

完善中的基因变异分析

目录

简介 – 基因变异研究的重要性

1

基因变异分析方法概述

2

检测已知突变

4

1.基本方法：终点法基因分型

4

2.高级方法：基于熔解曲线的基因分型

5

3.基本方法和高级方法的利弊

6

HRM 法检测未知突变

7

1.基于高分辨率熔解曲线基因扫描的原理和定义

7

2.HRM测定优化

8

3.HRM 高级应用和下游技术

13

参考文献及更多推荐

15

简介-基因变异研究的重要性

简介 – 基因变异研究的重要性

人类在不同层次的个体基因组上存在差异：DNA序列在较长或较短重复单元的拷贝数中可能带有单核苷酸多态性（SNP）的插入、缺失或变异。此外还包括DNA的共价键修饰方式的改变，比如通过CpG岛甲基化。实时PCR提供不同的方法来检测此类不同类型的变异。

造成人类个体差异的基因序列变异90%以上属于单核苷酸多态性（SNP）。虽然有许多SNP对细胞功能无影响，但科学家们认为其他一些SNP可能增加人类患病的可能性或影响他们对药物的吸收。近年来，SNP基因分型成为动植物取证、育种等领域基因研究的重要部分，特别是在药物基因组学上。

定义

SNP及其分类

单核苷酸多态性，即SNP（发音为“snips”），是基因组序列中的单核苷酸（A，T，C或G）发生变化时产生的DNA序列变异（见表1）。被视为SNP的变异必定发生于至少1%的人群中。SNP约占所有人基因变异的90%，发生于共300万个碱基人基因组中的每100–300个碱基。SNP可发生于基因组的编码（基因）和非编码区。根据广泛使用的定义，SNP可被分为以下4级：

1级 SNP包括C/T和G/A转换，由此生成C::G和A::T同质双链以及C::A和T::G异源双链。

2级SNP（C/A和G/T）包括生成C::T和A::G异源双链的颠换。

3级SNP（C/G）生成带有C::C和G::G异源双链的C::G同质双链。

4级SNP（A/T）生成带有A::A和T::T异源双链的A::T同质双链。

在可能存在的单碱基多态性中，A突变成T的4级SNP是最难解决的，因为纯合基因型在其 T_M 中的差异最小（通常仅约为 0.2°C ）（有关在LightCycler® 480实时PCR系统上成功检测4级SNP的示例请参见参考文献3,6）。



在对特异性SNP做基因分型之前（如采用测序或探针基因分型法，详见第2节），通常先扫描整个基因或某些亚片段，查看在相关区域是否已产生之前未知的变异。采用PCR扫描，对于没有出现任何未知变异的区域则不必进行测序，因此可减少测序样本的数量及成本。

另一方面，实时PCR基因分型还常被用来验证之前在测序或微阵列平台上得到的结果，此方法能从少量样本研究全基因组转换成更有针对性的目标区域和更大量样本数量的研究。

基因变异分析方法概述

基因变异分析方法概述

在许多基因变异研究中，为了获得大量特征的标记物，必须对大量个体进行基因分型。已知SNP的等位基因必须正确识别和称呼，同时必须检测出新产生的突变。只有稳健可靠、无需大量优化就能快速制订、操作简便、可自动化和可扩展的方法才称得上是理想的基因分型方法。

除极少数方法外，现有的所有基因分型技术都是从PCR扩增入手的。在大部分此类技术中，第一步是对预期的含SNP区域进行PCR扩增，以提高测定的特异性和灵敏度。在接下来的步骤中使用的方法取决于测定的目的是发现扩增区域的未知突变（基因突变扫描），还是检查是否存在之前的实验（基因分型）中相同设置（相关样本的靶区域）下描述的SNP。

基因扫描对基因分型

- 用来检测已知突变最常用的基本方法是利用酶裂解水解探针进行的终点法基因分型。
- 更高级的方法是利用杂交的HybProbe或SimpleProbe探针进行的熔解曲线法基因分型。
- 基因扫描用来发现含有靶基因的扩增子中的新突变。可通过加入饱和的DNA结合染料在高分辨率下分析此类扩增子的熔解行为，方便地进行此类扫描。

小窍门

当结合DNA硫酸氢钠改良方案时，此类高分辨熔解法也适用于甲基化模式研究（参见MS-HRM的优缺点）以及单基因甲基化研究的亚硫酸氢钠测序（参考文献1）。

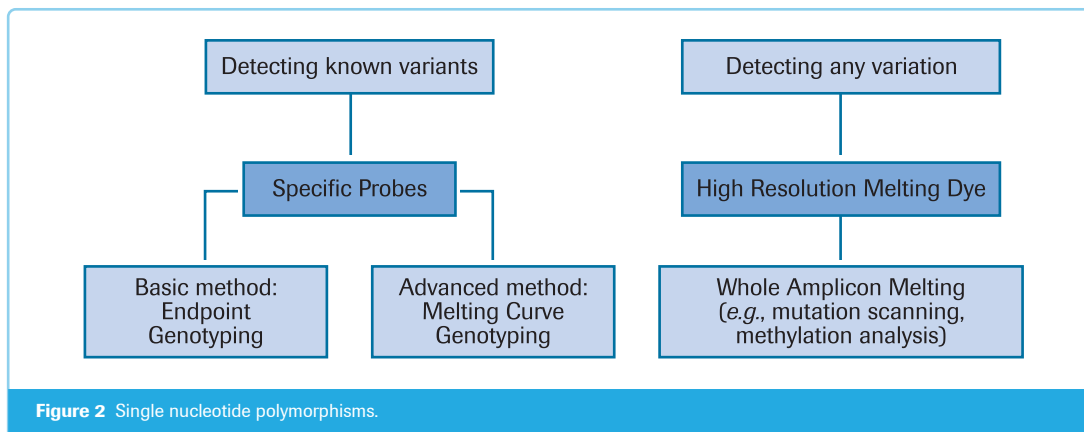


Figure 2 Single nucleotide polymorphisms.

基因变异分析方法概述

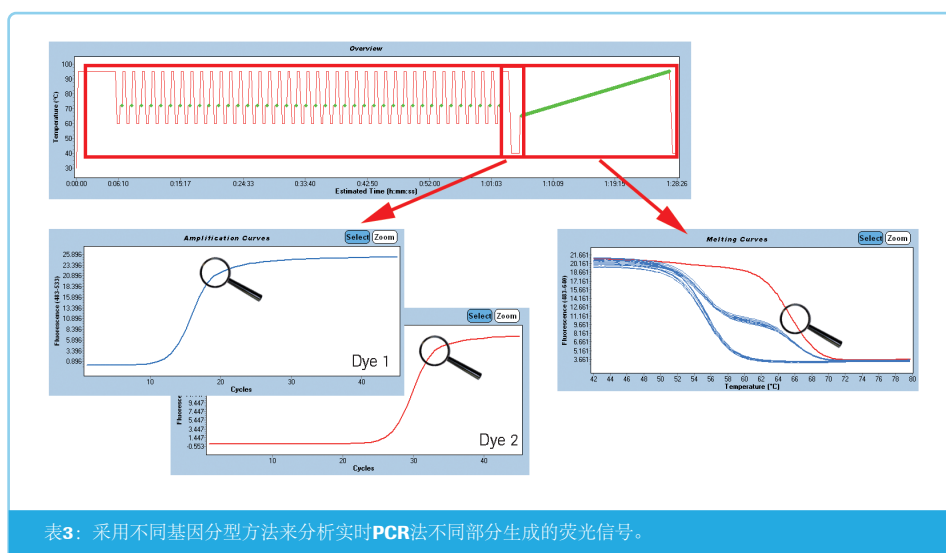
基于实时PCR的不同基因分型和基因扫描法概述.

实时PCR系统的主要特征是能显示覆盖整个PCR过程的扩增曲线。其曲线结果来自于针对靶序列结合的水解探针裂解，或来自于在序列特异性杂交探针中观察到的熔解现象。根据所用的检测形式，利用扩增过程的不同部分来显示基因型信息。

当使用的是等位基因特异性水解探针时，其裂解产生的信号将在扩增中积聚，其终点值可用来判定是否存在基因型（见表3左侧部分）。

相比之下，熔解曲线分析是在PCR之后进行的，由此生成的数据可为其产物的熔解行为提供更详细的信息，帮助识别特异性SNP等位基因或等位基因的不同组合（见表3右侧部分）。

上述两种方法的详情请见下一节。



检测已知突变

检测已知突变

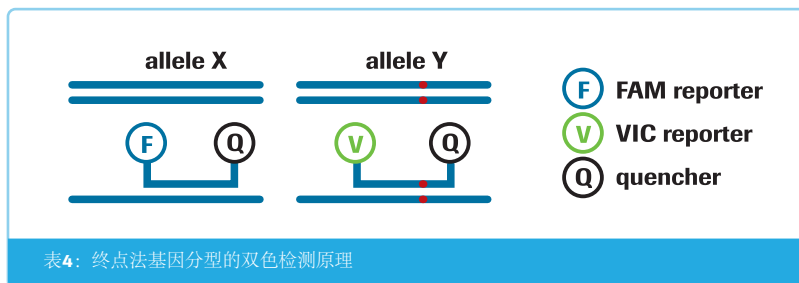
1. 基本方法：终点法基因分型

终点法基因分型采用的是水解探针（有关这一探针形式的解释参见附录 1）。每个探针包含 2 个荧光标记，一个荧光指示剂和一个荧光淬灭剂，彼此紧靠。终点法基因分型采用两个序列特异性探针，只在检测等位基因 X 和等位基因 Y 并为其标记两种不同的指示剂染料。

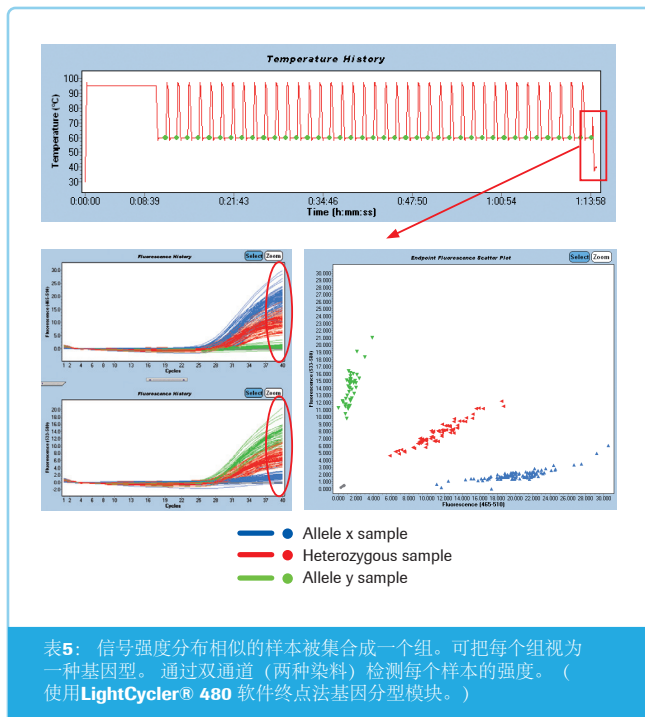
标准设置

- FAM染料检测出等位基因 X同型的样本。
- VIC/HEX染料检测出等位基因 Y同型的样本。

终点法基因分型基于双色测定法。



通过PCR扩增收集数据。但是，仅利用这两种指示剂染料的终点信号强度来识别不同的基因型。染料相对强度可通过散点图清楚地显示出来，简化了对纯合X、纯合Y和杂合样本的识别。



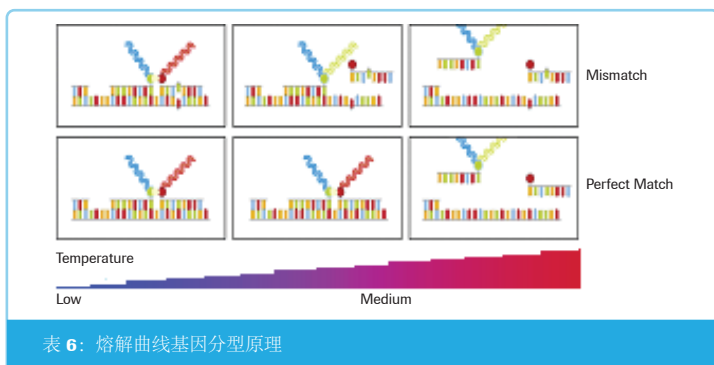
检测已知突变

小窍门

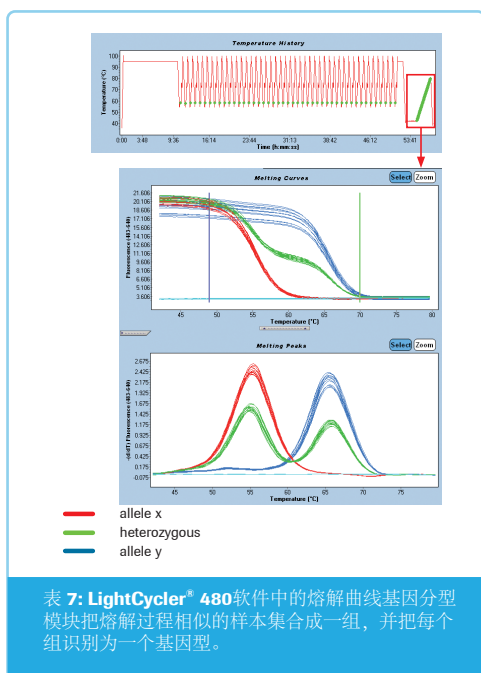
在终点法基因分型中，使用水解探针检测专用的试剂。LightCycler® 480 Probes Master是一种即用型反应混合液，是在LightCycler® 480实时荧光PCR仪上的多孔板中进行水解探针检测的理想之选。

2. 高级方法：基于熔解曲线法的基因分型

采用HybProbe或SimpleProbe探针的熔解曲线分析是用于研究已知变异的可靠方法（有关此类探针的详情解释参见附录1）。无需使用等位基因特异性引物或探针；同一个探针序列可用于已检测SNP的所有等位基因（通常为两个，但有时更多）。



随着序列特异性供体探针和受体探针在目标DNA上紧挨着结合，在FRET过程中生成相应的荧光信号。由于在熔解曲线分析过程中温度上升，探针从模板DNA上脱落，使荧光信号减弱。在探针识别区域中发生的单碱基变化将使探针和目标DNA单链结合的复合物发生热不稳定。因此，有序列差异（SNP等位基因）的扩增子的熔解温度（ T_m ）也不同。由此可从熔解曲线形状中获得基因分型的信息。



小窍门

LightCycler® 480 Genotyping Master主要用于实时PCR，随后在LightCycler® 480分析仪上进行熔解曲线分析。它可用于对单核苷酸多态性（SNP）进行基因分型和突变分析。特别推荐将其用于多重测定。请注意，LightCycler® 480 Genotyping Master含有5'-3'-外切Taq DNA聚合酶活性，因此不可用于水解探针的终点法基因分型。

3. 基本方法和高级方法的利弊

终点法基因分型是一种可快速设置且无需优化的基本方法。此类测定可由不同的供应商提供，也就是说一般情况下用户不必费心进行测定设计。对许多目标DNA来说，其即用型引物和探针在市面上都有售，且可在标准PCR条件下使用。因此使用水解探针的终点法基因分型作为基本方法得到了广泛使用；一体化的反应混合液使用方便，结果解释简洁明了。

但是，通常在每次测定中只能检测出一个突变，也就是说该技术不适用于单倍体分型（对被同一探针覆盖的相邻SNP的结合展开研究）或含有2个以上不同等位基因的SNP。而且，该方法通常在出现非预期的新突变时也可能会失效。最后也很重要的一点是，这种方法要求发生生物化学反应，而不是类似熔解曲线分析的生物物理学反应，因此可能容易被水解反应不理想的实验条件（如样本制备不纯）所干扰。

相比基本的水解探针分型，更高级、更灵活的熔解曲线基因分型分析能进一步详细了解复杂的基因群体。这种方法可组合分析多个变异位点（如单倍体分型）。当用在多重测定中时，该方法可检测出多个SNP。熔解曲线基因分型可检测新突变这一优点也有据可循（参考文献8,14）

另一方面，熔解曲线分析需要仔细进行探针设计，确保探针序列至少覆盖一个SNP，且每次测定都要优化。此外还提供配套的软件解决方案（如LightCycler®探针设计软件）及技术支持（参见www.lightcycler480.com），帮助新手研究者更快掌握这种方法。

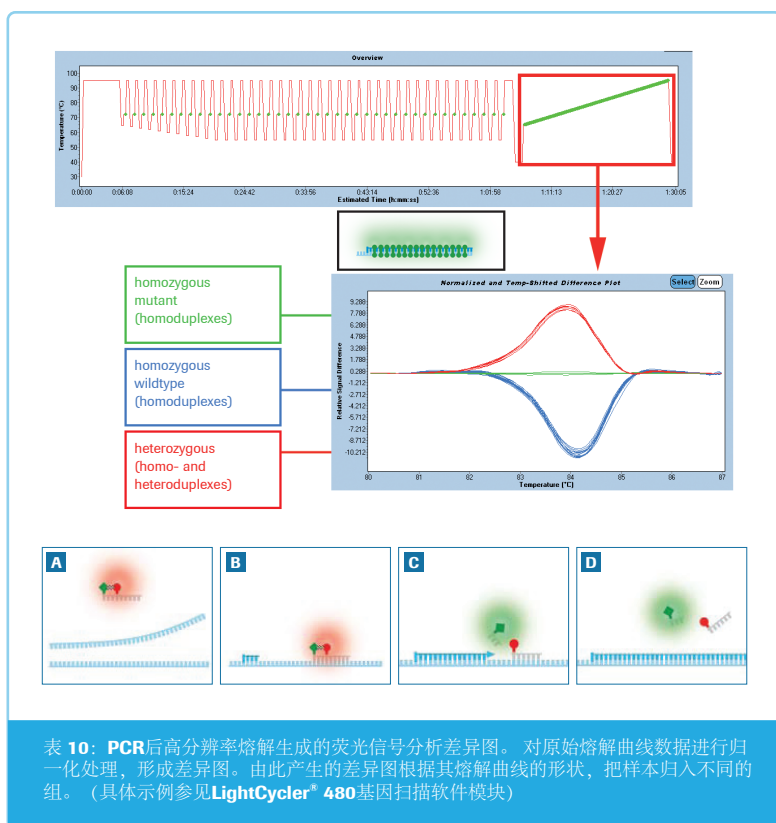
检测未知突变

1. 原理和定义：基于高分辨率熔解曲线的基因扫描

通过在PCR之后的高分辨率条件下收集到的熔解曲线数据，在不同用特异性探针的情况下，便可获取未知突变有关的信息。高分辨率熔解法（HRM）只需用到PCR试剂，用于相关基因扩增的简单引物对，饱和DNA结合染料，以及一台精准的实时PCR仪。LightCycler® 480 实时PCR系统的软硬件和试剂都已针对此类要求进行优化。

当存在SNP（通常为杂合）时，将在PCR、熔解和重退火后出现同源和异源双链DNA。由于杂交链之间的序列不匹配，异源双链DNA的熔解温度不同于同源双链DNA。当使用饱和DNA结合染料，如LightCycler® 480 ResoLight时可检测出熔解温度上的差异（表8和9），可检测出在PCR过程中形成的异源双链（如当待测样本与特定的突变杂合时）。所以其应用范围比其他较传统的DNA染色染料—如SYBR Green I更为广泛。因其对PCR扩增酶不具有毒性，因此染料的高浓度对PCR无影响。高浓度染料完全掺入样本中的dsDNA。因此，当在熔解过程中染料分子脱离dsDNA时，它们再度与其他空置位点结合的机会微乎其微。这使得熔解过程高度相似，产生的信号也很强。在此种条件下，熔解曲线即使出现很小的变化也会使荧光信号产生轻微但可重现的变化。

当在差异图中显示时，熔解曲线数据将识别出样本不同集群（如纯合野生型、纯合突变型和杂合型）（表10）。



检测未知突变

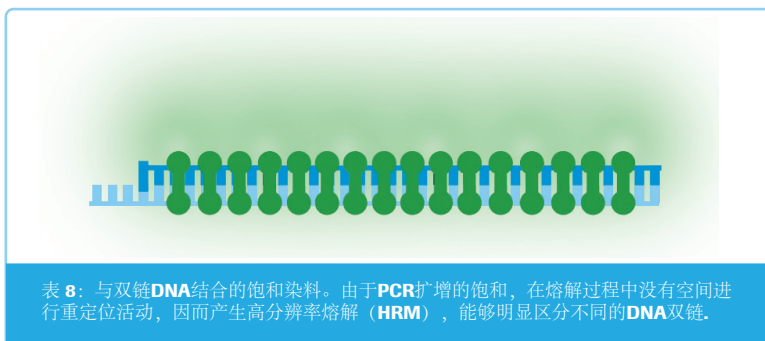


表 8: 与双链DNA结合的饱和染料。由于PCR扩增的饱和, 在熔解过程中没有空间进行重定位活动, 因而产生高分辨率熔解 (HRM), 能够明显区分不同的DNA双链。

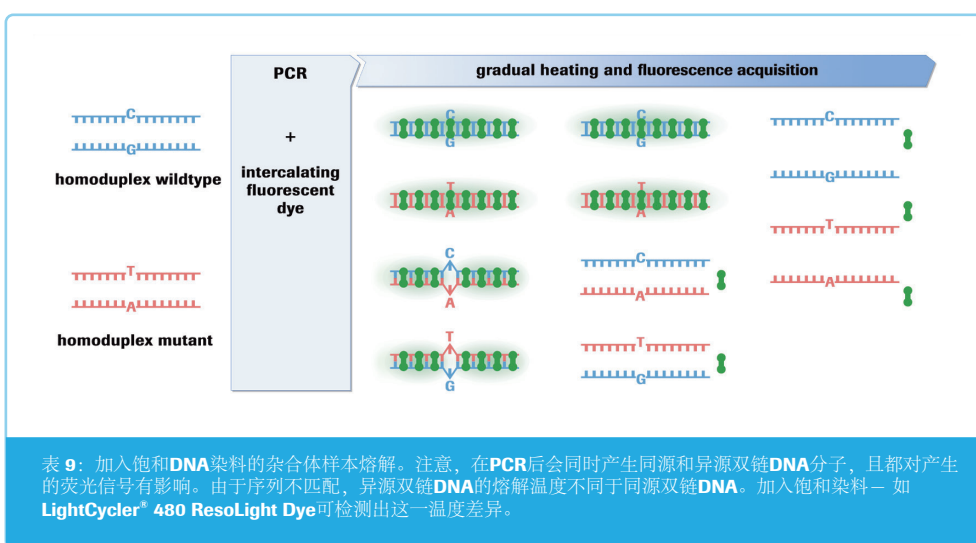


表 9: 加入饱和DNA染料的杂合体样本熔解。注意, 在PCR后会同时产生同源和异源双链DNA分子, 且都对产生的荧光信号有影响。由于序列不匹配, 异源双链DNA的熔解温度不同于同源双链DNA。加入饱和染料—如LightCycler® 480 ResoLight Dye可检测出这一温度差异。

2. HRM 测定优化

为确保基因扫描测定的有效性, 必须仔细设计该实验。

我们建议按以下步骤计划和执行高分辨率熔解实验:

- 仔细设计实验
- 选择最适合的引物
- 样本制备标准化
- 优化反应混合物
- 优化PCR和熔解程序
- 用LightCycler® 480基因扫描软件分析实验数据
- 使用其他工具和下游技术获取更详细的信息

检测未知突变

1) 仔细设计实验

若待扫描的外显子不是太长（最大长度400 bp，< 250 bp为佳），把引物放入毗连的内含子中。这能使整个外显子作为一个扩增子进行扫描。

当外显子较长时，应将其分为多个片段（如每个约为300 bp的扩增子）。在设计这些片段的引物时要使扩增子互相重叠。

如需要分析的只是已知多态性的某些热点或位点，选择短扩增子（<150 bp）为佳。相比500 bp扩增子，单碱基变异对100 bp扩增子熔解行为的影响更大；因此，短扩增子更可能显示出小序列变异的影响。

用较长的扩增子也可能检测出序列变异。但是，变异对熔解曲线形状的影响随扩增子长度的增加而降低，当扩增子 >500 bp时通常显示多相熔解行为，进而干扰变异检测（超过2个熔解域将阻碍正常分析）。

2) 选择最适合的引物

被人工产物—如引物二聚体或非特异性产物污染的扩增子可能产生难以解释的结果。因此，为得到最佳的基因扫描结果，务必仔细设计引物。精确的引物设计能确保特异性引物在预期的靶序列处结合，减少引物二聚体的形成。引物应不在呈现二级结构的位置结合。

小窍门

始终使用高纯化（如HPLC纯化）引物和低引物终浓度（如各为200 nM），避免形成引物二聚体。

要得到最佳的HRM结果，不是所有现成和已公布引物都最适合的。有时建议根据实时PCR先决条件设计新引物并加以优化，以更快地得到更准确的结果。

小窍门

同时检测多组引物有助于加快基因扫描速度。

按以下一般准则进行：

- 使用特殊软件来设计引物，如Primer3。
- 设计退火温度约为60 °C。
- 避免可能形成引物二聚体或非特异性产物的序列。
- 用BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 计算引物序列，确保其对目标种群和基因有特异性。
- 始终使用被HPLC纯化的引物。
- 使用低引物终浓度（如各为200 nM），避免形成非特异性产物，如引物二聚体。
- 检查PCR产物的特异性（如在琼脂糖凝胶上）。记住，含有引物二聚体或非特异性产物的反应不适合用于HRM分析。

可利用mFOLD等工具对感兴趣序列进行二级结构预测和序列分析。同时请验证起始频率分析使用的条件是否与PCR反应中的条件一致。

检测未知突变

3) 样本制备标准化

由于基因扫描分析对源自独立PCR的扩增子进行比较，因此必须把反应间变异降至最低。其中一种方法是使样本制备程序标准化。每次反应所用的模板数量应相同（每20 μl 反应中使用5–30 ng模板DNA）。

小窍门

对于优化HRM分析，所有扩增曲线的Cp值应 < 30 。更重要的是，应检查所有曲线达到相似的扩增平台期高度。盐分对DNA溶解行为有影响，务必使所有样本中的缓冲液、Mg²⁺和反应中其他盐分的浓度尽可能保持均等。

由于HRM对源自独立PCR反应的扩增子进行比较，因此必须把反应间变异降至最低。减少变异的一种方法是使样本制备程序标准化，具体做法如下：

- 对所有样本使用相同的提取程序。
- 采用可重复性高的核酸制备法。比如：
 - MagNA Pure 2.0, MagNA Pure 96全自动核酸分离纯化系统或MagNA Pure Compact全自动核酸分离纯化系统(www.maganapure.com)- 使用High Pure系列核酸分离试剂盒（用于手工提取），如High Pure PCR Template Preparation试剂盒。
- 用分光光度测定法测定DNA样本浓度，然后根据再悬浮缓冲液浓度调整样本浓度。
- 在每次反应中使用相同数量的模板（每20 μl 反应使用5–30 ng模板DNA）。
- 检查所有样本的Cp值和扩增曲线高度。

4) 优化反应混合物

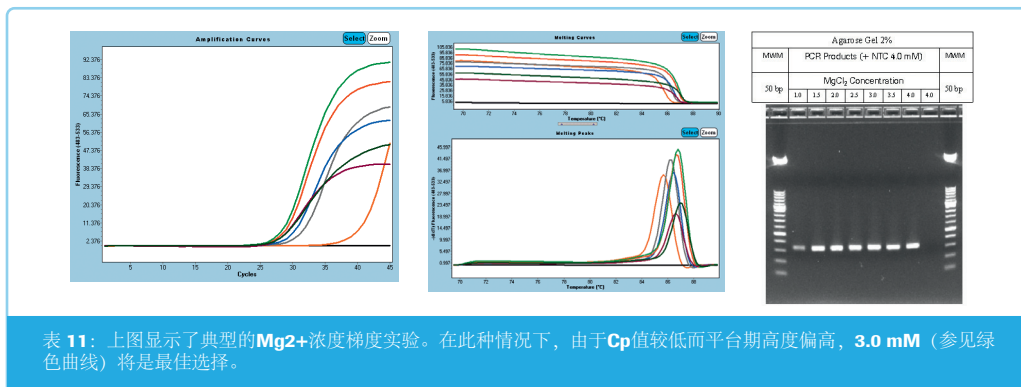
盐离子会影响DNA溶解行为，务必使所有样本中的缓冲液、Mg²⁺和反应混合物中的其他盐分的浓度尽可能保持一致。

为确保PCR的特异性和稳定性，始终应测定各实验系统的最佳MgCO₂浓度。我们建议您在进行新测定时，把反应中的MgCO₂浓度梯度稀释为1.5–3.5 mM（按每0.5 mM递增）（表7）。

您可核实琼脂糖凝胶上的扩增子质量，也可进行标准溶解曲线分析。

可用LightCycler® 480 High Resolution Melting Master来简化优化过程，这种即用型的热启动反应混合液可在LightCycler® 480实时荧光PCR仪上生成最佳的HRM结果。

检测未知突变



5) 优化PCR和熔解程序

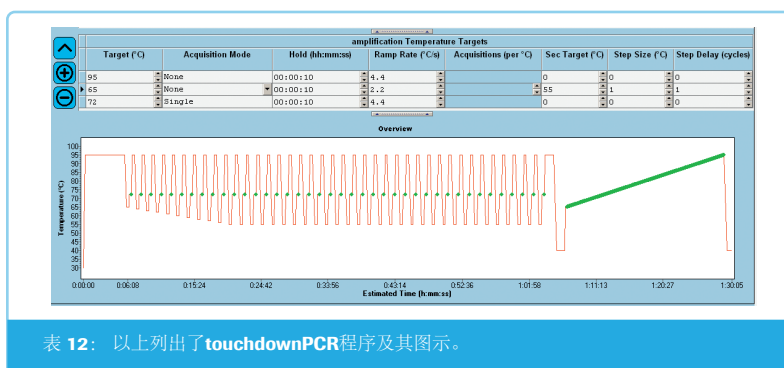
PCR程序:

退火温度是指对PCR特异性和稳定性影响最大的可变热循环。

小窍门

若您不清楚您的PCR引物的实际熔解温度 (按照公式计算得到的熔解温度通常不准确, 对其不可过分依赖), 最好使用范围涵盖65 °C至55 °C退火温度的touchdown PCR程序 (表8)。

Touchdown PCR程序在PCR早期循环中所用的退火温度相对较高, 能确保引物结合和扩增的高度准确。在之后的循环中则降低退火温度, 从而确保最终能得到足够数量的特异性PCR产物。



熔解程序:

基因扫描实验是在熔解曲线分析模式下进行的。在设置HRM程序时应考虑以下几点:

快速冷却混合物至40°C, 促进异源双链形成, 确保所有PCR产物重新组合。

实际熔解条件视扩增子而定。在初步实验中设置较大的熔解间隔, 如60—95°C。在确定产物将熔解的实际温度后, 应缩小熔解间隔, 最大不超过25°C。但应确保熔解程序在预期T_m值前至少10°C开始, 在预期T_m值后至少5°C结束。

每度采集25次信号, 足够得到适合HRM分析的分辨率。

检测未知突变

high resolution melting Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:01:00	4.4				
40	None	00:01:00	2.2				
75	None	00:00:01	1				
90	Continuous		0.02	25			

表 13: 上表显示了典型的高分辨率熔解程序。

小窍门

对熔解前和熔解后阶段留有足够的数据采集时间。在围绕确认的熔解温度约10°C（或更高）的范围内采集HRM数据点。这能得到有效曲线标准化足够的基准数据点，由此将使复制子更精确，更方便进行数据解释。

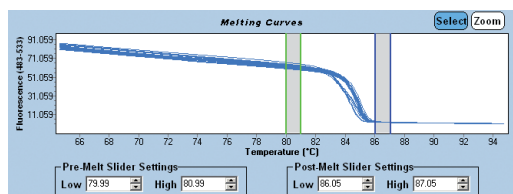


表 14: 正确设置熔解前和熔解后温度区域是明确显示HRM结果的关键。

在每次HRM测定中应使用阴性质控品或无模板质控品（NTC）。如可行的话，应在测定中使用含野生型和/或突变体基因型的质控品，对结果进行核实。

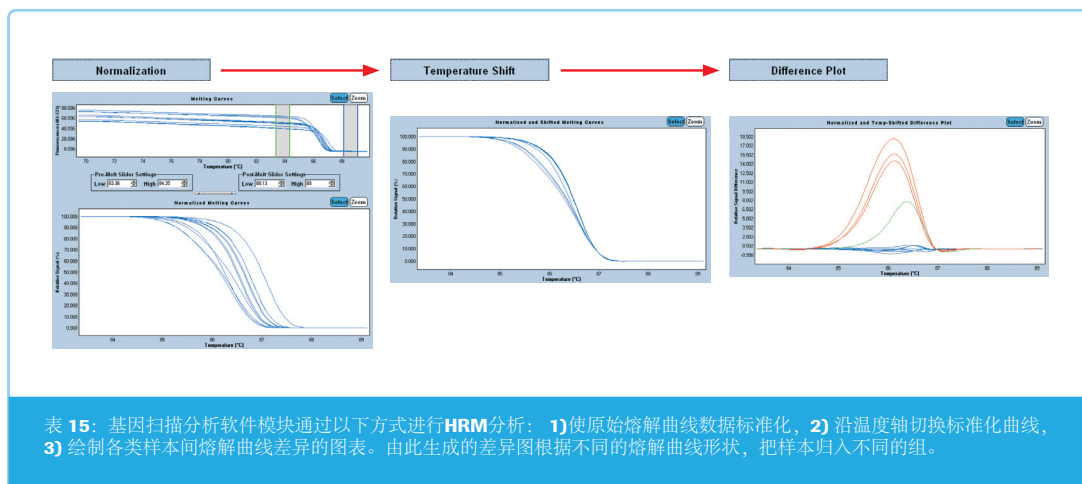
6) 用适合的软件分析实验数据

在进行高分辨熔解分析之前，始终应先审核扩增数据。一般情况下，信号在一开始陡然上升后，应在>30个相对荧光单位处趋于稳定。当C_p值低于30次循环时，表示样本材料数量足够，且扩增效率适当。样本间的C_p值相差应不超过 5 C_p单位（约相当于1:100稀释）。

由于能够监控扩增性能，在实时荧光PCR仪上进行检测应始终优于版式循环仪扩增。

LightCycler®480基因扫描软件通过对所有样本设置熔解前（初始荧光）和熔解后（最终荧光）信号来统一数值，从而使原始熔解曲线数据标准化（表15）。在接下来的步骤（温度切换，表15）中，软件将沿温度轴切换标准化曲线，以使各样本中 双链DNA完全变性的点达到平衡。

在最后一个步骤（差异图，表15）中将从参考曲线（也叫“基准曲线”）中去掉已转换的标准化曲线，更清楚地显示熔解曲线形状的差别。在由此产生的差异图中，可把熔解曲线形状相近的样本归入同一个组。



当差异图无法给出满意的结果时, 应检查原始熔解曲线是否存在引物二聚体, 或是否在扩增过程中生成了非特异性副产物。

小窍门

使用软件可简化过程, 提高速度和方便性以及数据质量。

为加快实验程序设置的速度, 可运行带有本文中提到的所有基因变异分析方法 (终点法基因分型, 熔解曲线基因分型, 基因扫描) 模板的软件。

有些软件模块能结合和比较之前生成的分析结果, 或能生成对多项实验结果的综合分析, 可大大增加方便性 (详情参见LightCycler® 480 多板分析软件)。

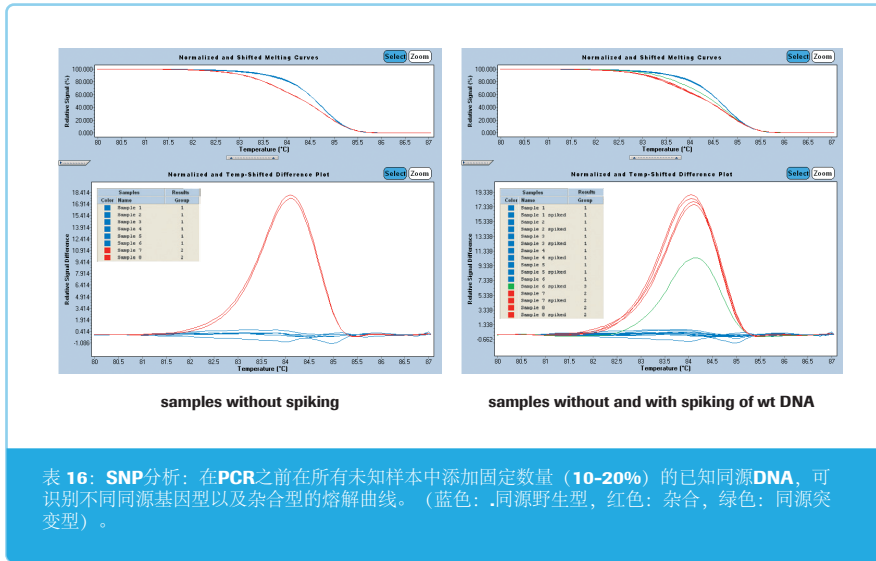
3. 高级应用和下游技术

1) 识别纯合样本

当杂合样本的扩增子 (同时含有同源和异源双链) 被熔解, 由此产生的熔解曲线将呈现特有的形状, 不同于同源样本所产生的典型熔解曲线形状。根据单个序列, 源自不同同源突变的扩增子有时会产生形状十分相近、难以辨别的熔解曲线。

在某些情况下, 若未对形状做优化, 将无法区分各个同源变异。用已知数量的野生型DNA人工掺入, 所有样本可解决这一问题, 从而明确地区分同源变异 (表11)。

检测未知突变



2) 用 DNA 测序进行变异分型

通过基因扫描可检测出相比其他样本的任何序列变异，但无法准确判定在各个等位基因中存在哪种碱基突变。因此，大部分研究人员通过对各组中一个扩增子的测序来确定变异。

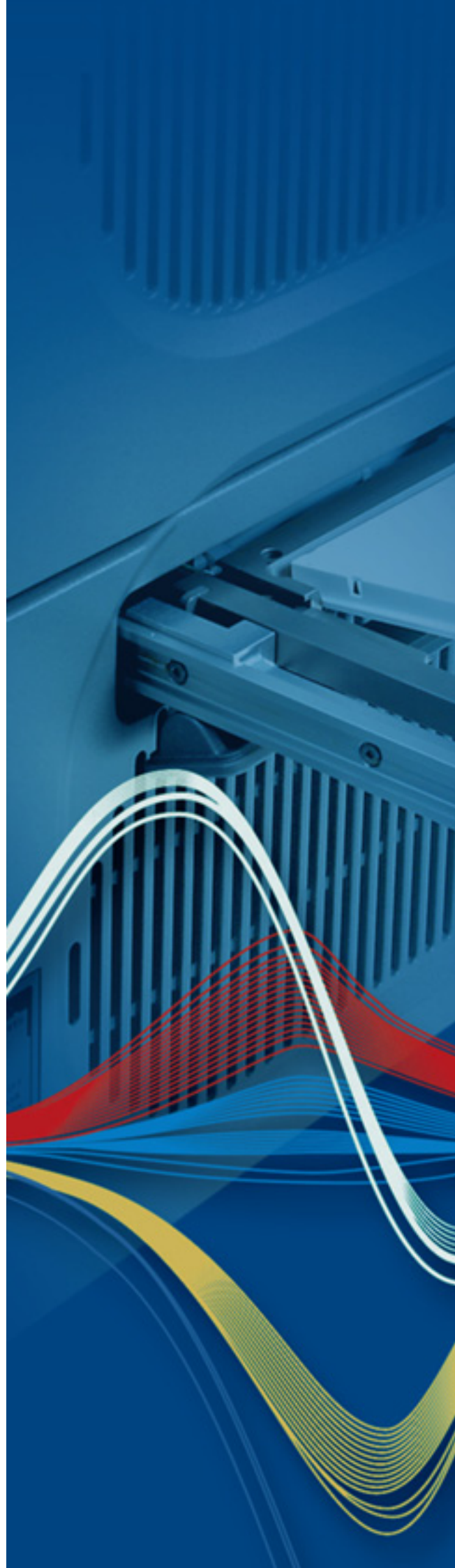
小窍门

确保实时 PCR 过程中所用的染料不会干扰测序过程。LightCycler® 480 ResoLight Dye 扩增子可直接用于测序反应。但在测序反应之前，我们建议先去除扩增子混合物中的 dNTP 和引物（如采用高纯度 PCR 产物纯化试剂盒）。

罗氏应用科学部不仅拥有实时 PCR 系统，您也可利用我们的新一代测序和芯片系统进行更广泛的遗传学和基因组变异相关研究。请访问 (www.454.com 和 www.nimblegen.com) 获得更多信息。

参考文献和更多推荐

1. Balic, M., Pichler, M., Strutz, J., Heitzer, E., Ausch, C., Samonigg, H., Cote, R.J., and Dandachi, N. (2009).
[High Quality Assessment of DNA Methylation in Archival Tissues from Colorectal Cancer Patients Using Quantitative High-Resolution Melting Analysis.](#)
J. Mol. Diagn. 11, 102-108.
2. Chateigner-Boutin, A.L. and Small, I. (2007).
[A rapid high-throughput method for the detection and quantification of RNA editing based on high-resolution melting of amplicons.](#)
Nucleic Acids Res. 35.
3. Er TK, Liang WC, Chang JG, Jong YJ
[High resolution melting analysis facilitates mutation screening of ETFDH gene: applications in riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency.](#)
Clinica chimica acta; 2010 May 02;411(9-10):690-9.
4. Grievink, H. and Stowell, K.M. (2008).
[Identification of ryanodine receptor 1 single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting using the LightCycler® 480 System.](#)
Analytical Biochemistry 374, 396-404.
5. Hung, C.C., Lin, S.Y., Lee, C.N., Cheng, H.Y., Lin, C.Y., Chang, C.H., Chiu, H.H., Yu, C.C., Lin, S.P., Cheng, W.F., Ho, H.N., Niu, D.M., and Su, Y.N. (2009).
[Identification of fibrillin-1 gene mutations in Marfan syndrome by high-resolution melting analysis.](#)
Analytical Biochemistry In Press.
6. Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C.
[Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons.](#)
Clin Chem. 2004; 50: 1156-1164.
7. Laurie, A.D. and George, P.M. (2009).
[Evaluation of high-resolution melting analysis for screening the LDL receptor gene.](#)
Clinical Biochemistry 42, 528-535.
8. Loveless, B. et al.
[Identification of ciprofloxacin resistance by SimpleProbe\(TM\), High Resolution Melt and Pyrosequencing\(TM\) nucleic acid analysis in biothreat agents: Bacillus anthracis, Yersinia pestis and Francisella tularensis.](#)
Molecular and Cellular Probes. 2010 Jun;24(3):154 - 160.
9. Naze, F., Le Roux, K., Schuffenecker, I., Zeller, H., Staikowsky, F., Grivard, P., Michault, A., and Laurent, P. (2009).
[Simultaneous detection and quantitation of Chikungunya, Dengue and West Nile viruses by multiplex RT-PCR assays and Dengue virus typing using High Resolution Melting.](#)
Journal of Virological Methods In Press.
10. Pichler, M., Balic, M., Stadelmeyer, E., Ausch, C., Wild, M., Guelly, C., Bauernhofer, T., Samonigg, H., Hoefler, G., and Dandachi, N. (2009).
[Evaluation of High-Resolution Melting Analysis as a Diagnostic Tool to Detect the BRAF V600E Mutation in Colorectal Tumors.](#)
J. Mol. Diagn. 11, 140-147.
11. Pietzka, A.T., Indra, A., Stoger, A., Zeininger, J., Konrad, M., Hasenberger, P., Allerberger, F., and Ruppitsch, W. (2009).
[Rapid identification of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates by rpoB gene scanning using high-resolution melting curve PCR analysis.](#)
J. Antimicrob. Chemother.
12. Schütz, E. and von Ahsen, N. (2009).
[Influencing factors of dsDNA dye \(high-resolution\) melting curves and improved genotype call based on thermodynamic considerations.](#)
Analytical Biochemistry 385, 143-152.
13. Wojdacz, T.K., Dobrovic, A., and Hansen, L.L. (2008).
[Methylation-sensitive high-resolution melting.](#)
Nat. Protoc. 3, 1903-1908.
14. Teupser, D., W. Rupprecht, et al. (2001).
[Fluorescence-based detection of the CETP TaqIB polymorphism: false positives with the TaqMan®-based exonuclease assay attributable to a previously unknown gene variant.](#)
Clin Chem 47(5): 852-7.
15. Wojdacz et al., Expert Rev
[Limitations and advantages of MS-HRM and bisulfite sequencing for single locus methylation studies.](#)
Mol. Diagn. 10(5), 575-580 (2010).



Published by
罗氏诊断产品(上海)有限公司
罗氏应用科学部

上海市淮海中路1045号淮海国际广场12楼 邮编: 200031
Tel: +86 21 2412 1000 Fax: +86 21 2412 1188
订货热线: 800-820-3361 400-820-3361
技术服务: 800 820 0577
邮箱: china.as@roche.com

北京
北京市东城区东长安街1号东方广场
东方经贸城中二办公楼六层09室 邮编: 100738
Tel: +86 10 8515 4100 Fax: +86 10 8515 4188

广州
广州市环市东路403号 广州国际电子大厦25楼
邮编: 510095
Tel: +86 20 8713 2600 Fax: +86 20 8713 2700

© 2010 Roche Diagnostics Limited
All rights reserved.

注册商标

HYBPROBE, HIGH PURE, LIGHTCYCLER,
MAGNA LYSER, MAGNA PURE,
RESOLIGHT, 和 SIMPLEPROBE 均为罗
氏公司注册商标, SYBR 是
Molecular Probes 公司的注册商标, 其它品
牌和产品名称是其各自所有者之产权。

声明

仅供生命科学研究参考使用。
不适用于医学诊断流程。