可选地,对每个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数进行分类,得到各个产物在熔解温度值下呈离散分布的峰值集合T,包括：

[0032] 获取每个产物的熔解温度值；

[0033] 根据所述熔解温度值,从每个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数中,找到与所述熔解温度值相对应的所有的峰值；

[0034] 将各个产物在熔解温度值下的所有峰值,组成一个峰值呈离散分布的峰值集合T,并存储至各个产物在数据库中对应的存储空间中。

[0035] 作为本申请的一可选实施方案,可选地,在得到各个产物在熔解温度值下呈离散分布的峰值集合T之后,还包括：

[0036] 预设有序排列规则；

[0037] 对各个产物的所述峰值集合T中呈离散分布的的峰值进行有序排列处理,按照从低到高的顺序进行排列。

[0038] 作为本申请的一可选实施方案,可选地,在对所述峰值集合T进行有序排列处理之后,还包括：

[0039] 计算出所述峰值集合T中的相邻两个峰值之间的差值 T^{δ} 和最小差值 T_{\min} ；

[0040] 以所述最小峰值 T_{\min} 为基准,判断相邻两个峰值之间的差值 T^{δ} 是否满足：

[0041] $T^{\delta} > nT_{\min}$, n为2-2.5的自然数,

[0042] 若满足,则将当前两个相邻峰值中远离所述峰值集合T中心的峰值排除。

[0043] 作为本申请的一可选实施方案,可选地,计算并根据所述子集的平衡值构建新的峰值集合T*,按照上述方式对所述PCR熔解曲线的初始参数进行轮次收敛,得到PCR熔解曲线的矫正参数,并基于PCR熔解曲线的矫正参数重新生成PCR熔解曲线,包括：

[0044] 计算出各个产物的所述峰值集合T中每个子集的平均峰值；

[0045] 根据所述峰值集合T中所有子集的平均峰值,构建与各个产物相对应的首轮峰值集合T*,所述首轮峰值集合T*为各个产物在熔解温度值下峰值经过首轮收敛处理得到的峰值集合。

[0046] 作为本申请的一可选实施方案,可选地,计算并根据所述子集的平衡值构建新的峰值集合T*,按照上述方式对所述PCR熔解曲线的初始参数进行轮次收敛,得到PCR熔解曲线的矫正参数,并基于PCR熔解曲线的矫正参数重新生成PCR熔解曲线。

[0047] 预设收敛轮次条件；

[0048] 继续进行收敛处理,对首轮的所述新的峰值集合 T^* ,直到满足收敛轮次条件,停止迭代,得到最终的峰值集合 $T\#$;

[0049] 以最终的峰值集合 $T\#$ 为生成PCR熔解曲线的矫正参数,并导入生成PCR熔解曲线的应用中,重新生成对应的PCR熔解曲线。

[0050] 本申请另一方面,提出一种所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法的应用,采用重新生成的PCR熔解曲线,根据曲线上的熔解温度值来进行基因分型。

[0051] 本申请另一方面,还提出一种实现所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法的装置,包括:

[0052] 数据包解析模块,用于获取非对称PCR反应中各个产物的PCR熔解曲线的数据包并进行解析,得到生成PCR熔解曲线的初始参数;

[0053] 数据集模块,用于对每个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数进行分类,得到各个产物在熔解温度值下呈离散分布的峰值集合 T ;

[0054] 差值计算模块,用于计算出所述峰值集合 T 中的最大峰值和最小峰值之间的差值 δ ,并按照所述差值 δ ,将所述峰值集合 T 划分为 n 个子集;

[0055] 轮次收敛模块,用于计算并根据所述子集的平衡值构建新的峰值集合 T^* ,按照上述方式对所述PCR熔解曲线的初始参数进行轮次收敛,得到PCR熔解曲线的矫正参数,并基于PCR熔解曲线的矫正参数重新生成PCR熔解曲线。

[0056] 本申请另一方面,还提出一种电子设备,包括:

[0057] 处理器;

[0058] 用于存储处理器可执行指令的存储器;

[0059] 其中,所述处理器被配置为执行所述可执行指令时实现所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法。

[0060] 本发明的技术效果:

[0061] 本申请通过获取非对称PCR反应中各个产物的PCR熔解曲线的数据包并进行解析,得到生成PCR熔解曲线的初始参数;对每个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数进行分类,得到各个产物在熔解温度值下呈离散分布的峰值集合 T ;计算出所述峰值集合 T 中的最大峰值和最小峰值之间的差值 δ ,并按照所述差值 δ ,将所述峰值集合 T 划分为 n 个子集;计算并根据所述子集的平衡值构建新的峰值集合 T^* ,按照上述方式对所述PCR熔解曲线的初始参数进行轮次收敛,得到PCR熔解曲线的矫正参数,并基于PCR熔解曲线的矫正参数重新生成PCR熔解曲线。能够重新得到可用于适当精确参数分析的PCR熔解曲线。该PCR熔解曲线经过两次降噪、收敛处理,将多余的杂峰去除,使得在利用PCR熔解曲线上的峰值信息进行产物特异性分析之前,对杂峰进一步地降噪处理,避免杂峰峰值范围过大而对特异产物的峰值造成影响,导致产物在结尾进行分型区分时出现较大的分型偏差。采用本方案,能够降低各个产物在熔解温度上的不同杂峰对特异性分型分析的影响,使得分型结果更为准确。

[0062] 根据下面参考附图对示例性实施例的详细说明,本公开的其它特征及方面将变得清楚。

附图说明

[0063] 包含在说明书中并且构成说明书的一部分的附图与说明书一起示出了本公开的

示例性实施例、特征和方面,并且用于解释本公开的原理。

[0064] 图1示出为PCR熔解曲线图示意图;

[0065] 图2示出为具备杂峰的产物熔解曲线示意图;

[0066] 图3示出为本发明的实施流程示意图;

[0067] 图4示出为本发明在第三方数据库中存储各个产物峰值数据的示意图;

[0068] 图5示出为本发明产物A经过收敛后在熔解曲线图上的曲线示意图;

[0069] 图6示出为本发明电子设备的应用系统组成示意图。

具体实施方式

[0070] 以下将参考附图详细说明本公开的各种示例性实施例、特征和方面。附图中相同的附图标记表示功能相同或相似的元件。尽管在附图中示出了实施例的各种方面,但是除非特别指出,不必按比例绘制附图。

[0071] 在这里专用的词“示例性”意为“用作例子、实施例或说明性”。这里作为“示例性”所说明的任何实施例不必解释为优于或好于其它实施例。

[0072] 另外,为了更好的说明本公开,在下文的具体实施方式中给出了众多的具体细节。本领域技术人员应当理解,没有某些具体细节,本公开同样可以实施。在一些实例中,对于本领域技术人员熟知的方法、手段、元件和电路未作详细描述,以便于凸显本公开的主旨。

[0073] 本实施例,可以采用微滴读取仪读取每一个微滴的荧光信号。

[0074] 本实施例,生成PCR熔解曲线的软件,可以是primer express等软件。

[0075] 实施例1

[0076] 本实施例在于提供一种能够对非对称PCR反应中的PCR熔解曲线进行收敛、降噪处理的方法,能够重新得到可用于适当精确参数分析的PCR熔解曲线。该PCR熔解曲线经过两次降噪、收敛处理,将多余的杂峰去除,使得在利用PCR熔解曲线上的峰值信息进行产物特异性分析之前,对杂峰进一步地降噪处理,避免杂峰峰值范围过大而对特异产物的峰值造成影响,导致产物在结尾进行分型区分时出现较大的分型偏差。采用本方案,能够降低各个产物在熔解温度上的不同杂峰对特异性分型分析的影响,使得分型结果更为准确。

[0077] 如图3所示,本申请一方面,提出一种非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法,包括如下步骤:

[0078] S1、获取非对称PCR反应中各个产物的PCR熔解曲线的数据包并进行解析,得到生成PCR熔解曲线的初始参数;

[0079] PCR熔解曲线的生成参数以及生成方式,可以参见现有技术的描述,比如:

[0080] 可以利用“BIO-RAD CFX manager”软件打开数据结果,通过“EXPORT——export all data sheet——excel”导出数据至指定目录下,导出为EXCEL格式;找到并打开数据表“quantification amplification results”,此表中即包含QPCR过程中每一个循环结束产生的荧光信号强度值(注意:此时输出的数据结果是线性关系,作图前需要进行log转换)。打开graphpad 9,选择“group”创建绘图文件。复制EXCEL中数据,粘贴至graphpad 9中,绘制出扩增曲线。

[0081] 作为本申请的一可选实施方案,可选地,获取非对称PCR反应中各个产物的PCR熔解曲线的数据包并进行解析,得到生成PCR熔解曲线的初始参数,包括:

[0082] 预设数据包解析格式；

[0083] 从生成PCR熔解曲线的应用中，导出非对称PCR反应中各个产物的PCR熔解曲线的数据包；

[0084] 按照所述数据包解析格式，对所述PCR熔解曲线的数据包进行解析，得到生成所述PCR熔解曲线的初始参数；

[0085] 将各个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数按照预先部署的第三方应用格式，分别导入并保存在第三方应用的数据库中。

[0086] 本实施例，从primer express中，导出当前项目的PCR熔解曲线的数据包。PCR熔解曲线的数据包中包含各个产物的PCR熔解曲线数据。

[0087] 本处需要进行数据处理，采用第三方能够处理熔解曲线的第三方应用，对所述PCR熔解曲线的数据包进行解析，得到生成所述PCR熔解曲线的初始参数。

[0088] 因此这里的数据包解析格式，可以参照第三方应用可以适配的文件格式进行解析，比如XML、txt等。数据包解析后，将其导入部署在服务器上的第三方软件中，等待处理。

[0089] 本实施例，第三方应用可以进行数据仿真、数据收敛降噪、绘图等功能，具体由实施人员选择。

[0090] 作为本申请的一可选实施方案，可选地，在将各个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数导入并保存在第三方应用的数据库之前，还包括：

[0091] 获取非对称PCR反应中的各个产物属性；

[0092] 根据各个产物属性，在预先部署的第三方应用的数据库中，建立与各个产物属性相对应的存储空间。

[0093] 初始参数中包含了不同产物的特征峰等数据值，为了储存各个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数等数据，本实施例，按照产物的属性即有多少种产物，对应在第三方应用的数据库中划分有对应的数据空间，用于分别储存各个产物的熔解曲线信息。

[0094] 比如A产物在熔解曲线上对应有一个熔解温度值以及对应的峰值和杂峰值。将其单独储存在第三方应用的数据库中的一种文件夹中。

[0095] 熔解曲线中，如附图2所示，产物A在熔解曲线图上，出现一簇特征峰（简称“峰簇”），从220-260不等。这表明产物A在当前的熔解温度值上，存在差异性，多个杂峰的出现，会导致精准计算产物A的荧光信号log负导数值。因此需要对这些杂峰值进行降噪处理，逐步将各个离散峰值进行收敛，达到降噪目的，最终得到的峰值将无线趋近于一个确定的特征峰值，此时将其作为产物A在当前的熔解温度值上的真实峰值，再用于产物A的基因分型分析，能够大大提高分析中的数据可观性，避免不同产物之间的杂峰相互影响，误导基因分型判断结果。

[0096] 比如附图2中最右侧的最高峰，和最左侧产物A的最低峰值，两者之间差不多处于同一个峰值，若是两者的熔解温度稍微靠近，则就难免对两个产物进行基因区分。

[0097] 本实施例首先对“峰簇”中较为离散的峰值进行排除。

[0098] S2、对每个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数进行分类，得到各个产物在熔解温度值下呈离散分布的峰值集合T；

[0099] 作为本申请的一可选实施方案，可选地，对每个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数进行分类，得到各个产物在熔解温度值下呈离散分布的峰值集合T，包括：

[0100] 获取每个产物的熔解温度值；

[0101] 根据所述熔解温度值，从每个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数中，找到与所述熔解温度值相对应的所有的峰值；

[0102] 将各个产物在熔解温度值下的所有峰值，组成一个峰值呈离散分布的峰值集合T，并存储至各个产物在数据库中对应的存储空间中。

[0103] 如图4所示，以产物A为例，因为熔解曲线是荧光定量反应下的结果。因此产物A的熔解温度，具有预设的温度值。从数据库参数中，可以得到每个产物的熔解温度值。

[0104] 这样，从数据库中的初始参数中，可以找到产物A在其熔解温度值处的“峰簇”中各个峰值。比如产物A熔解温度为77.5℃，此时所对应的“峰簇”中，包含若干个峰值，荧光信号log负导数值从220-260不同。本处，将产物A在其熔解温度值处的“峰簇”中各个峰值T1、T2、T3……，组成一个集合，即峰值呈离散分布的峰值集合T，将其对应储存在产物A在第三方应用的数据库中的一种文件夹中。

[0105] 这里面存在与真实的峰值之间相差很大的杂峰峰值，首先将其排除。

[0106] 作为本申请的一可选实施方案，可选地，在得到各个产物在熔解温度值下呈离散分布的峰值集合T之后，还包括：

[0107] 预设有序排列规则；

[0108] 对各个产物的所述峰值集合T中呈离散分布的的峰值进行有序排列处理，按照从低到高的顺序进行排列。

[0109] 产物A的峰值集合T，里面的峰值数据按照从低到高进行有序排列，便于计算。

[0110] 作为本申请的一可选实施方案，可选地，在对所述峰值集合T进行有序排列处理之后，还包括：

[0111] 计算出所述峰值集合T中的相邻两个峰值之间的差值 T^δ 和最小差值 T_{\min} ；

[0112] 以所述最小峰值 T_{\min} 为基准，判断相邻两个峰值之间的差值 T^δ 是否满足：

[0113] $T^\delta > nT_{\min}$ ，n为2-2.5的自然数，

[0114] 若满足，则将当前两个相邻峰值中远离所述峰值集合T中心的峰值排除。

[0115] 产物A的峰值集合T，为 $T^A \{220, 230, 235, 240, 250, 265\}$ ，最小差值 T_{\min} 为5，n取2，仅仅250和265之间的差值超过了2倍的 T_{\min} ，因此，将远离 T^A 中心点的265排除（附图2中最高点的峰值），其峰值过大，过于离散。若是某个产物的最低点的峰值也满足，则参照上述进行处理。

[0116] 此时得到的初次降噪后的产物A的峰值集合T为： $T^A \{220, 230, 235, 240, 250\}$ 。可以用于后续二次降噪的基础。

[0117] 下面将对新的峰值集合T进行二次降噪。采用集合划分的方式，对各个子集进行均值处理，以各个子集均值构建新的峰值集合 T^* ，同样按照上述降噪方式进行处理，可以将产物A的峰值集合进行多次收敛。进行多轮收敛后，产物A的“峰簇”中将去掉较多的杂峰和峰值优化处理，趋近于真实值（中间值）。

[0118] S3、计算出所述峰值集合T中的最大峰值和最小峰值之间的差值 δ ，并按照所述差值 δ ，将所述峰值集合T划分为n个子集；

[0119] 产物A的峰值集合T为： $T^A \{220, 230, 235, 240, 250\}$ ，最大峰值和最小峰值之间的差值 $\delta = 30$ ，按照 $\delta/10 = 3$ ，将 T^A 分为三个子集： $\{220, 230\}$ 、 $\{235\}$ 、 $\{240, 250\}$ 。这里的 $\delta/10$ ，是

按照最大峰值和最小峰值之间的差值 δ 的倍数进行确定的。比如最大峰值和最小峰值之间的差值 δ 为130,则需要除以100。

[0120] S4、计算并根据所述子集的平衡值构建新的峰值集合 T^* ,按照上述方式对所述PCR熔解曲线的初始参数进行轮次收敛,得到PCR熔解曲线的矫正参数,并基于PCR熔解曲线的矫正参数重新生成PCR熔解曲线。

[0121] 作为本申请的一可选实施方案,可选地,计算并根据所述子集的平衡值构建新的峰值集合 T^* ,按照上述方式对所述PCR熔解曲线的初始参数进行轮次收敛,得到PCR熔解曲线的矫正参数,并基于PCR熔解曲线的矫正参数重新生成PCR熔解曲线,包括:

[0122] 计算出各个产物的所述峰值集合 T 中每个子集的平均峰值;

[0123] 根据所述峰值集合 T 中所有子集的平均峰值,构建与各个产物相对应的首轮峰值集合 T^* ,所述首轮峰值集合 T^* 为各个产物在熔解温度值下峰值经过首轮收敛处理得到的峰值集合。

[0124] 产物A的峰值集合 T^A 中每个子集的平均峰值计算:

[0125] 将 T^A 分为三个子集: {220,230}、{235}、{240,250},平均值依次为:225、235、245。这里的产物A的数据仅仅举例,因此数据较少,实际上峰值参数在熔解曲线图上,至少有十几个之多。

[0126] 以225、235、245,构建产物A的首轮峰值集合 $T^* \{225, 235, 245\}$,按照步骤S2中的离散值处理一次,得到产物A在熔解温度值下峰值经过首轮收敛处理得到的峰值集合。

[0127] 上述为首轮收敛,可以按照设定的方式,多次收敛,能够得到逐渐趋近于实际中心值的产物A的峰值。

[0128] 作为本申请的一可选实施方案,可选地,计算并根据所述子集的平衡值构建新的峰值集合 T^* ,按照上述方式对所述PCR熔解曲线的初始参数进行轮次收敛,得到PCR熔解曲线的矫正参数,并基于PCR熔解曲线的矫正参数重新生成PCR熔解曲线。

[0129] 预设收敛轮次条件;

[0130] 继续进行收敛处理,对首轮所述的新的峰值集合 T^* ,直到满足收敛轮次条件,停止迭代,得到最终的峰值集合 $T^\#$;

[0131] 以最终的峰值集合 $T^\#$ 为生成PCR熔解曲线的矫正参数,并导入生成PCR熔解曲线的应用中,重新生成对应的PCR熔解曲线。

[0132] 收敛轮次条件,即按照上述方式进行收敛处理的轮询次数,可以人为设定,比如5次。在程序执行时,执行5次后,停止迭代,得到最终的峰值集合 $T^\#$ 。

[0133] 最终的峰值集合 $T^\#$ 的均值,或者加权平均值,可以作为当前产物的特征峰值,进行记录保存。

[0134] 各个产物皆按照上述方式进行处理,以此生成各个产物在PCR熔解曲线的矫正参数,矫正参数即各个产物在熔解曲线中仅仅一个特征峰值。讲这些参数值,按照步骤S1中的逆顺序,导入生成PCR熔解曲线的应用中,重新生成对应的PCR熔解曲线。

[0135] 这样,PCR熔解曲线上仅仅具有各个产物的一条曲线,并无杂峰,便于后从熔解曲线上进行产物基因分型分析。

[0136] 如图5所示,为产物A经过收敛后在熔解曲线图上的曲线(圆点虚线),其峰值仅为一个。

[0137] 显然,本领域的技术人员应该明白,实现上述实施例方法中的全部或部分流程,是可以通过计算机程序来指令相关的硬件来完成的,程序可存储于一计算机可读取存储介质中,该程序在执行时,可包括如上述各控制方法的实施例的流程。本领域技术人员可以理解,实现上述实施例方法中的全部或部分流程,是可以通过计算机程序来指令相关的硬件来完成的,程序可存储于一计算机可读取存储介质中,该程序在执行时,可包括如上述各控制方法的实施例的流程。其中,存储介质可为磁碟、光盘、只读存储记忆体(Read-OnlyMemory,ROM)、随机存储记忆体(RandomAccessMemory,RAM)、快闪存储器(FlashMemory)、硬盘(HardDiskDrive,缩写:HDD)或固态硬盘(Solid-StateDrive,SSD)等;存储介质还可以包括上述种类的存储器的组合。

[0138] 实施例2

[0139] 本申请另一方面,提出一种所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法的应用,采用重新生成的PCR熔解曲线,根据曲线上的熔解温度值来进行基因分型。

[0140] 采用实施例1的重新生成的PCR熔解曲线,能够进行基因分型的精确鉴定。本实施例,优选用于叶酸代谢能力的基因型鉴定上。

[0141] 比如,利用实施例1的重新生成的PCR熔解曲线,对人类叶酸代谢能力进行基因分型。

[0142] 本发明设计两对引物和两条探针。探针两端分别带有荧光基团和荧光淬灭基团,在正常的PCR反应基础上加一个熔解曲线的反应条件,其中当温度由40℃升至95℃时,PCR仪每隔一定的温度检测一次信号,最后将收集的信号绘制出熔解曲线。荧光探针包括分子信标探针、FRET探针、Taqman探针。

[0143] 熔解曲线经过实施例1的方式进行处理后,在不对称PCR反应后进行溶解曲线分析,可因为所结合序列变化所造成的溶解曲线峰值变化,从而分辨不同的SNP位点。本实施例中其中一条探针是内参基因探针,用来指示实验是否成功,另外一条探针是检测探针,通过实验中不同的熔解温度来判断叶酸代谢能力的基因型。

[0144] 本实施例设计的引物探针序列不限定。

[0145] 本实施例的人叶酸代谢能力基因分型检测试剂盒包括PCR反应液1(引物探针混合液)&PCR反应液2(Taq酶缓冲液),所述PCR反应液包括上述的引物探针序列,引物及探针储存液的浓度范围再0.1 μ mol/L,MgCl₂终浓度选择1.5mM,等浓度的四种脱氧三磷酸腺苷(dNTPs)混合液终浓度为100nM,热启动DNA聚合酶浓度为2U/反应,利用正交试验方法,通过大量实验对比,最终确定最优的PCR反应体系见下表:

| 试剂名称 | 加入量 (u1/人份) |
|---------|-------------|
| PCR反应液1 | 7.5 |
| PCR反应液2 | 12.5 |

[0147] 注:DNA加样量为5 μ L,总反应体积为25 μ L。

[0148] 引物、探针的筛选和体系优化是本发明的重点,本发明反应体系为多重PCR,含有多条引物探针,经过多次的引物探针序列和浓度配比的实验,才最终确定本反应体系。

[0149] PCR反应条件的确定:

[0150] 经过大量的实验,确定本发明的最佳反应条件为:

| | | | |
|--------|-----------|----------------------------|---|
| [0151] | 95°C | 10min(热启动激活Taq酶活性) |  |
| | 95°C | 30sec(变性时间) | |
| | 60°C | 1min(退火延伸, 收集信号) | |
| | 95°C | 2min | |
| | 40°C | 1min | |
| | 40°C~90°C | 升温速率0.02°C/s (熔解程序段, 收集信号) | |
| | 37°C | 1min | |

[0152] 本发明人MTHFR C667T位点基因分型检测试剂盒的检测程序依次包括如下步骤:

[0153] 待测样本DNA的提取:从全血中提取基因组DNA,浓度为5~100ng/ μ L。

[0154] 荧光PCR扩增:将提取的基因组DNA作为模板进行荧光PCR扩增。

[0155] 结果判读:根据扩增曲线的CT值来判断型别,标准对照的MTHFR型质粒,可用于校正外部条件造成的实验误差。

| | | | | |
|--------|-----|--|---|---|
| [0156] | 型别 | MTHFR | MTHFR | MTRR A66G熔解峰值 |
| [0157] | | C667T熔解峰值 | A1298C熔解峰值 | |
| | 野生型 | HEX 通道 Tm1=60 \pm 1°C | CY5 通道 Tm1=61 \pm 1°C | FAM通道Tm1=65 \pm 1°C |
| | 突变型 | HEX 通道 Tm1=68 \pm 1°C | CY5 通道 Tm1=53 \pm 1°C | FAM通道Tm1=72 \pm 1°C |
| | 杂合型 | HEX 通道 Tm1=60 \pm 1°C , Tm2=68 \pm 1°C | CY5 通道 Tm1=53 \pm 1°C, 通道 Tm2=61 \pm 1°C, | FAM通道Tm1=65 \pm 1°C , Tm2=72 \pm 1°C |

[0158] 实施例3

[0159] 基于实施例1的实施原理,本申请另一方面,还提出一种实现所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法的装置,包括:

[0160] 数据包解析模块,用于获取非对称PCR反应中各个产物的PCR熔解曲线的数据包并进行解析,得到生成PCR熔解曲线的初始参数;

[0161] 数据集合模块,用于对每个产物的所述PCR熔解曲线的初始参数进行分类,得到各个产物在熔解温度值下呈离散分布的峰值集合T;

[0162] 差值计算模块,用于计算出所述峰值集合T中的最大峰值和最小峰值之间的差值 δ ,并按照所述差值 δ ,将所述峰值集合T划分为n个子集;

[0163] 轮次收敛模块,用于计算并根据所述子集的平衡值构建新的峰值集合 T^* ,按照上述方式对所述PCR熔解曲线的初始参数进行轮次收敛,得到PCR熔解曲线的矫正参数,并基于PCR熔解曲线的矫正参数重新生成PCR熔解曲线。

[0164] 上述各个模块的具体应用功能请参见上述实施例1的描述。

[0165] 上述的本发明的各模块或各步骤可以用通用的计算装置来实现,它们可以集中在单个的计算装置上,或者分布在多个计算装置所组成的网络上,可选地,它们可以用计算装置可执行的程序代码来实现,从而,可以将它们存储在存储装置中由计算装置来执行,或者将它们分别制作成各个集成电路模块,或者将它们中的多个模块或步骤制作成单个集成电路模块来实现。这样,本发明不限制于任何特定的硬件和软件结合。

[0166] 实施例4

[0167] 如图6所示,更进一步地,本申请另一方面,还提出一种电子设备,包括:

[0168] 处理器;

[0169] 用于存储处理器可执行指令的存储器;

[0170] 其中,所述处理器被配置为执行所述可执行指令时实现所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法方法。

[0171] 本公开实施例来电子设备包括处理器以及用于存储处理器可执行指令的存储器。其中,处理器被配置为执行可执行指令时实现前面任一所述的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法。

[0172] 此处,应当指出的是,处理器的个数可以为一个或多个。同时,在本公开实施例的电子设备中,还可以包括输入装置和输出装置。其中,处理器、存储器、输入装置和输出装置之间可以通过总线连接,也可以通过其他方式连接,此处不进行具体限定。

[0173] 存储器作为一计算机可读存储介质,可用于存储软件程序、计算机可执行程序和各种模块,如:本公开实施例的非对称PCR反应中的PCR熔解曲线分析方法所对应的程序或模块。处理器通过运行存储在存储器中的软件程序或模块,从而执行电子设备的各种功能应用及数据处理。

[0174] 输入装置可用于接收输入的数字或信号。其中,信号可以为产生与设备/终端/服务器的用户设置以及功能控制有关的键信号。输出装置可以包括显示屏等显示设备。

[0175] 以上已经描述了本公开的各实施例,上述说明是示例性的,并非穷尽性的,并且也不限于所披露的各实施例。在不偏离所说明的各实施例的范围和精神的情况下,对于本技术领域的普通技术人员来说许多修改和变更都是显而易见的。本文中所用术语的选择,旨在最好地解释各实施例的原理、实际应用或对市场中的技术的技术改进,或者使本技术领域的其它普通技术人员能理解本文披露的各实施例。

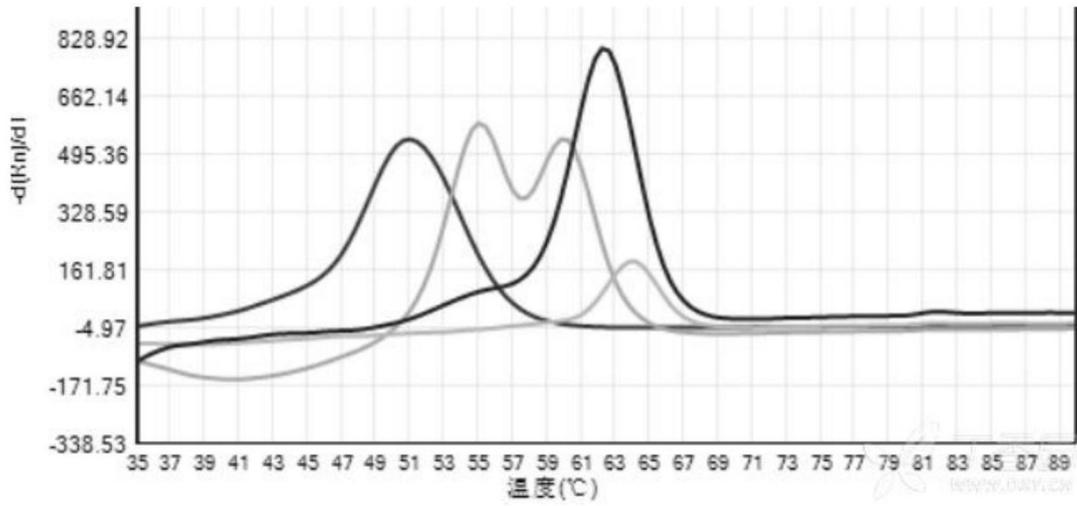


图1

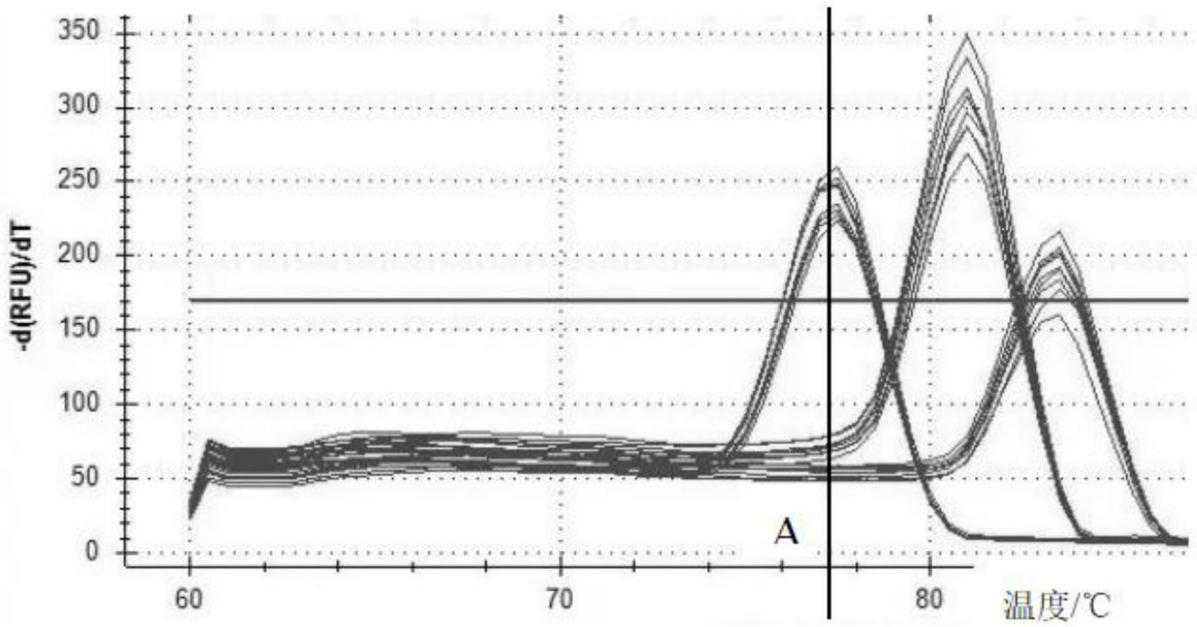


图2

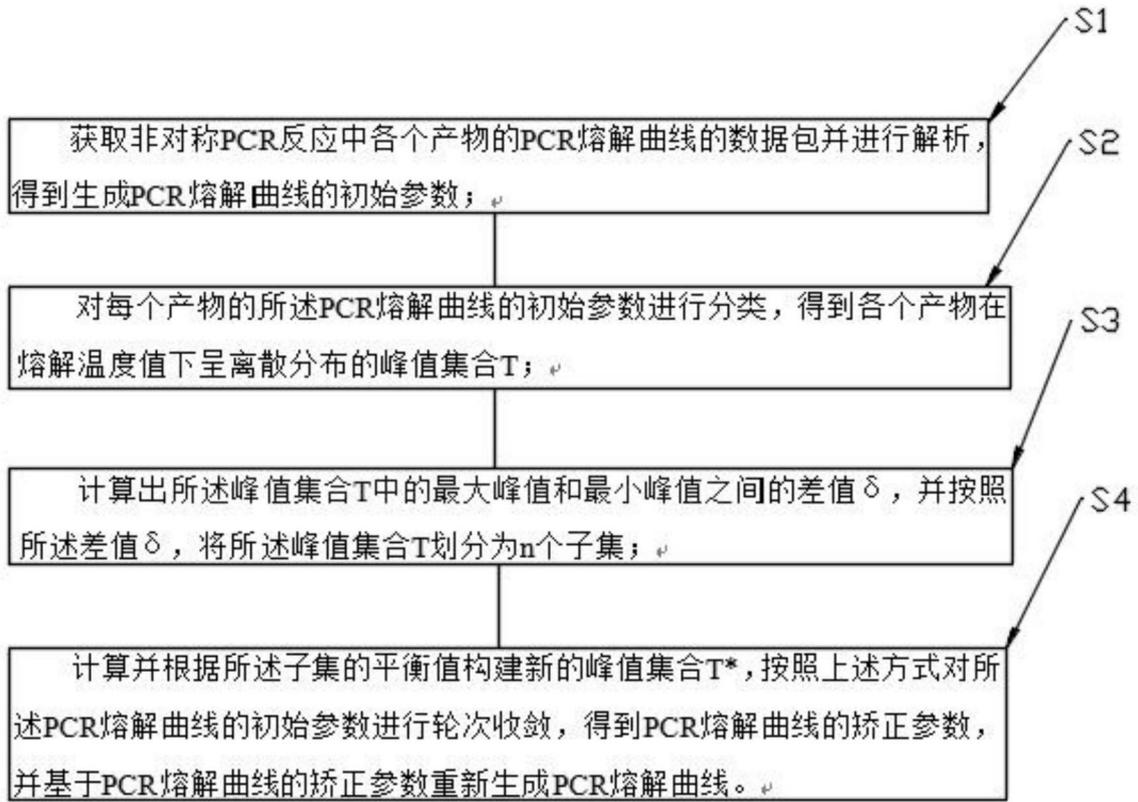


图3

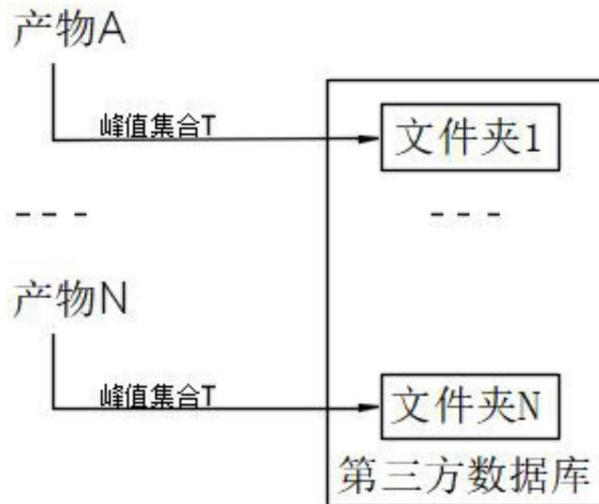


图4

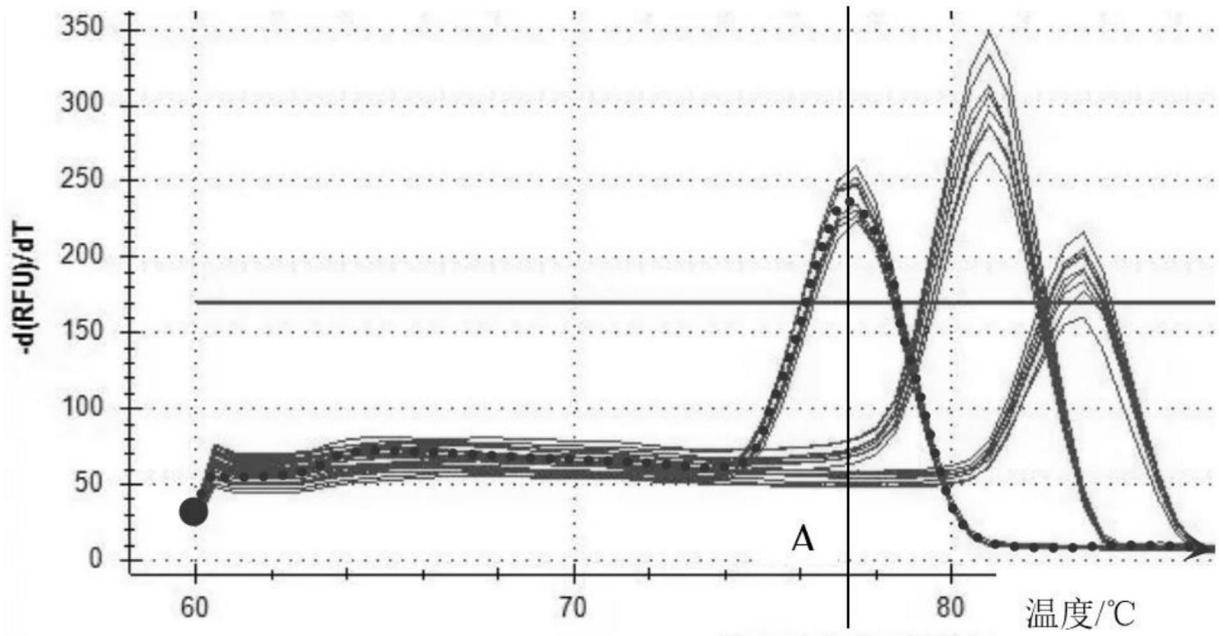


图5

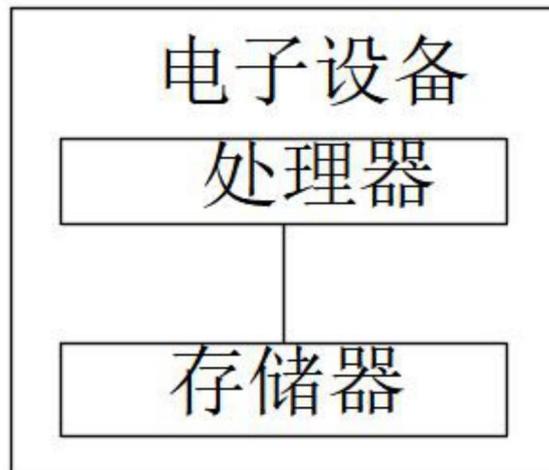


图6