

技术与方法

利用HRM技术区分ob糖尿病小鼠不同基因型

刘甦苏 周舒雅 左琴 王辰飞 贺争鸣 李保文 刘佐民 范昌发*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100059)

摘要 ob/ob小鼠是糖尿病相关研究中使用最广泛的动物模型之一, 近年来, 市场需求呈上升趋势。与野生型小鼠相比, 其瘦素蛋白基因105号密码子发生C>T点突变, 导致不能产生正常的瘦素蛋白。该模型4周前外观表型与野生型无异, 而ob/ob纯合子不育, 因而在繁殖建系过程中, 需要通过基因型鉴定纯合、杂合和野生三种基因型。该文建立了基于高分辨率溶解曲线分析(high resolution melting analysis, HRM)的基因型鉴定方法, 基因型分型结果与常规PCR加酶切方法一致, 也与DNA测序结果吻合; 通过该方法分型后获得纯合子小鼠外观表型、血糖浓度参数符合预期。该方法较常规方法省时、高效、节省实验成本, 可用于大规模ob小鼠繁殖中的基因型鉴定。

关键词 ob小鼠; 基因型鉴定; HRM

Efficient Genotyping ob Mice Using High Resolution Melting Analysis

Liu Susu, Zhou Shuya, Zuo Qin, Wang Chenfei, He Zhengming, Li Baowen, Liu Zuomin, Fan Changfa*

(National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100059, China)

Abstract The ob/ob mouse is a well-characterized model of obesity in diabetes research, and market demands are increasing in recent years. For the C>T transition occurred in ob mouse, normal leptin protein cannot be produced. The ob homozygous mouse has similar exophenotype with wild type before 4 weeks old, and ob/ob mouse is sterile and breeding of complete knockouts is impractical. Thus, fertile heterozygotes must be identified by genotyping methods to maintain efficient breeding colonies for the production of wild type, heterozygous and homozygous test animals. Here we described a new genotyping method based on high resolution melting analysis (HRM). The identification results by HRM are consistent with that of conventional PCR products gel-based method and DNA sequencing. The ob mice have expected exophenotype and blood glucose parameter when observed at 8 weeks old. This method is rapid, efficient and economical compared with other genotyping techniques.

Key words ob mice; genotyping; high resolution melting analysis

我国糖尿病患者数量庞大, 总数已经超1亿^[1], 且随着人口老龄化、城市化进程加快, 数量还在增加, 成为国家和个人巨大的医疗负担^[2]。ob小鼠是由于105号密码子发生C>T点突变, 导致不能产生正常的瘦素蛋白。该模型4周前外观表型与野生型无异, 而ob/ob纯合子不育, 因而在繁殖建系过程中, 需要通过基因型鉴定纯合、杂合和野生三种基因型。该文建立了基于高分辨率溶解曲线分析(high resolution melting analysis, HRM)的基因型鉴定方法, 基因型分型结果与常规PCR加酶切方法一致, 也与DNA测序结果吻合; 通过该方法分型后获得纯合子小鼠外观表型、血糖浓度参数符合预期。该方法较常规方法省时、高效、节省实验成本, 可用于大规模ob小鼠繁殖中的基因型鉴定。

收稿日期: 2014-05-06 接受日期: 2014-06-06

国家科技支撑计划(批准号: 2013BAK11B02)和中国食品药品检定研究院中青年中青年发展研究基金(批准号: 2012B5)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-67678484, E-mail: fancf@nifdc.org.cn

Received: May 6, 2014 Accepted: June 6, 2014

This work was supported by National Key Technology Support Program (Grant No.2013BAK11B02) and Science Foundation for Middle-aged and Young Scientist of National Institutes for Food and Drug Control (Grant No.2012B5)

*Corresponding author. Tel: +86-10-67678484, Email: fancf@nifdc.org.cn

网络出版时间: 2014-09-23 14:19 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.0149.html>

码子发生C>T的点突变,导致不能产生正常的瘦素蛋白,从而表现出肥胖、摄食过量、糖尿病类高血糖症、葡萄糖耐受、低生育力等症状^[3]。该小鼠模型已广泛用于II型糖尿病相关的机理研究和药物评价中,在科研和药物研发领域有着较广泛的用途。

建立ob小鼠繁殖种群涉及三种基因型:野生型(wild type, WT),目前多用C57BL/6小鼠;杂合子(ob/+), *lep*基因含一个单点突变(C/T),与野生型具有相同的外观表型,能正常繁殖;纯合子(ob/ob), *lep*基因中均发生突变(T/T),表现为肥胖,直接用于多数实验中,但不能正常繁殖。繁殖建系过程中,采用杂合子间交配,用不同的基因型鉴定方法区分野生型、杂合子和纯合子。野生型淘汰,杂合子用于繁殖建系,而纯合子作为动物模型供使用。目前常用的基因型鉴定方法有限制性片段长度多态性^[4]、焦磷酸测序^[5]、端点分析法(end-point analysis)^[6]以及基于PCR的基因型鉴定方法^[7]等。这些方法不仅需要昂贵的设备,而且成本高、时间长,不能满足规模化生产中对大量样品快速基因型鉴定的需求。

高分辨率溶解曲线分析(high resolution melting analysis, HRM)方法是近期建立起来的在实时荧光定量PCR的基础上通过饱和染料监控核酸的溶解曲线变化进行分析的一种新兴分子诊断方法,已经用于单点突变引起的疾病的筛查^[8]、细菌耐药性筛选等^[9]。本文描述了HRM技术在ob小鼠基因型鉴定中的应用。该方法省时、省事、经济,能用较短时间处理大量的样品,不影响准确率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及实验环境 ob小鼠(B6.V-Lepob/J, Jackson lab stock No.000632)引自南京大学模式动物研究所,生产群饲养于国家啮齿类实验动物种子中心[生产许可证号:SCXK(京)2009-0017]屏障环境。在出生3周剪尾,提取DNA,用不同方法鉴别野生型(WT)、杂合子(het, ob/+)和纯合子(homo, ob/ob)

ob小鼠。本实验在中国食品药品检定研究院实验动物伦理委员会监督下进行。

1.1.2 试剂与耗材 Tris平衡酚购于天津灏洋生物制品公司, RNase A、*Tag*酶(Cat: R001A)和蛋白酶K购于宝生物工程(大连)有限公司, *Dde* I内切酶购自于Sigma公司。常见分析纯生化试剂如乙醇、异戊醇、异丙醇、氯仿购于北京化学工业集团有限公司。用于高分辨率溶解曲线分析的试剂为LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Cat: 04909631001)。PCR板及封板膜、血糖测定试纸(ACCU-CHEK Performa金锐型)购于Roche公司。

1.1.3 主要仪器 主要仪器包括ABI Veriti DNA扩增仪、Roche LightCycler® 480 II荧光定量PCR仪、Thermo NanoDrop 2000微量紫外分光光度计和Roche ACCU-CHEK Performa血糖仪。

1.2 方法

1.2.1 鼠尾基因组DNA提取及定量 苯酚抽提法提取鼠尾基因组DNA,计算得率和纯度。将 $D_{260}:D_{280}$ 比值在1.8~2.0范围的DNA样本统一稀释至25 ng/mL,作为HRM-PCR反应模板。

1.2.2 引物设计及HRM分析 根据Genbank上*Lep^{ob}*基因序列(Gene ID: 16846),在发生C>T突变的105号密码子附近设计引物,扩增含突变SNP(single nucleotide polymorphism)位点的目的片段(表1)。引物由北京诺赛基因公司合成,稀释至10 μmol/L, -20 °C保存备用。

HRM分析的PCR体系为25 ng的基因组DNA、1×PCR Master mix、2.0 mmol/L MgCl₂、0.2 μmol/L的正反向引物,灭菌超纯水补足至20 μL,设3个复孔。反应条件为:95 °C预变性10 min;然后95 °C 30 s, 62 °C 1 min, 72 °C 45 s, 40个循环。升温 and 降温过程温度变化率分别为4.4 °C/s和2.2 °C/s。HRM分析条件为:95 °C 1 min, 40 °C 1 min, 溶解曲线数据收集从70 °C到95 °C,温度上升率为0.02 °C/s,且每升高1 °C进行25次数据采集。两步均在LightCycler® 480 II荧光定量分析仪上完成。

表1 *Lep^{ob}*基因的普通PCR及HRM引物

Table 1 *Lep^{ob}* gene primers for conventional PCR and HRM

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	片段长度(bp) Sequence size (bp)
<i>Lep^{ob}</i> -F	TGT CCA AGA TGG ACC AGA CTC	
<i>Lep^{ob}</i> -R	ACT GGT CTG AGG CAG GGA GCA	155

1.2.3 基于普通PCR加酶切的基因型鉴定 常规基因型鉴定方法为PCR加酶切, 本文用于验证HRM分型结果。根据表1引物, PCR扩增*Lep^{ob}*基因含突变SNP位点的目的片段155 bp, 用*Dde* I酶切, 产物经3%琼脂糖凝胶电泳分型, 野生型为155 bp, 杂合子有155, 100, 55 bp三条带, 而纯合子为55, 100 bp两条带。PCR体系为25 ng的基因组DNA, 其他组分按Tag酶说明书配制, 补水至20 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.4 DNA测序验证基因型 将野生型、杂合子和纯合子ob小鼠的基于普通PCR的155 bp的扩增片段, 送测序公司正反向引物测序。采用Chromas软件分析测序图谱, 分析*Lep^{ob}*基因的单点突变。

1.2.5 饲喂观察 将3周龄、通过HRM法分型的野生型、杂合子、纯合子小鼠, 继续饲喂至8周, 观察其外观变化。

1.2.6 血糖测定 鉴于糖尿病小鼠血糖代谢紊乱, 有别于野生型和杂合子小鼠, 选取野生型、杂合子和纯合子ob小鼠, 抽取尾尖血, 测定禁食前和过夜禁食12 h后血糖值, 每5 d一次, 共检测一个月, 以确认HRM基因型分型后种群的特性。

1.2.7 数据统计 应用Excel软件进行统计, 采用独立样本*t*检验进行数据分析。数据用平均值 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 利用HRM分析能准确区分三种基因型

因野生型(WT)、杂合子((het, ob/+))和纯合

子(homo, ob/ob)具有不同的碱基组成^[7], 其DNA的*T_m*(melting temperature)不同, 分别为85.87 $^{\circ}$ C、85.62 $^{\circ}$ C和85.58 $^{\circ}$ C。在本实验建立的优化条件下(优化条件见下文), 能准确地区分3种基因型(图1)。

2.2 Mg²⁺浓度优化和加入野生型DNA有助于提高分辨率

Mg²⁺浓度会影响扩增效率和分辨率^[13], 故本实验对Mg²⁺浓度进行优化, 以期获得最佳的效果。在1.0 mmol/L和1.5 mmol/L时, PCR反应未进行完全, 不能达到平台期(图2A-I, II); 而在2.0 mmol/L下, 扩增曲线达到平台区(图2A-III), 故本实验Mg²⁺浓度确定为2.0 mmol/L。

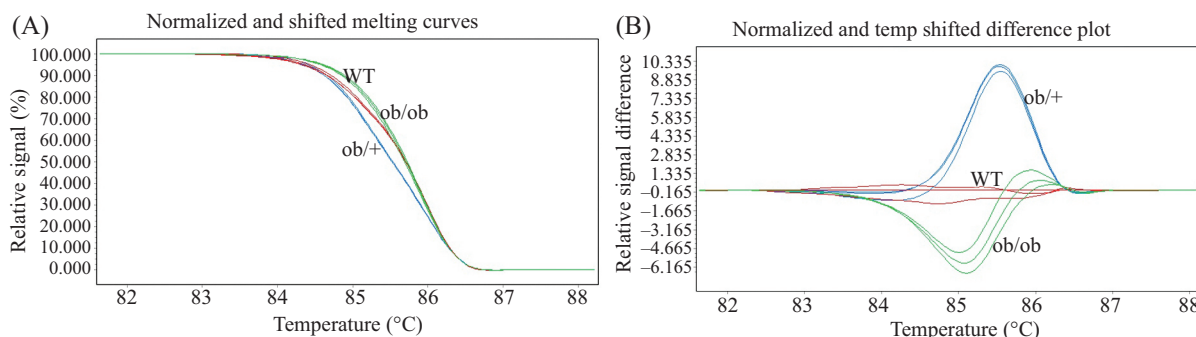
在多次实验中发现, 有时杂合子与纯合子之间不易区分; 而将一定浓度的野生型DNA混入后, 发现能提高分辨率。分别比较了混入10%、15%和20%的野生型DNA后的效果, 发现混入10%时(图2B), 杂合子与纯合子不易区分, 而提高到15%(图2C)或者20%(图2D)后, 3种基因型能准确区分。为节省样品并兼顾实验效果, 本实验确定混入15%的野生型DNA。

2.3 HRM分型与常规分型、DNA测序结果一致

将通过HRM已分型基因组3种基因型DNA样本, 再次按照常规PCR加酶切的方式^[7]分型验证, 并结合DNA测序验证。实验表明, HRM分型结果与常规分型方法一致(图3A), 也与测序验证的结果一致(图3B~图3D), 这表明HRM分型结果准确。

2.4 经HRM法鉴定的3种基因型表型符合预期

因在小鼠3周龄左右即开始采用HRM分型, 此时ob杂合与纯合小鼠与野生型外观表型无异。为了

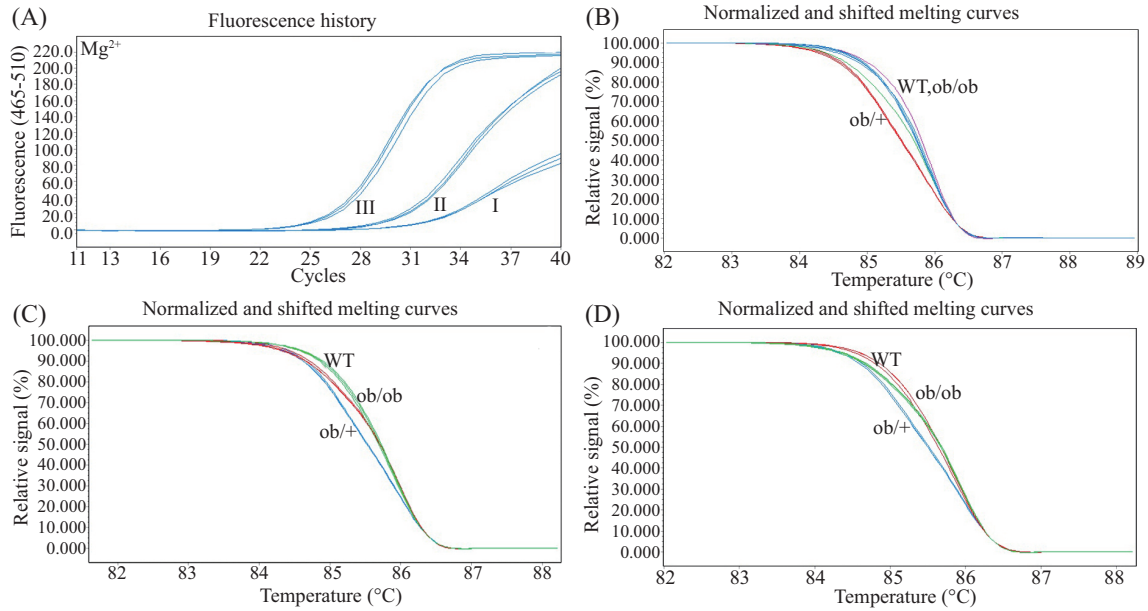


A: 三种基因型HRM熔解曲线; B: 坐标轴变换后的HRM熔解曲线; 红色为野生型 (WT), 绿色为纯合子(homo, ob/ob), 蓝色为杂合子(het, ob/+), 扩增条件为Mg²⁺ 2.0 mmol/L, 并加入15%的野生型DNA。

A: fluorescence normalized high resolution melting curves of three genotypes; B: difference plot; wild type (red), ob/ob (green), and ob/+ (blue) animals. In the PCR solutions, 2.0 mmol/L of Mg²⁺ and 15% of wild type DNA were added.

图1 利用高分辨率溶解曲线(HRM)分析方法对ob小鼠的基因型分型结果

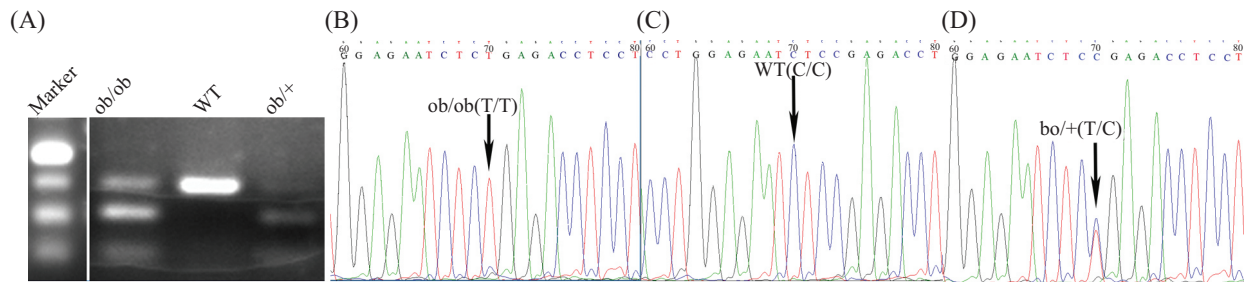
Fig.1 Genotyping results for ob mice by high resolution melting curves analysis method



A-I: 1.0 mmol/L Mg^{2+} 浓度扩增曲线; A-II: 1.5 mmol/L Mg^{2+} 终浓度扩增曲线; A-III: 2.0 mmol/L Mg^{2+} 终浓度扩增曲线。B: ob小鼠的基因组DNA中混合入10%野生型样本; C: ob小鼠的基因组DNA中混合入15%野生型样本; D: ob小鼠的基因组DNA中混合入20%野生型样本。
A-I: high resolution melting curve with 1.0 mmol/L Mg^{2+} ; A-II: high resolution melting curve with 1.5 mmol/L Mg^{2+} ; A-III: high resolution melting curve melting with 2.0 mmol/L Mg^{2+} ; B: high resolution melting curve with 10% wild type DNA; C: high resolution melting curve with 15% wild type DNA; D: high resolution melting curve with 20% wild type DNA.

图2 Mg^{2+} 浓度优化与混合入不同浓度的野生型DNA样品对提高HRM灵敏度的效果比较

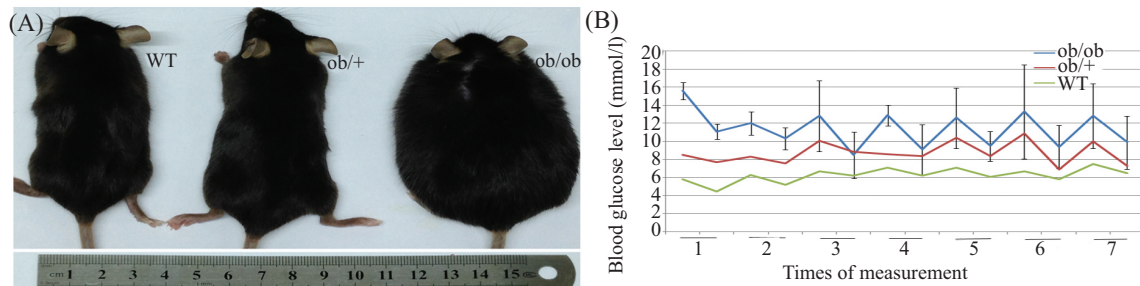
Fig.2 Sensitivity comparison of genotyping results by HRM methods with different contents of Mg^{2+} and wild type mouse DNA



A: 常规PCR加酶切分型结果, DNA marker从上至下大小为200, 150, 100, 50 bp。B~D: 3种基因型小鼠的DNA测序的波形图, 箭头所示为突变位点。
A: genotyping results by gel-based method, and DNA marker size (from up to down bands) are 200, 150, 100, 50 bp; B~D: DNA sequencing results of three genotypes, and arrows indicated mutation sites.

图3 ob小鼠的常规PCR加酶切分型及DNA测序验证结果

Fig.3 Confirmation of HRM results by gel-based methods and DNA sequencing



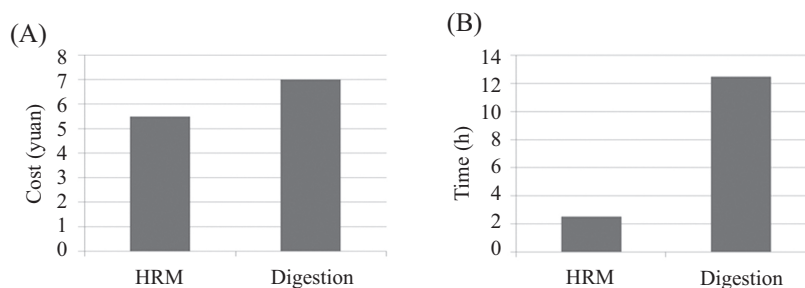
A: 8周龄的ob小鼠野生型、杂合子及纯合子小鼠; B: ob小鼠断食前和断食后血糖浓度变化趋势, 第一次开始测定时间为8周龄, 5 d一个周期, 共测定7次。
A: wild type, heterozygote and homozygote ob mice of 8 weeks old; B: line chart of glucose concentration of mice with indicated genotype before and after fasting in different time points. The first sample was taken in 8 weeks old and tests were repeated every 5 days for 7 times.

图4 通过HRM法鉴定的3种ob小鼠的表型分析

Fig.4 Phenotypic analyses of 3 genotype of ob mice by HRM method

表2 各个时间点断食前后血糖浓度变化差值

基因型 Genotype	测定次数 Test times							平均值±标准差 Mean±S.D.
	1	2	3	4	5	6	7	
ob/ob	4.5	1.7	4.3	3.8	3.1	3.9	2.9	3.46±0.97
ob/+	0.8	0.7	1.2	0.2	2.0	4.0	2.7	1.66±1.33*
WT	1.3	1.1	0.5	0.9	1.0	0.4	1.0	0.96±0.24**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与纯合子(ob/ob)比较。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with ob/ob.

A: 费用比较, 为分析一个样品的费用; B: 需要的时间比较, 为同时处理10个样品的时间。HRM指采用高分辨率溶解曲线方法, Digestion指PCR反应扩增目的片段后再内切酶酶切的方法。

A: cost comparisons for each sample; B: time-consuming comparison for 10 samples. HRM represented high resolution melting method, and digestion represented conventional PCR and endonucleases digestion.

图5 用HRM与常规PCR加酶切方法进行基因型鉴定耗费时间和费用比较

Fig.5 Comparison for the cost and time consumption between HRM method and conventional PCR and endonucleases digestion method

观察其表型, 将分型后小鼠在正常条件下饲喂观察。至6周龄时, 纯合ob小鼠体型逐渐肥胖, 8周龄时体型几乎是野生型、杂合子小鼠的2倍(图4A)。鉴于糖尿病患者对血糖调节能力减弱^[10-11], 抽取尾尖血, 测定断食前与断食12 h后的血糖值。数据表明, 3种基因型血糖水平差别明显, 血糖浓度纯合子最高, 野生型最低, 杂合子介于二者之间(图4B)。计算进食后各基因型小鼠的血糖浓度变化, ob纯合小鼠变化最大, 平均达到3.46 mmol/L, 与杂合、野生型小鼠差异明显(表2)。这表明通过HRM分型准确, ob小鼠种群繁育正常, 表型符合预期。

2.5 HRM方法较常规方法省时、经济

以同时处理10个样品为例, 比较了HRM和常规PCR加酶切方法所需的时间和经济成本, 包括试剂盒、专用PCR管、Tagase、内切酶、普通PCR管等主要试剂盒耗材。在基因组DNA就绪后, HRM方法只需2.5 h即可得到结果, 比常规方法缩短了约10 h。在实验成本方面, HRM和常规方法处理单个样本成本分别为5.5和7元人民币(图5), 可见, HRM方法不仅成本较常规方法低, 还大幅节省了时间, 提高了效率。

3 讨论

随着基因功能研究的深入, 很多领域的研究手段已经由完全敲除某个基因转移到对于特定位点突变的研究。此外, 近年来CRISPR/Cas9技术的发展, 越来越多的小鼠模型中的修饰位点只发生一个或数个碱基的插入、缺失或突变, 而对于单碱基点突变小鼠的基因型鉴定工作一直以来都是一个难点, 经典方法包括片段测序或酶切, 而这些方法耗时长、成本高, 难以进行高通量实验。HRM分析是一门新兴的技术, 通过PCR之后的熔解曲线分析, 能检测PCR片段的微小序列差异^[12]。本文以ob小鼠为模型, 建立了HRM技术基因型鉴定的方法, 随着ob小鼠模型市场需求增加, 该方法将有利于规模化ob小鼠模型的生产, 同时可望用于与ob小鼠模型类似的其他模型的基因型鉴定中。

3.1 条件优化可以进一步提高分辨率

高分辨率熔解曲线分析(HRM)是通过实时监测升温过程中双链DNA饱和荧光染料与PCR扩增产物的结合变化而进行分析的技术^[12], 所以反应体系和条件直接影响实验结果。由于Mg²⁺浓度是Tag

聚合酶活性所必需的, 其对PCR扩增的特异性和产量有显著的影响。本实验设定使用不同 Mg^{2+} 浓度对实验进行了优化, 通过比较扩增曲线显示, Mg^{2+} 为2.0 mmol/L时, 扩增能达到平台区, 扩增效果好(图2), 同时也没有非特异性扩增, 因此该浓度为 Mg^{2+} 适宜浓度。另外, 在前人工作^[13-14]基础上, 优化了 Mg^{2+} 浓度, 加入一定比例的野生型DNA等条件, 使本方法重复性更好, 增加了实用性。

3.2 HRM方法用于ob小鼠基因型鉴定省时省事, 经济

优化后的qPCR-HRM方法能用于ob小鼠基因型分型实验, 分型结果与常规PCR加酶切方法及测序结果一致, 说明方法可行。虽然直接测序法目前是检测基因突变的金标准, 但HRM操作简便省时, 闭管操作, 避免污染, 成本低^[15], 无需过夜酶切样本, 缩短了实验周期, 剪尾当天即可得出分型结果。另外, qPCR仪已经被广泛使用, HRM不需要添置额外仪器, 且不需要进行测序、电泳等操作, 成本也较常规方法更为低廉。

3.3 HRM技术用于小鼠基因型鉴定需注意的问题

HRM分析虽然是一门新兴的技术, 但实际使用中尚需考虑以下几点: 一是HRM分析需选用饱和染料, 该染料对Tag酶活性抑制作用应越低越好; 二是使用同一PCR反应体系, 保证结果一致性; 三是在纯合子分型中考虑适当掺入野生型DNA, 以提高某些难区分样品的检出率; 四是通过琼脂凝胶电泳判断引物是否存在非特异性扩增, 并观察扩增曲线, 确保效率在90%~110%之间及每个反应已扩增到平台期, 以便进行可靠、重复的熔解温度比较。

参考文献 (References)

- 1 黄耀峰, 黎桂福, 彭丽霞, 沈茜妍, 李 燕. 糖尿病健康教育模式的研究现状. 上海预防医学(Huang Yaofeng, Li Guifu, Peng Lixia, Shen Qianyan, Li Yan. Research of health education of diabetes mellitu. Shanghai Journal of Preventive Medicine) 2012; 24(1): 43-5.
- 2 Yi L, Zhongjie S. Current views on type 2 diabetes. J Endocrinol 2010; 204(1): 1-11.
- 3 Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. Nat Genet 1996; 12: 318-20.
- 4 Chung WK, Chua SC, Lee GH, Leibel RL. Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) and electrophoretic assays for the mouse obese (Lepob) mutation. Obes Res 1997; (5): 183-5.
- 5 Griffin TJ, Smith LM. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. Trends Biotechnol 2000; 18(2):77-84.
- 6 Gál AB, Carnwath JW, Dinnyes A, Herrmann D, Niemann H, Wrenzycki C. Comparison of real-time polymerase chain reaction and end-point polymerase chain reaction for the analysis of gene expression in pre-implantation embryos. Reprod Fertil Dev 2006; 18(3): 365-71.
- 7 Hirasawa T, Ohara T, Makino S. Genetic typing of the mouse ob mutation by PCR and restriction enzyme analysis. Exp Anim 1997; 46(1): 75-8.
- 8 Slinger R, Bellfooy D, Desjardins M, Chan F. High resolution melting assay for the detection of gyrA mutations causing quinolone resistance in *Salmonella enteric* serovars typhi and paratyphi. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57: 455-8.
- 9 于静波, 孟冬娅, 薛文成. PCR-HRM技术在微生物鉴定中的应用. 国际检验医学杂志(Yu Jingbo, Meng Dongya, Xue wencheng. Application of microbial identification by PCR-HRM technology. International Journal of Laboratory Medicine) 2011; 32(17): 1988-9.
- 10 胡泊洋, 江道峰, 王 张, 赖先荣, 孟宪丽, 张 艺, 等. 自发性II型糖尿病动物模型GK大鼠的发病特征研究. 中国实验方剂学杂志(Hu Boyang, Jiang Daofeng, Wang Zhang, Lai Xianrong, Meng Xianli, Zhang Yi, *et al.* Study on characteristics of goto-kakizaki diabetes prone rat-a spontaneous type 2 diabetes mellitus rat model. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae) 2013; 19(10): 185-9.
- 11 魏荣锐, 苗明三. 糖尿病动物模型及特点分析. 中医研究(Wei Rongrui, Miao Mingsan. Analysis of the diabetes animal model and characteristics traditional. Chinese Medicine Research) 2010; 23(2): 6-11.
- 12 Erali M, Wittwer CT. High resolution melting analysis for gene scanning. Methods 2010; 50(4): 250-61.
- 13 王银辉, 张海燕, 杨传红, 张 伟, 赖晃文, 陈晓东, 等. 脑胶质瘤IDH1基因突变HRM 检测方法的初步建立. 生命科学研究(Wang Yinhui, Zhang Haiyan, Yang Chuanhong, Zhang Wei, Lai Huangwen, Chen Xiaodong, *et al.* Preliminary establishment of high resolution melting analysis for detecting IDH1 gene mutations in gliomas. Life Science Research) 2013; 17(5): 394-400.
- 14 Vossen RH, Aten E, Roos A, den Dunnen JT. High-resolution melting analysis (HRMA): More than just sequence variant screening. Hum Mutat 2009; 30(6): 860-6.
- 15 Kramer D, Thunnissen FB, Gallegos-Ruiz MI, Smit EF, Postmus PE, Meijer CJ, *et al.* A fast, sensitive and accurate high resolution melting (HRM) technology-based assay to screen for common K-ras mutations. Cell Oncel 2009; 31(3): 161-7.