

文章编号 1004-924X(2018)03-0647-07

微滴式数字 PCR 中低浓度荧光微滴分类

刘 聪^{1,2}, 董文飞¹, 张 涛¹, 周武平¹, 蒋克明¹, 黎海文^{1*}

(1. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏苏州 215163;

2. 中国科学院大学, 北京 100039)

摘要:数字 PCR 检测过程中, 确定微滴是否为阳性直接影响最终浓度, 也是影响仪器准确度的重要因素之一。目前的自动分类方法并未考虑到数字 PCR 技术中浓度对结果误差的影响, 导致在低浓度下自动设置的方法与实际结果偏差较大。本文设计了一种基于广义帕累托分布的荧光微滴分类方法, 讨论了不同浓度下误分类对结果可能的影响, 据此确定了分布模型参数, 并在自行研制的微滴式数字 PCR 仪上进行验证。实验结果显示: 经本文方法分类后, 样品中目标拷贝数在 5~5 000 的范围内线性回归的 $r_2=0.9956$, 这意味着广义帕累托分布较好地拟合了微滴荧光强度边界分布, 本文提出的荧光微滴自动分类方法在低浓度下取得了较好的效果。

关键词:数字 PCR; 广义帕累托分布; 荧光微滴分类

中图分类号:TP274.6 **文献标识码:**A **doi:**10.3788/OPE.20182603.0647

Identification of florescent droplets at low concentrations for droplet digital PCR

LIU Cong^{1,2}, DONG Wen-fei¹, ZHANG Tao¹, ZHOU Wu-ping¹,

JIANG Ke-ming¹, LI Hai-wen^{1*}

(1. *Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology,
Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China;*

2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)*

** Corresponding author, E-mail: lih@tibet.ac.cn*

Abstract: In the digital Polymerase Chain Reaction(dPCR) detection process, discriminating positive droplets from negative ones directly affect the final concentration, which is one of the important factors affecting the accuracy of the instrument. Current methods do not take into account the influence of sample concentration on the result error, resulting in a larger deviation from the actual results at a low concentration. In this paper, a florescent droplets classification method was designed based on generalized Pareto distribution. It was discussed that the possible effects of misclassification at different concentrations on the results, determined the high quantiles of generalized Pareto distribution, and verified the proposed method on the self-made droplet digital PCR. Experimental results showed that for the method proposed, the linear regression of samples with target copies from 5 to 5 000 got an $r_2=0.9956$ and a detection limit of less than 5 copies/samples, while that of the

收稿日期:2017-06-05;修订日期:2017-08-05.

基金项目:中国科学院科研装备研制资助项目(No. YZ201444);苏州市科技发展计划资助项目(No. SYG201503)

comparison method was less than 50 copies/sample. These results indicate that the proposed method improves the lower detection limit of the droplet digital PCR by one order, and can achieve automated droplet classification at ultra-low concentration.

Key words: digital PCR; generalized Pareto distribution; fluorescent droplets classification

1 引言

数字 PCR (digital PCR, dPCR) 是近年来发展十分迅速的新一代定量 PCR 仪。数字 PCR 可对目标核酸绝对定量而无需使用标准品作对照, 检测结果具有高灵敏度和较大动态范围^[1-4]。与常规定量实时 PCR 仪 (Real-time Quantitative PCR, qPCR) 相比, dPCR 可重复性更高, 对抑制剂的耐受性更强^[5]。这些优点使得 dPCR 作为分子生物学的有力工具在临床检测和科学研究中获得越来越多的应用。

基于液滴微流控技术的微滴式数字 PCR 在目前数字 PCR 中使用最为广泛, 具有分析速度快、能耗物耗低、污染小以及芯片成本低等优点^[6]。通过将标准 PCR 反应分配到大量微小的液滴中, 每个微滴中包含或不包含一个或多个拷贝的目标分子, 实现单分子模板 PCR 扩增, 扩增结束后, 通过呈现阳性信号的微滴比例和数目进行统计学分析, 当微滴数目足够大且每个微滴中的靶分子较小时, 每个微滴中含有的靶分子数目满足泊松分布, 由此可计算出靶分子的起始拷贝数浓度为:

$$\lambda = -\ln(1 - q), \quad (1)$$

其中: λ 是每个微滴中所含的平均拷贝数, q 为阳性微滴占有所有微滴的比率。

由于 dPCR 采用了与 qPCR 截然不同的绝对定量统计方法, 设置阈值以确定阳性微滴的数目直接影响最终浓度。与理想情况下阴性微滴与阳性微滴明显分开的情形不同, 多种原因可能导致阳性微滴的荧光强度降低并被错误分类为阴性, 包括 PCR 反应不充分、温度设置不当、PCR 混合物设计不好导致反应被抑制, 引物二聚体^[6-7]。另一方面, 高同源性序列、其它污染的存在可能导致阴性微滴异常升高从而被误分类为阳性。由于假阳性和假阴性的存在, 在阳性和阴性微滴群之间的过渡带中分布着部分微滴。

从检测原理上说, dPCR 能够实现目标分子

的绝对定量和超灵敏检测, 特别适合于传统荧光定量 PCR 等核酸检测技术无法很好分辨的领域, 如稀有变异检测、肿瘤早期诊断筛查及个性化治疗, 血液病毒载量分析等低浓度应用领域。有报道显示 dPCR 在低浓度检测时灵敏度高于 qPCR, 但特异性低于 qPCR^[8-9], 这意味着低浓度下假阳性对结果的影响仍有待优化。如何处理这些过渡带中被称作“rain”的微滴, 降低低浓度下假阳性的影响仍是一个尚未完全解决的问题。

目前, 有若干处理 rain 微滴和阈值设置的算法见诸报道。Mathew Jones^[10]设计的“definetherain”利用 k 最近邻分类算法 (k-Nearest Neighbor algorithm), 将微滴幅度分为两类, 位于两类中间的值被舍去。Wim Trypsteen^[11]设计的 ddpcRquant 采用广义极值分布, 利用阴性质控品确定阈值。A. Lievens^[12]则基于高斯核密度估计, 将微滴幅度分为阳性、阴性和 rain, 阈值取为阴性微滴的上界以降低假阳性的概率。这些方法在中等浓度时效果较好, 但在低浓度下往往偏差较大。本文根据微滴式数字 PCR 中阴性微滴的荧光强度分布特性建立了基于广义帕累托分布的荧光分布模型, 研究了不同浓度下误分类对结果可能的影响, 在此基础上设计了一种荧光微滴自动分类方法。

2 POT 模型和广义帕累托分布

2.1 POT 模型

设 $X_1 \cdots X_n$ 是是微滴荧光强度的随机变量序列, 假设它们独立且服从相同分布分布函数 F 。若对于某个固定的比较大的值 $u < x$,

$$F_u(x) = P(X - u \leq x \mid X > u) = \frac{F(x + u) - F(u)}{1 - F(u)}, \quad x \geq 0, \quad (1)$$

则称 $F_u(x)$ 为荧光强度 X 的超过阈值 u 的超出量的分布函数, 即超出量分布。等价地可以得到:

$$F^{[u]}(x) = P(X \leq x \mid X > u) = \frac{F(x) - F(u)}{1 - F(u)}, \quad x \geq u, \quad (2)$$

$F^{[u]}(x)F^{[u]}(x)$ 称为随机变量 X 的超阈值分布函数,超阈值分布的左端点即为阈值。

Balkema-de Haan-Pickands 定理指出如果 $F^{[u]}$ 在阈值无限趋近于荧光强度分布 F 的右端点 x^* 时存在着一个连续性的极限分布,那么该连续分布服从广义帕累托分布 $G(x; \sigma, \xi)^{[13-14]}$ 。 ξ 也称为形状参数,其值反映了分布尾部的收敛性质, ξ 越大则尾部越厚,尾分布收敛速度越缓慢。基于广义帕累托分布对超过某一阈值的所有观测数据进行极值统计建模,渐近地刻画分布的尾部特征模型称为 POT 模型。

2.2 数字 PCR 浓度计算

数字 PCR 模型基于文献^[15-16], P 表示微滴为阳性微滴的概率,其估计值为 \hat{p} 。易得 $\hat{p} = H/C$, n^+ 为阳性微滴数, n 为微滴总数, \hat{p} 是 p 的无偏估计。则样品的真实浓度可估计为:

$$\hat{\lambda} = -\ln(1 - \hat{p}) = -\ln(1 - \frac{n^+}{n}) \quad (3)$$

样品中待测物浓度为:

$$Conc = -\ln(1 - \frac{n^+}{n}) \times \frac{1000}{V_d} \quad (4)$$

其中: $Conc$ 为浓度(拷贝数/uL), V_d 为微滴体积。

2.3 数据模型

许多报道的分类方法均假设微滴的荧光分布服从正态分布,然而大量文献中的证据显示,由于受到微滴体积、其他通道荧光干扰等因素的影响,微滴的荧光强度分布是非正态的,阳性微滴和阴性微滴在靠近过渡带的一侧呈现厚尾分布。

Balkema-de Haan-Pickands 定理指出如果 $F^{[u]}$ 在阈值无限趋近于荧光强度分布 F 的右端点 x^* 时存在着一个连续性的极限分布,那么该连续分布服从广义帕累托分布 $G(x; \sigma, \xi)^{[17-18]}$ 。 ξ 也称为形状参数,其值反映了分布尾部的收敛性质, ξ 越大则尾部越厚,尾分布收敛速度越缓慢。

可以注意到处于过渡带中的发生概率很小的微滴又可以看成阴性微滴的超阈值样本,理论上同批次实验中的无模板质控(No-template control, NTC)样品与待测样品中阴性微滴荧光强度分布特性应完全一致,分析 NTC 样品的荧光强度上限即可确定待测样品中阴性微滴分布上限。因此通过对 NTC 样品进行广义帕累托分布拟合即可确定阴性微滴的极端值。

为了估计广义帕累托分布,选取合适的超出量阈值是重要一步。如果阈值取值过大,那么拟合将是建在极少观察值的基础上,通过这种方式得到的参数估计结果,往往能够保证偏差比较小,但是由于考虑的观察值少,会导致很大的方差;相反,如果阈值选的过小,那么定理的条件可能就不满足,超出量的极限分布也就不一定是广义帕累托分布。

根据 NTC 样本的均值和标准差对数据集中的 NTC 样本研究 4 种超出量阈值: $\mu, \mu + \delta, \mu + 2\delta, \mu + 3\delta$, 其中 μ 为数据均值, δ 为数据标准差。使用 r 语言中的 Kolmogorov-Smirnov 检验函数 $ks.test$ 进行拟合优度检验。结果显示,当超出量阈值在 $\mu + \delta$ 时, P -value 大于 0.05, 可以认为此时的超出量满足 gpd 分布,如表 1 所示。其中: Th 为阈值, k 为超阈值的个数, $\hat{\xi}$ 为形状参数的估计, $\hat{\sigma}$ 为尺度参数的估计, $K-S$ P -value 为 $K-S$ 检验的伴随概率值。同时还可以看到,形状参数的估计值 $0 < \hat{\xi} < 1$, 这说明该尾部分布是厚尾的。

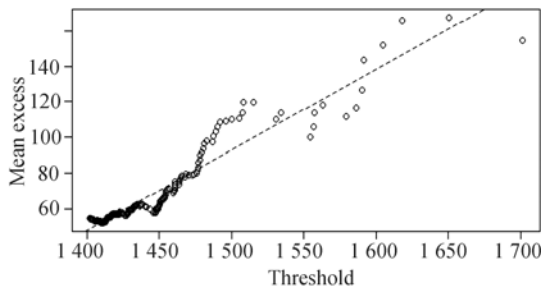
表 1 NTC 荧光强度的广义帕累托分布参数估计效果
Tab.1 Generalized Pareto distribution parameter estimation effect of NTC fluorescence intensity

Th	k	$\hat{\xi}$	$\hat{\sigma}$	K-S P-value
μ	79 09	-0.025	54.801	0.003 4
$\mu + \delta$	2 380	0.053	46.347 1	0.491 5
$\mu + 2\delta$	599	0.109	46.742	0.477 5
$\mu + 3\delta$	184	0.196	43.538	0.360 0

阈值选定后,需对广义帕累托分布拟合状况进行诊断。图 1(a)为平均超出量图,图 1(b)为分位数-分位数(Quantile-Quantile, QQ)图。QQ 图是用变量数据分布的分位数与指定分布的分位数之间的关系绘制的图形。如果尾部对广义帕累托分布拟合状况较好,那么平均超出量图和 QQ 图近似为一条斜率向上的直线。从图 1 中可以看出,各散点数据基本紧密围绕各参考线分布,表明拟合状态良好。

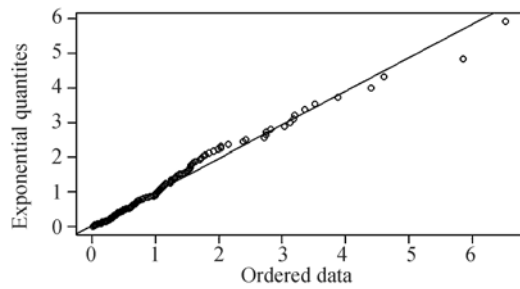
2.4 分位数的选取

高分位数的选取是极值分析中的重要内容。由于假阳性率又能看作阴性微滴被误判为阳性的



(a)平均超出量图

(a) Mean excess plot



(b)QQ 图

(b) QQ plot

图 1 广义帕累托分布拟合诊断图

Fig. 1 Diagnostic graphs of generalized Pareto distribution fitting

概率,这也意味着估计阴性微滴分布的高分位数又可以被看作能容忍的假阳性率。

假设在根据泊松公式用 P 计算 λ 时混入了固定比例(1%和 0.1%)的假阳性率(False Positive Rate, FPR)和假阴性率(False Negative Rate, FNR),计算加入假阳性和假阴性后的 λ 与真实 λ 的相对误差(相对误差:被假阳性和假阴性影响后的实际值 λ' 与理论浓度 λ 的误差与 λ 之比)。

$$B_r = \frac{\lambda' - \lambda}{\lambda}. \quad (5)$$

由图 2 可知,不同 FNR 和 FPR 的组合均存在在一个相对误差较小的最优化浓度区间,FPR 越大,检测结果越被高估,同时检测下限将被提高;FNR 越大,检测结果越被低估,同时检测下限将被降低。此外低浓度下 FPR 对相对偏差的影响越大,而 FNR 的影响很小,而高浓度下则刚好相反。由于数字 PCR 的检测特性,通常情况下数字 PCR 应用于中低浓度区间内,因此更多地关注 FPR 的影响。

假设微滴总数 $n = 20\ 000$, $FNR = 0.1\%$,如果需要使相对误差小于 10%,当 $FPR = 0.1\%$ 时,

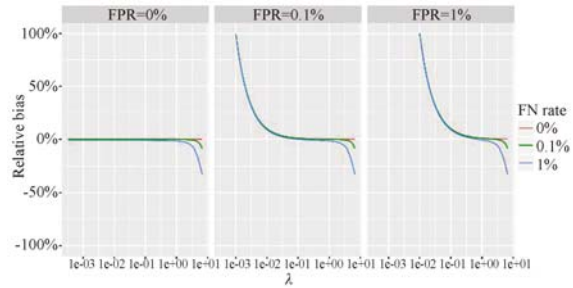


图 2 误分类对样品浓度估计的影响

Fig. 2 Relative bias of target concentration estimates effected by misclassification

$\lambda > 0.01$; 而当 $FPR = 1\%$ 时, $\lambda > 0.1$ (如图 2 所示)。这一结果意味着为了使得相对误差保持在给定值下,不同浓度下 FPR 的容许值也不同。

进一步地研究浓度与 FPR 之间存在的关系,由于泊松公式的计算比较复杂,直接计算在中等浓度以上是比较困难的。但在低浓度下,由泊松公式的泰勒展开可知,可以将阳性微滴比例作为 λ 的近似。如果将 λ 与阳性微滴的比例 q 误差小于 1% 时认为是低浓度样品,此时 $\lambda < 0.019\ 94$ 。对 20 000 个微滴的数字 PCR 平台而言,意味着阳性微滴总数约 400 个。

如果希望相对误差小于 10%,则:

$$\frac{\lambda' - \lambda}{\lambda} < B_0 = 10\%.$$

低浓度时,有:

$$\lambda \approx p, \lambda' \approx p + fpr \times (1 - p) - fnr \times p.$$

那么:

$$\frac{\lambda' - \lambda}{\lambda} \approx \frac{fpr \times (1 - p) - fnr \times p}{p} < B_0$$

$$fpr < (B_r + fnr) \times p(1 + p), \quad (6)$$

由上式可知,低浓度下假阳性率 FPR 的上限由阳性微滴的比例 p 与 B_r 和 FNR 之和决定。假设 $B_0 = 10\%$, $FNR = 0.1$, $p = 0.02$,则 $FPR < 0.004\ 1$ 。当 $\lambda < 0.02$ 时,FPR 亦应随之降低。当 $\lambda > 0.02$ 时,如果 FPR 维持在 0.004,FNR 保持不变,则 B_r 随之降低。当讨论对象为阴性微滴数据时,可以认为 FPR 就是超出待阈值的微滴个数。基于上述考虑,确定高分位数的方法是:

$$quant = \begin{cases} 0.996, & fpr_u > 0.004 \\ 1 - (B_r + fnr) \times p(1 + p), & else. \\ 0.999\ 99, & fpr_u < 10^{-5} \end{cases} \quad (7)$$

2.5 荧光微滴分类算法

根据上述分析,假设 NTC 样本在高于某一阈值时服从广义帕累托分布,据此设计了荧光微滴分类算法,算法流程如下:

(1) 预处理

根据输入的预置参数剔除阳性数据,使用数据均值作为基准线将数据均值归零;

(2) 处理 NTC 数据 X_0 和模型参数估计

设 μ 为 X_0 的均值, δ 为 X_0 的标准差,选择超出量阈值参数 $u = \mu + 3\delta$,使用 R 语言 `evir` 工具包的 `gpd()` 函数对 X_0 的超出量进行广义帕累托分布拟合并获得模型估计值 $\hat{\sigma}\hat{\xi}$ 。通过 Kolmogorov-Smirnov 检验评估拟合优度,若 $p > 0.3$ 且 $F^{[u]}$ (x) 样本数大于 100,则获得估计的 $\hat{\sigma}\hat{\xi}$,否则降低 u 并再次重复上述过程;

(3) 分位数 $quant$ 估计

将待测样本的基准值从其所有强度数据中扣除,随后根据输入的预置参数估计阳性微滴的数目,根据式(7)计算分位数 $quant$;

(4) 样本浓度计算

根据广义帕累托分布函数 $G(x; \sigma, \xi)$ 及分位数 $quant$ 计算荧光强度作为判决阈值 I_{th} ,所有荧光强度大于此阈值的微滴为阳性微滴。由每微滴中平均目标拷贝数 $\hat{\lambda}$ 及样品目标拷贝数浓度 $Conc$ 可分别由式(3)和式(4)计算。

3 实验和讨论

3.1 实验数据

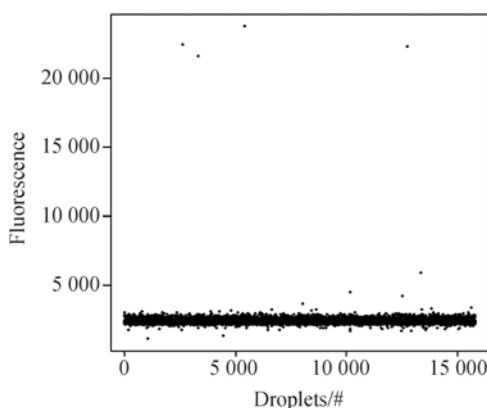
本文中数据使用 KRAS 质粒样品在自行研制的数字微滴 PCR 仪中进行绝对定量检测获得。实验操作过程如下:

(1) 样品制备:将原始浓度为 5 000 cps/ μ L 的质粒样品梯度稀释为 500、50、5 cps/ μ L,然后以 Kras 梯度浓度稀释液和阴性对照为样品配制 PCR 反应液,各浓度样品重复 3 次,阴性对照样品重复 5 次;

(2) 配置完成的反应液制备样品微滴后放入 PCR 扩增仪进行扩增。热循环设置如下:5 min 95 °C, 40 \times (30 s 94 °C, 1 min 60 °C), 10 min 98 °C;

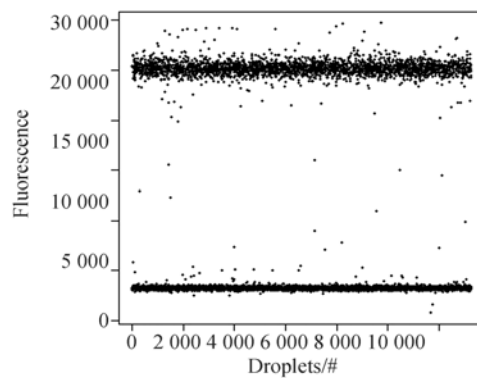
(3) 扩增完成后的样品在自行研制的数字微滴 PCR 仪中进行的绝对定量检测,检测数据保存后通过 R 版本 3.3.2 进行处理。

最后获得的微滴荧光强度信号散点图如图 3 所示。



(a) 低浓度

(a) Low concentrations



(b) 高浓度

(b) High concentrations

图 3 低浓度和高浓度下样品荧光强度分布

Fig. 3 Fluorescence intensity distribution at low and high concentrations

3.2 检测结果对比

算法在前述数据集上进行了验证,作为对比,同时使用文献^[12]中的 `definetherain` 进行检测。图 4 显示了两种方法的期望浓度—实际浓度响应曲线。对各样本点进行最小二乘法线性拟合,经过拟合优度检验,本文方法的 R^2 值为 0.997 4,表明此拟合的线性关系有效反应期望浓度与实际浓度的线性关系,检测下限低于 5 拷贝数/样品。此线性关系中,当浓度为 5 拷贝数/样品时,由于阳性样本过于稀少, `definetherain` 未能将数据分为两类,因此该方法的检测下限低于 50 拷贝数/样品。选择样品浓度在 50 和 5 000 的 3 次测量结果在表 2 中列出。

表 2 高浓度和低浓度下对两种算法检测结果

Tab. 2 Performance of two classification methods at low and high concentrations

浓度(拷贝数/样品)	本文方法			definetherain		
	1#	2#	3#	1#	2#	3#
5 000	5 420.31	5 149.15	4 601.92	5 413.42	5 061.88	4 566.85
50	48.023 6	51.918 4	46.977 1	39.809 8	38.310 1	39.534 7

可以看到,当浓度为 5 000 拷贝数/样品的高浓度样品时,两种方法获得结果的差异不大,本文方法的检测平均值比 definetherain 高约 1%,由图 2 可知这是由于在较高浓度下检测结果对误分类的误差并不敏感。当浓度为 50 拷贝数/样品的低浓度时,由于 definetherain 将过渡带中的点滤除,但由于过渡带中阳性微滴与阴性微滴的比例

并不等同于实际浓度,造成检测结果平均较理论结果低 21.56%。图 4(a)中,definetherain 计算结果的线性回归(95%置信区间,图中蓝色回归线阴影部分)在低浓度下偏离了“ $x=y$ ”的预期基准线,而在图 4(b)中,由本文方法所计算的样本结果的线性回归覆盖了所有浓度梯度的检测样品。这证明了该方法在低浓度下优于 definetherain。由此可以进一步设计更全面的分类算法框架,在获取实验数据后首先评估该次实验质量,根据 rain 的比例、两类微滴的中心间距以及预估样品浓度等因素进行判断并选择合适的方法进行分类。

4 结 论

现有的文献中对荧光微滴进行的正态分布的假设并不能对数据进行很好地拟合。利用极值理论中的超阈值分布模型,本文对数字 PCR 阴性微滴强度数据进行分析。结果表明,选择超出量阈值大于 $\mu + \delta$ 时, Kolmogorov-Smirnov 拟合优度检验的伴随概率 $p > 0.05$, 表明广义帕累托分布拟合效果较好。

基于泊松统计的特点,确定阈值需要的广义帕累托分布高分位数与样品浓度有关。本文给出了高分位数在低浓度下的有关因素,包括阳性微滴的比例、可容忍的相对误差及假阴性率。当 $\lambda < 0.02$ 时,提高高分位数值可以提高分类阈值,从而降低假阳性率引入的误差。检验 KRAS 梯度稀释样品而获得的数据表明,样品中目标拷贝数低于 50 时本文方法优于 definetherain。

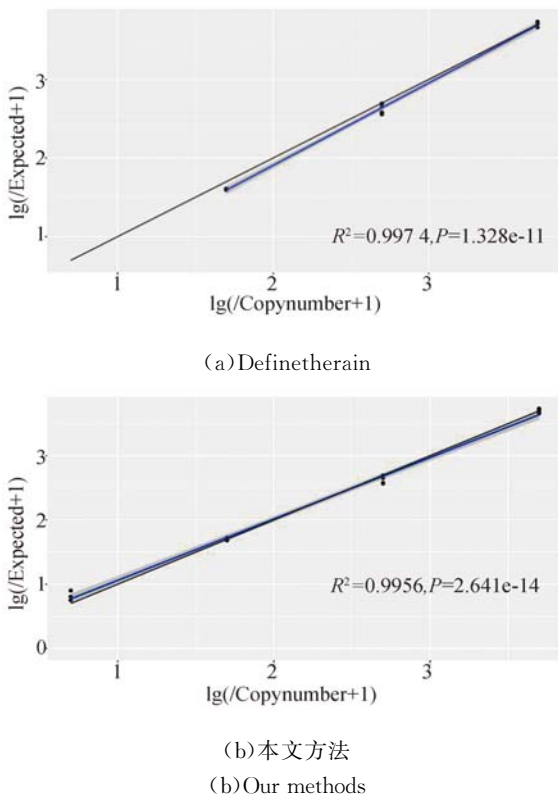


图 4 Definetherain 和本文方法的检测结果对比

Fig. 4 Comparison of the results obtained by definetherain and our methods

参考文献:

- [1] VOGELSTEIN B, KINZLER K W. Digital PCR [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999,

96(16): 9236-9241.

- [2] HUGGETT J F, FOY C A, BENES V, et al.. The digital MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments[J]. *Clinical Chemistry*, 2013, 59(6): 892-902.

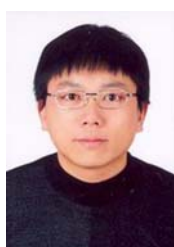
- [3] PERKEL J M. The digital PCR revolution[J]. *Science*, 2014, 344(6180): 212-214.
- [4] 詹成, 燕丽, 王琳, 等. 数字 PCR 技术的发展和应
用[J]. 复旦学报(医学版), 2015, 42(6): 786-789.
ZHAN CH, YAN L, WANG L, *et al.*. The devel-
opment and application of digital PCR[J]. *Fudan*
University Journal of Medical Sciences, 2015, 42
(6): 786-789. (in Chinese)
- [5] STRAIN M C, LADA S M, LUONG T, *et al.*.
Highly precise measurement of HIV DNA by droplet
digital PCR[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e55943.
- [6] 刘勇, 钱鸿鹤, 朱灵, 等. 微流控实时荧光聚合酶
链式反应成像非均匀性的校正[J]. 光学精密工
程, 2013, 21(8): 2161-2168.
LIU Y, QIAN H H, ZHU L, *et al.*. Nonuniformity
correction for fluorescence imaging of microfluidic
real-time PCR[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2013, 21
(8): 2161-2168. (in Chinese)
- [7] HINDSON B J, NESS K D, MASQUELIER D A,
et al.. High-throughput droplet digital PCR system
for absolute quantitation of DNA copy number[J].
Analytical Chemistry, 2011, 83(22): 8604-8610.
- [8] PEKIN D, SKHIRI Y, BARET J C, *et al.*. Quan-
titative and sensitive detection of rare mutations us-
ing droplet-based microfluidics[J]. *Lab on a Chip*,
2011, 11(13): 2156-2166.
- [9] HENRICH T J, GALLIEN S, LI J Z, *et al.*. Low-
level detection and quantitation of cellular HIV-1
DNA and 2-LTR circles using droplet digital PCR
[J]. *Journal of Virological Methods*, 2012, 186
(1-2): 68-72.
- [10] 柳方方, 张玲, 王晶, 等. 数字 PCR 测定 DNA 含
量及测量结果不确定度评定[J]. 化学分析计量,
2013, 22(1): 18-22.
LIU F F, ZHANG L, WANG J, *et al.*. Quantifi-
cation of DNA by digital polymerase chain reaction
and uncertainty evaluation of determination result
[J]. *Chemical Analysis and Meterage*, 2013, 22
(1): 18-22. (in Chinese)
- [11] JONES M, WILLIAMS J, GÄRTNER K, *et al.*.
Low copy target detection by droplet digital PCR
through application of a novel open access bioinform-
atic pipeline, 'definetherain'[J]. *Journal of Viro-
logical Methods*, 2014, 202: 46-53.
- [12] TRYPSTEEN W, VYNCK M, DE NEVE J, *et*
al.. ddpcRquant: threshold determination for sin-
gle channel droplet digital PCR experiments[J].
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015,
407(19): 5827-5834.
- [13] LIEVENS A, JACCHIA S, KAGKLI D, *et al.*.
Measuring digital PCR quality: performance pa-
rameters and their optimization[J]. *PLoS One*,
2016, 11(5): e0153317.
- [14] JACOBS B K M, GOETGHEBEUR E, CLEM-
ENT L. Impact of variance components on reliabil-
ity of absolute quantification using digital PCR[J].
BMC Bioinformatics, 2014, 15: 283.
- [15] MAJUMDAR N, WESSEL T, MARKS J. Digital
PCR modeling for maximal sensitivity, dynamic
range and measurement precision[J]. *PLoS One*,
2015, 10(3): e0118833.
- [16] PINHEIRO L B, COLEMAN V A, HINDSON C
M, *et al.*. Evaluation of a droplet digital polymer-
ase chain reaction format for DNA copy number
quantification[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84
(2): 1003-1011.
- [17] BALKEMA A A, DE HAAN L. Residual life
time at great age[J]. *The Annals of Probability*,
1974, 2(5): 792-804.
- [18] PICKANDS J. Statistical-inference using extreme
order statistics [J]. *The Annals of Statistics*,
1975, 3(1): 119-131.

作者简介:



刘 聪(1984—),男,江苏盐城人,助理
研究员,2006年、2011年于复旦大学分
别获得学士、硕士学位,主要从事数字
PCR 检测系统信号处理算法方面的研
究。E-mail: liucong84@163.com

通讯作者:



黎海文(1976—)男,博士,研究员,2002
年、2005年于中国科学院长春光学精
密机械与物理所分别获得硕士、博士学
位。现任中国科学院生物医学检验技
术重点实验室副主任,主要从事基于微
流控技术的核酸检测仪器的应用研究。
E-mail: lihwa@sibet.ac.cn