

Использование высокоразрешающего анализа кривых плавления ДНК в диагностике наследственных заболеваний

Никитина Д.И.², Маретина М.А.^{1,2}, Егорова А.А.¹, Масленников А.Б.³, Киселев А.В.¹

¹ Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия 3, телефон/факс (812) 328-98-09; e-mail: ankiselev@yahoo.co.uk

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9

³ ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница №1», 630047, Новосибирск, ул. Залесского, д. 6, корпус 7

В обзоре рассмотрены молекулярные основы и возможности метода идентификации мутаций с использованием высокоразрешающего анализа кривых плавления ДНК. Последние разработки значительно улучшили потенциал данной технологии. С появлением «насыщающих» красителей ДНК и развитием приборов для измерения характеристик плавления была существенно увеличена чувствительность и специфичность высокоразрешающего анализа кривых плавления ДНК. Метод HRM (High Resolution Melting) не требует флуоресцентных зондов, не подвергает разрушению анализируемый образец и обладает высокой разрешающей способностью. Благодаря простоте, специфичности и высокой чувствительности метод HRM активно используется в лабораториях для сканирования и генотипирования ДНК при диагностике наследственных заболеваний.

Ключевые слова: анализ кривых плавления ДНК, метод HRM, наследственные болезни.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Application of high-resolution DNA melting analysis in diagnostics of hereditary diseases

Nikitina D.I.², Maretina M.A.^{1,2}, Egorova A.A.¹, Maslennikov A.B.³, Kiselev A.V.¹

¹ D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, 199034, Saint-Petersburg, Mendeleevskaya line 3, tel/fax 7 (812) 328-98-09, e-mail: ankiselev@yahoo.co.uk

² Saint-Petersburg State University, 199034, Saint-Petersburg, Universitetskaya emb. 7/9

³ The Novosibirsk State Regional Clinical Diagnostic Center, 630047, Novosibirsk, Zaleskiy st., 6, b. 7

Here we have reviewed the molecular basics and capabilities of the high-resolution DNA melting curve analysis for mutation identification. The potential of this technique has been significantly improved by recent developments. The sensitivity and specificity of the high-resolution analysis of DNA melting curves significantly increased because of the emergence of «saturating» DNA dyes and due to the development of instruments for precise measuring the melting changes. HRM analysis (High Resolution Melting) does not require fluorescent probes, does not damage the sample and has high resolving power. Because of its simplicity, specificity, and high sensitivity this method is prevalent in laboratories for DNA scanning and genotyping for the purpose of diagnostics of hereditary diseases.

Key words: high-resolution DNA melting analysis, HRM analysis, hereditary diseases.

Введение

Высокоразрешающий анализ кривых плавления ДНК (High Resolution Melting, HRM) является эффективным и одновременно простым методом для выполнения задач генотипирования и скрининга мутаций. Несмотря на бурное развитие технологий секвенирования нового поколения, технология HRM остается по-прежнему актуальной в силу большой скорости анализа, дешевизны и отсутствия сложной биоинформатической обработки и интерпретации данных. Метод характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, достигающей до 100%. Этап плавления ампликонов и построение соответствующих кривых следует после ПЦР. Принцип метода основан на выявлении различий по форме или сдвигу кривых плавления фрагментов ДНК, несущих потенциальные мутации [1].

Метод HRM был разработан под руководством Карла Витвера (университет Юты) в 2002 г. и практически сразу стал применяться для решения задач скрининга и выявления мутаций. Последние достижения в области данной технологии включают в себя создание приборов, которые позволяют строго контролировать температуру плавления ДНК и сбор данных, а также разработку насыщающих красителей ДНК, которые не влияют на ход ПЦР и не мигрируют при плавлении из низкомолекулярных ампликонов в высокомолекулярные [3]. Все это обеспечивает более точное выявление изменений в последовательности ДНК на основе анализа кривых плавления, позволяет отказаться от использования меченых зондов, значительно снижает необходимость применения секвенирования для поиска мутаций и играет значимую роль в диагностике наследственных заболеваний [2, 3].

Принцип метода

HRM является простым и надежным методом изучения и выявления вариантов последовательности ДНК. Анализ происходит в замкнутой системе, при этом продукт амплификации не загрязняется и не разрушается после ПЦР, что позволяет при необходимости проводить в дальнейшем секвенирование.

Первым этапом HRM является амплификация интересующего фрагмента ДНК методом ПЦР в присутствии насыщающего красителя, который специфически связывается с двунитевой молекулой ДНК. Такие красители обладают высокой степенью флуоресценции только после связывания с двунитевой ДНК, при этом флуоресценция будет практически отсутствовать, когда ДНК будет утрачивать свою двунитевую структуру. Данные изменения позволяют следить за амплификацией ДНК в ходе ПЦР в режиме реального времени. После

завершения амплификации постепенно повышают температуру с шагом от 0,008 до 0,2°C, при этом разрушается двуцепочечная структура ДНК. Так как насыщающие красители, используемые при HRM, флуоресцируют только в связанном с двунитевой ДНК состоянии, степень флуоресценции снижается по мере денатурации ДНК, что отражается в изменении формы кривой плавления. Кривые плавления зависят от длины, состава GC, а также общей последовательности анализируемого фрагмента. При правильно выбранных параметрах, данный метод позволяет выявить различия между анализируемыми образцами с точностью до одного нуклеотида [4].

Анализ кривой плавления позволяет выявлять однонуклеотидные замены по изменению формы кривой плавления, в зависимости от генотипа (рис. 1А). Однако при анализе гетерозиготных вариантов кривые плавления могут быть трудно различимы, поэтому в таких слу-

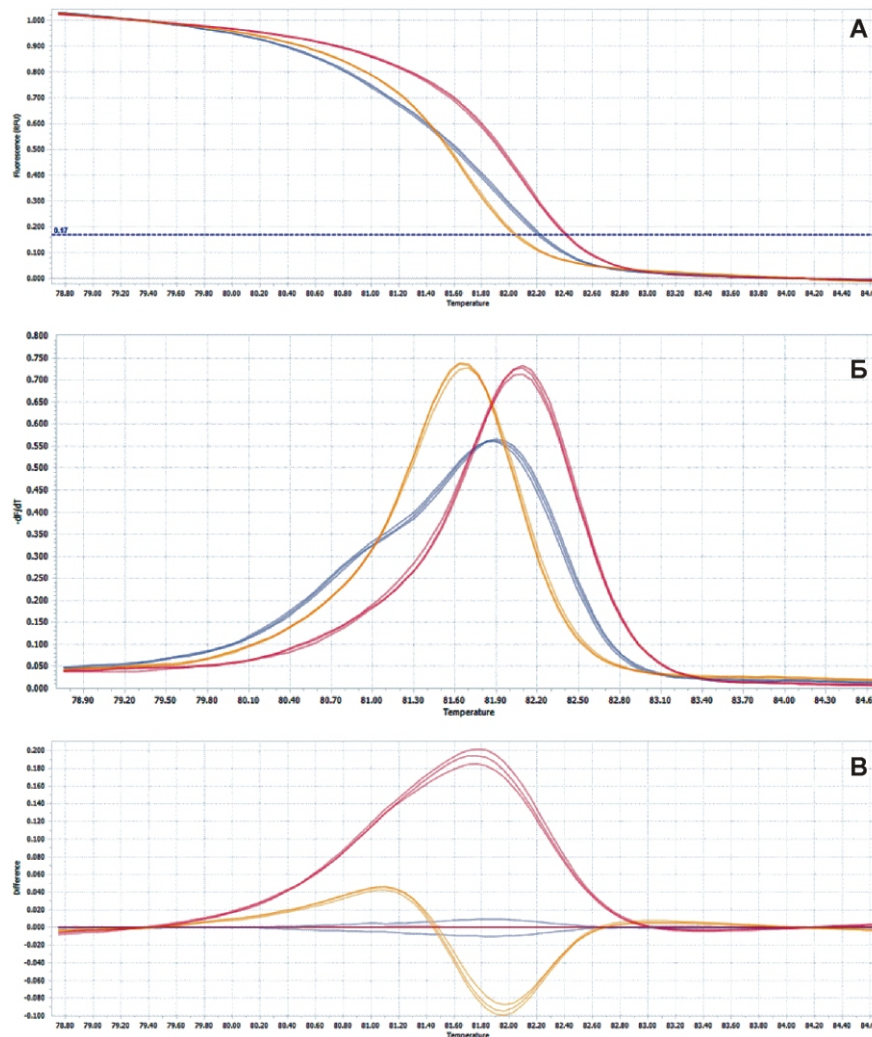


Рис. 1. Детекция однонуклеотидной замены с.66 A>G в гене *MTRR* методом HRM:

А — нормализованные кривые плавления ДНК; Б — нормализованные пики плавления ДНК; В — сравнение кривых плавления, усреднение по гетерозиготному генотипу. Желтая и красная кривые соответствуют гомозиготам AA и GG. Синие кривые соответствуют гетерозиготам AG.

чаях для анализа используют другие графики, такие, как график пиков плавления (рис. 1Б) и график сравнения кривых плавления (рис. 1В). На рис. 1В видно, что пик гетерозиготы соответствует пикам плавления разных гомозигот. На рис. 1В видно расположение гетерозиготы относительно двух гомозигот.

Используя графики пиков плавления (normalized melting peaks) и сравнивая кривые плавления (difference plot) можно более четко различить разные генотипы (рис. 1Б, В).

Для получения достоверных результатов при HRM важно учитывать длину анализируемого фрагмента. Например, при скрининге точковых мутаций для повышения чувствительности, фрагмент должен быть небольшим (80–100 п.н.). Было показано, что наиболее достоверные результаты получаются, когда размер фрагмента не превышает 300 п.н. Ошибки чаще всего наблюдаются при длине фрагмента 400 п.н. и более [4].

Показано, что качество HRM-генотипирования в значительной степени зависит от ряда факторов, главные из которых — специфичность ПЦР, используемое программное обеспечение и насыщающая способность красителей. Наиболее часто используемый краситель для ПЦР в режиме реального времени — SYBR Green I, который плохо распознает гетеродуплексы [1], поэтому следует применять другие, так называемые «насыщающие» красители — LCGreen, Resolight и Syto-9 [2]. Для получения достоверных результатов также важны тщательно подобранные праймеры и оптимизация температуры отжига [1].

Метод HRM также может быть составной частью других методов, например, зонд-изолированной ПЦР (Isolated-probe PCR). Это метод включает в себя ассиметричную ПЦР, использование немеченых зондов и высокоразрешающий анализ плавления ДНК. Зонд-изолированная ПЦР разделяет амплификацию при ассиметричной ПЦР от выявления немеченых зон-

дами образцов. Это предотвращает соединение зонда с используемым образцом. Далее следует HRM с последующей детекцией имеющихся изменений в исследуемой нуклеотидной последовательности [5].

Метод HRM в диагностике наследственных болезней

HRM-анализ может быть использован для различных целей, в первую очередь для поиска уже известных и охарактеризованных однонуклеотидных замен (рис. 2).

Другим применением метода HRM является сканирование последовательности ДНК на возможное наличие мутаций перед секвенированием по Сэнгеру и отбор для секвенирования наиболее перспективных (в плане обнаружения нуклеотидных замен) образцов.

Диагностика ряда наследственных заболеваний (например, связанных с нарушением импринтинга) зачастую требует анализа эпигенетических маркеров, наиболее важным из которых является метилирование CpG динуклеотидов [6]. Метод HRM может быть эффективно использован и для изучения статуса метилирования ДНК. Большинство методов анализа метилирования ДНК основывается на бисульфитной обработке ДНК, в результате которой происходит замена неметилированного цитозина на урацил.

Анализируя и сравнивая кривые плавления обработанных бисульфитом ДНК со 100% конвертированными фрагментами, можно сделать вывод о степени метилирования: чем больше кривая плавления изучаемого фрагмента по форме и по высоте похожа на кривую плавления 100% конвертированного фрагмента, тем в большей степени произошло метилирование (рис. 3) [8, 9]. Одним из примеров является синдром Беквита—Видеманна, обусловленный нарушением импринтинга в районе 11p15.5. Этот район содержит два независимых центра импринтинга (IC1 и IC2). Первый центр контроля содержит гены *IGF2* и *H19*. Этот центр диффе-

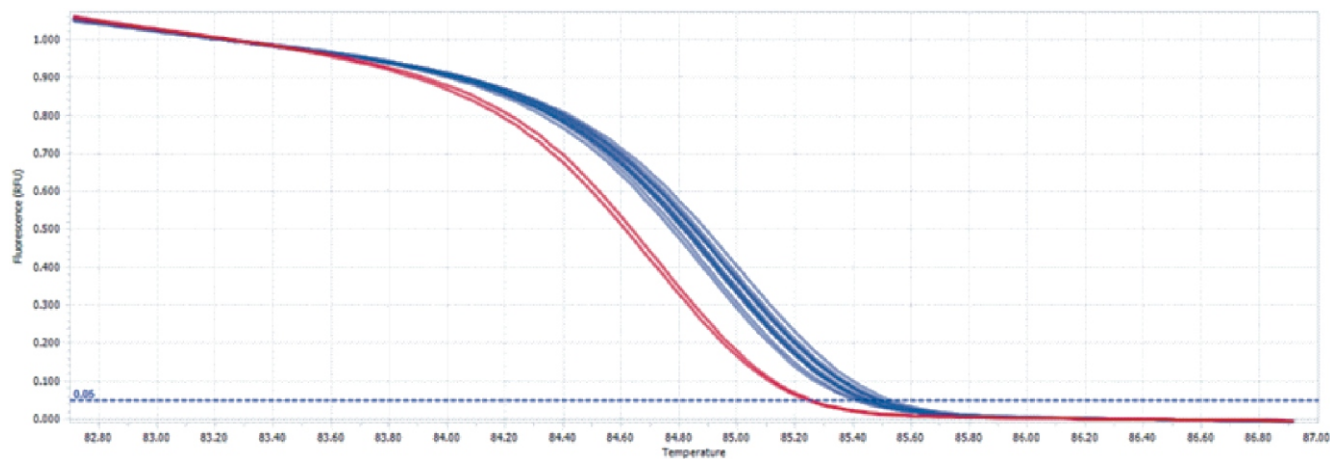


Рис. 2. Поиск точковой мутации. Синие кривые плавления соответствуют нормальному генотипу. Красные кривые плавления соответствуют гетерозиготе по точковой мутации с.1966 С>Т в экзоне 6 гена дистрофина.

ренциально метилирован и метилирование присутствует только на отцовском аллеле. Второй центр содержит такие гены, как *CDKN1C* и *KCNQ1OT1*, данный регион метилируется только на материнском аллеле. У небольшой части пациентов наблюдаются мутации в гене *CDKN1C*, однако чаще всего заболевание является следствием дефектного метилирования IC1 или IC2. Причиной этого является однородительская дисомия или дупликация отцовского района 11p15 [10]. Молекулярно-генетический анализ для подтверждения клинического диагноза осуществляется путем оценки статуса метилирования IC1 и IC2. Дефекты метилирования при данном заболевании являются мозаичными, следовательно, анализ носит количественный характер. Ранее для количественной оценки метилирования применяли метод Саузерн-блоттинга с использованием чувствительных к метилированию ферментов и измерением интенсивности окраски полос, соответствующих метилированным и неметилированным аллелям. Однако данный метод требует большого количества ДНК, сложен и трудоемок. Для этой цели могут быть также использованы методы MS-MLPA, MS-PCR и пиросеквенирование [11]. Тем не менее, несмотря на их преимущество перед методом Саузерн-блоттинга, данные методы являются довольно трудоемкими по сравнению с HRM-генотипированием.

Обработка ДНК бисульфитом вызывает различия в последовательности метилированной и неметилированной ДНК (в результате замены неметилированного цитозина на урацил). Кривая плавления в таком случае имеет два ярко выраженных района плавления соответствующих IC1 и IC2, между ними кривая выходит на плато. Так как метод HRM позволяет выявить образцы даже с однонуклеотидной заменой, то можно достоверно отличать образцы ДНК с разной степенью метилирования при сравнении их кривых плавления с кривыми плавления ДНК дикого типа [12]. Данная модификация, а также описанная выше зонд-изолированная ПЦР с последующим HRM-анализом являются приме-

рами модификаций этапа, предшествующего анализу кривых плавления, позволяющих более точно выявить отличия в разных образцах ДНК. Помимо описанных модификаций, существуют и другие модификации первого этапа анализа, однако об их использовании в диагностике наследственных заболеваний не упоминается. Также следует понимать, что изменению подлежит только первый этап — амплификация ДНК, анализ же кривых плавления во всех модификациях остается неизменным [13].

С углублением наших знаний о генетических основах наследственных заболеваний, расширением диапазона применения генетических исследований в клинической практике возрастает потребность в быстром и недорогом методе, позволяющем эффективно обнаружить мутации, приводящие к различным наследственным болезням или связанным с развитием многофакторной патологии.

Анализ кривой плавления особенно успешно применяется в тех случаях, когда исследуются гены большой протяженности, так как в итоге в значительной степени удастся снизить количество участков, требующих секвенирования. В таких случаях последовательно исследуются различные участки гена, что обеспечивает возможность выбрать только те из них, которые отличаются от дикого типа. Ниже приведены гены и наследственные заболевания (таблица) в отношении которых был успешно применен метод HRM. Была определена чувствительность метода при выявлении гетерозигот и гомозигот. В 80% опубликованных работ чувствительность метода HRM была определена в 100%. Средняя чувствительность метода по анализу всех этих работ достигает 98,4%.

Для поиска мутаций в генах *BRCA1/BRCA2* при наследственном раке молочной железы золотым стандартом является метод денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (ДВЭЖХ). Однако, несмотря на его высокую чувствительность, этот метод не позволяет выявить все возможные мутации [22, 39].

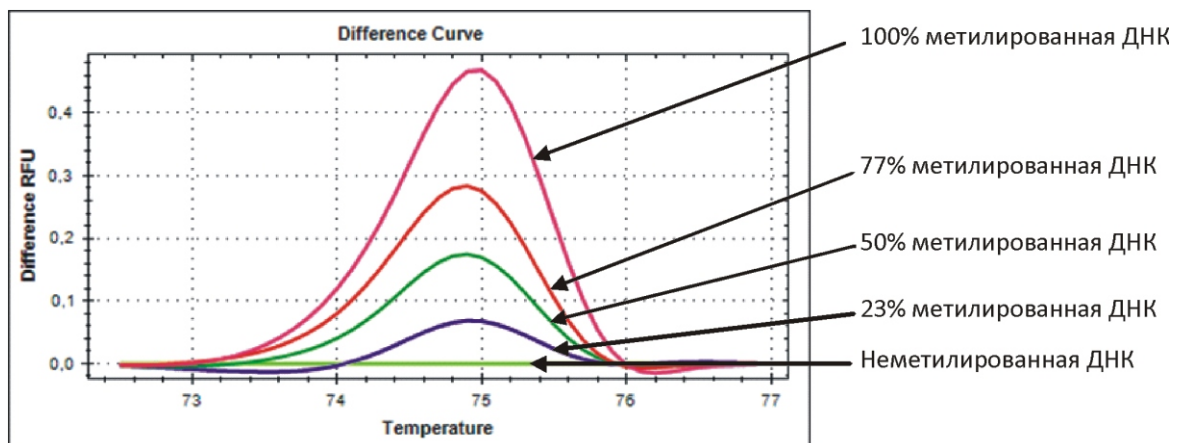


Рис. 3. Сравнение кривых плавления ДНК с разной степенью метилирования, обработанных бисульфитом натрия [7].

Другим примером заболевания, при диагностике которого эффективно используется метод HRM, является муковисцидоз, вызываемый мутациями в гене *CFTR*. С 1989 года, когда был идентифицирован ген *CFTR*, удалось выявить более 2000 мутаций, ответственных за развитие данной патологии [40]. Частоты определенных мутаций значительно различаются между разными этническими группами и популяциями. Данная особенность затрудняет поиск мутаций, а секвенирование всего гена остается дорогостоящим и трудоемким подходом. Метод HRM активно применяется в диагностике муковисцидоза, а также в исследованиях гена *CFTR* [15, 39].

Аналогичная ситуация складывается и с геном дистрофина, мутации в котором приводят к миодистрофии Дюшенна—Беккера (МДД/Б). Ген дистрофина является самым большим геном, изученным на данный момент и простирается на 2,3 млн п.н., содержит 79 экзонов, составляющих только 0,6% нуклеотидной структуры всего гена. Большая часть гена представлена протяженными интронами. Установлено, что 60% мутаций, приводящих к МДД/Б — это делеции одного или нескольких эк-

зонов, 5—10% — дупликации, а 30% — точковые мутации [42]. В то время, как для поиска протяженных делеций и дупликаций существует немало методов, поиск точковых мутаций требует использования чувствительного метода, позволяющего идентифицировать отличия даже в один нуклеотид. Более того, в данном случае клинически важным является выявление точковых мутаций не только в гемизиготном состоянии, но и в гетерозиготном у женщин-носительниц заболевания. Для гена дистрофина была показана возможность выявления гетерозигот методом HRM почти в 100% случаев. Следует отметить, что МДД/Б является заболеванием, сцепленным с полом, им страдают почти исключительно лица мужского пола. Выявление же гемизиготы иногда может быть затруднительным, в таких случаях прибегают к созданию «искусственных» гетерозигот, смешивая образец ДНК больного с ДНК другой гемизиготы, не несущей мутаций. После проделанных манипуляций точковые мутации успешно выявляются методом HRM [36, 43].

Также при исследовании гена дистрофина была показана возможность использования метода HRM для выявления непротяженных делеций и дупликаций [44,

Таблица

**Гены с большим числом экзонов,
в исследовании которых был успешно применен метод анализа кривой плавления**

Название гена	Количество экзонов	Заболевания	Ссылка
<i>CFTR</i>	24	Муковисцидоз	[14—17]
<i>BRCA1</i>	22	Рак молочной железы	[18—22]
<i>BRCA2</i>	27	Рак молочной железы	[18—22]
<i>ACADM</i>	12	Дефицит ацил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот со средней длины цепи	[23]
<i>SLC22A5</i>	10	Первичный системный дефицит карнитина	[24]
<i>SMN1</i>	8	Спинальная мышечная атрофия	[25]
<i>PYGM</i>	20	Болезнь Мак-Ардля	[26]
<i>LMNA</i>	12	Ламинопатии	[27]
<i>MLH1</i>	19	Синдром Линча	[28]
<i>FBN1</i>	65	Синдром Марфана	[29]
<i>NF2</i>	17	Опухоли нервной системы	[30]
<i>EXT1</i>	11	Множественные остеохондромы	[31]
<i>EXT2</i>	14	Множественные остеохондромы	[31]
<i>RET</i>	20	Множественная эндокринная неоплазия 2 типа	[32]
<i>SCN5A</i>	28	Сердечно-сосудистые заболевания	[33]
<i>MYH9</i>	41	Альпорт-подобные синдромы	[34]
<i>F8</i>	26	Гемофилия А	[35]
<i>DMD</i>	79	Миодистрофия Дюшенна-Беккера	[36]
<i>PAH</i>	13	Фенилкетонурия	[37]
<i>OTC</i>	10	Дефект метаболизма мочевины	[38]

45]. Однако интерпретацию результатов исследования гена дистрофина (как и других генов, находящихся на половых хромосомах) следует проводить, обязательно учитывая пол исследуемого пациента. В двух различных по полу группах графики нормализованных пиков кривых плавления фрагментов ДНК с дубликацией или делецией будут отличаться от нормального генотипа.

При изучении генов, в которых имеются частые однонуклеотидные замены, поиск мутации может быть затруднен. Одним из таких генов является ген *ATM*. Мутации в данном гене приводят к нейродегенеративному наследственному заболеванию — синдрому Луи—Бар. Для поиска мутаций непосредственно перед HRM анализом проводят «вложенную» ПЦР с двумя парами праймеров, на 3'-конце которых находился блок, предотвращающий удлинение ампликона при амплификации. Разделение одного ампликона на несколько кластеров значительно увеличивает эффективность обнаружения мутаций. Для поиска мутаций в гене *ATM* иногда используют метод анализа одноцепочечного конформационного полиморфизма ДНК, который, однако, является относительно низко чувствительным, а более чувствительным методом является ДВЭЖХ [46]. Было проведено сравнение эффективности выявления мутаций при использовании различных методов, включая метод HRM. В 13 работах, посвященных выявлению мутаций альтернативными методами, был проанализирован 2661 образец и частота выявления мутаций составила 0,000017. При использовании метода HRM (1356 образцов), частота выявления мутации составила 0,000024. Следовательно, эффективность выявления мутаций методом HRM оказалась в 1,4 раза выше эффективности других методов [46].

Метод HRM также является эффективным методом анализа коротких фрагментов при поиске мутаций без использования меченых зондов. Так, данный метод был успешно применен для генотипирования гена *PAH* [37, 47], мутации в котором вызывают фенилкетонурию, и гена *OTC* [38], мутации в этом гене являются причиной наследственной гипераммониемии. Генотипирование коротких фрагментов методом HRM позволяет отличить образцы ДНК с полиморфизмом от образцов с мутацией, которая ведет к наследственному заболеванию. Для достижения этого кривые плавления образцов с предполагаемой мутацией сравнивали с таковыми контрольной группы, в которую входили образцы с известными полиморфными заменами [37]. Если кривая плавления совпадала с одной из кривых плавления контрольной группы, данный образец аннотировали по тому образцу, с которым она совпала, если же совпадений не наблюдалось, проводили секвенирование, чтобы выявить имеющиеся мутации [38].

Низкая стоимость и простота генотипирования делает метод HRM идеальным для поиска новых мутаций.

Метод HRM с использованием немеченых зондов был успешно применен при анализе таких генов, как *APOE* [5, 48, 49] (семейная гиперхолестеринемия), *LOXLI* (экзофоллиативная глаукома) [50] и *CFTR* (муковисцидоз) [51, 52]. Также метод HRM успешно используют для скрининга мутаций при тромбофилии [53] и двух частых мутаций в гене *RET*, которые приводят к множественной неоплазии типа 2B [54].

Ограничения метода HRM

Несмотря на перечисленные достоинства метод HRM также имеет некоторые ограничения. В первую очередь результаты зависят от качества ДНК. Оптимизация условий чаще всего требует проведения градиентного ПЦР. Длина ампликона также может существенно влиять на чувствительность метода. По мере уменьшения размера ампликона различия между температурами плавления становятся более выраженными. Чувствительность метода при анализе образцов в 400–1000 п.н. уменьшается со 100% до 99–96% по сравнению с анализом образцов в 100–300 п.н. Более того, кривые плавления различных гетерозигот могут не различаться между собой и, несмотря на то, что их кривые плавления будут четко отличаться от гомозиготных образцов, между собой они могут совпадать. Гомозиготы также не всегда выявляются, что требует повторного проведения анализа с использованием искусственно созданной гетерозиготы из анализируемого образца и образца без мутации. Как и любой другой метод, HRM также может быть лимитирован качеством красителей, реагентов и аппаратуры [41].

Заключение

Благодаря своей простоте и эффективности метод HRM получил широкое применение в научной и клинической практике. Однако, несмотря на простоту постановки и высокую точность результатов очень важно обращать особое внимание на оптимизацию параметров ПЦР. Также следует помнить о том, что уменьшение длины ампликона способствует получению более достоверных результатов, а использование более эффективных насыщающих красителей, позволяет детектировать как гомозигот, так и гетерозигот. Также важным условием успешного применения метода является качество образцов ДНК.

Метод HRM позволяет сделать выводы о наличии или отсутствии изменений в последовательности ДНК. Результаты, получаемые методом HRM достоверны, поэтому данный метод, безусловно, является очень перспективным для диагностики наследственных заболеваний.

Список литературы

1. Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2010; 10: 219-40. doi: 10.1586/erm.09.84.
2. Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, Wittwer CT, Voelkerding K V. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: Cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem* 2006; 52: 494-503. doi: 10.1373/clinchem.2005.063438.
3. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 2003; 49: 853-60. doi: 10.1373/49.6.853.
4. Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem* 2004; 50: 1748-54. doi: 10.1373/clinchem.2003.029751.
5. Poulson MD, Wittwer CT. Closed-tube genotyping of apolipoprotein E by isolated-probe PCR with multiple unlabeled probes and high-resolution DNA melting analysis. *Biotechniques* 2007; 43: 87-91. doi: 10.2144/000112459.
6. Ehrich M, Field JK, Liloglou T, Xinarianos G, Oeth P, Nelson MR, et al. Cytosine methylation profiles as a molecular marker in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 10911-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0400.
7. Maretina M, Zheleznyakova G, Baranov V, Kiselev A. DYNC1H1 gene methylation correlates with a severity of spinal muscular atrophy. *Eur. J. Hum. Genet. Abstr. Eur. Hum. Genet. Conf.*, 2016, p. 220.
8. Worm J, Aggerholm A, Guldberg P. In-Tube DNA Methylation Profiling by Fluorescence Melting Curve Analysis. *Clin Chem* 2001; 47: 1183-9.
9. Gorniak P, Ejduk A, Borg K, Makuch-Lasica H, Nowak G, Lech-Maranda E, et al. Comparison of high-resolution melting analysis with direct sequencing for the detection of recurrent mutations in DNA methyltransferase 3A and isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes in acute myeloid leukemia patients. *Eur J Haematol* 2016; 96: 181-7. doi: 10.1111/ejh.12566.
10. Weksberg R, Shuman C, Beckwith JB. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 8-14. doi: 10.1038/ejhg.2009.106.
11. Priolo M, Sparago A, Mammi C, Cerrato F, Lagana C, Riccio A. MS-MLPA is a specific and sensitive technique for detecting all chromosome 11p15.5 imprinting defects of BWS and SRS in a single-tube experiment. *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 565-71. doi: 10.1038/sj.ejhg.5202001.
12. Alders M, Blik J, vd Lip K, vd Bogaard R, Mannens M. Determination of KCNQ1OT1 and H19 methylation levels in BWS and SRS patients using methylation-sensitive high-resolution melting analysis. *Eur J Hum Genet* 2009; 17: 467-73. doi: 10.1038/ejhg.2008.197.
13. Vossen RHAM. Genotyping 2017; 1492: 17-28. doi: 10.1007/978-1-4939-6442-0.
14. Montgomery J, Wittwer CT, Kent JO, Zhou L. Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis. *Clin Chem* 2007; 53: 1891-8. doi: 10.1373/clinchem.2007.092361.
15. Audrezet M-P, Dabricot A, Le Marechal C, Ferec C. Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *J Mol Diagnostics* 2008; 10: 424-34. doi: 10.2353/jmolddx.2008.080056.
16. Chou L-S, Lyon E, Wittwer CT. A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 330-8. doi: 10.1309/BF3M-LJN8-J527-MWQY.
17. Destouni A, Poulou M, Kakourou G, Vrettou C, Tzetis M, Traeger-Synodinos J, et al. Single-cell high resolution melting analysis: A novel, generic, pre-implantation genetic diagnosis (PGD) method applied to cystic fibrosis (HRMA CF-PGD). *J Cyst Fibros* 2016; 15: 163-70. doi: 10.1016/j.jcf.2015.09.009.
18. Cvok ML, Cretnik M, Musani V, Ozretic P, Levanat S. New sequence variants in BRCA1 and BRCA2 genes detected by high-resolution melting analysis in an elderly healthy female population in Croatia. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 1376-83. doi: 10.1515/CCLM.2008.307.
19. De Juan I, Esteban E, Palanca S, Barragan E, Bolufer P. High-resolution melting analysis for rapid screening of BRCA1 and BRCA2 Spanish mutations. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 115: 405-14. doi: 10.1007/s10549-008-0073-7.
20. De Leeneer K, Coene I, Poppe B, De Paepe A, Claes K. Rapid and sensitive detection of BRCA1/2 mutations in a diagnostic setting: Comparison of two high-resolution melting platforms. *Clin Chem* 2008; 54: 982-9. doi: 10.1373/clinchem.2007.098764.
21. de Juan Jimenez I, Carderosa EE, Suela SP, Gonzalez EB, Trejo DS, Lluich OF, et al. Advantage of high-resolution melting curve analysis over conformation-sensitive gel electrophoresis for mutational screening of BRCA1 and BRCA2 genes. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 578-82. doi: 10.1016/j.cca.2010.12.007.
22. de Oliveira ES, Soares BL, Lemos S, Rosa RCA, Rodrigues AN, Barbosa LA, et al. Screening of the BRCA1 gene in Brazilian patients with breast and/or ovarian cancer via high-resolution melting reaction analysis. *Fam Cancer* 2016; 15: 173-81. doi: 10.1007/s10689-015-9858-0.
23. McKinney JT, Longo N, Hahn SH, Matern D, Rinaldo P, Strauss AW, et al. Rapid, comprehensive screening of the human medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene. *Mol Genet Metab* 2004; 82: 112-20. doi: 10.1016/j.ymgme.2004.04.004.
24. Dobrowolski SF, McKinney JT, Di San Filippo CA, Keow GS, Wilcken B, Longo N. Validation of dye-binding/high-resolution thermal denaturation for the identification of mutations in the SLC22A5 gene. *Hum Mutat* 2005; 25: 306-13. doi: 10.1002/humu.20137.
25. Chen WJ, Dong WJ, Lin XZ, Lin MT, Murong SX, Wu ZY, et al. Rapid diagnosis of spinal muscular atrophy using high-resolution melting analysis. *BMC Med Genet* 2009; 10. doi: 10.1186/1471-2350-10-45.
26. Duno M, Quinlivan R, Vissing J, Schwartz M. High-resolution melting facilitates mutation screening of PYGM in patients with McArdle disease. *Ann Hum Genet* 2009; 73: 292-7. doi: 10.1111/j.1469-1809.2009.00512.x.
27. Millat G, Chanavat V, Julia S, Crehalet H, Bouvagnet P, Rousson R. Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the LMNA gene. *Clin Biochem* 2009; 42: 892-8. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.01.016.
28. Rouleau E, Lefol C, Bourdon V, Coulet F, Noguchi T, Soubrier F, et al. Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: Application to MLH1 germline mutations in lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009; 30: 867-75. doi: 10.1002/humu.20947.
29. Hung C-C, Lin S-Y, Lee C-N, Cheng H-Y, Lin C-Y, Chang C-H, et al. Identification of fibrillin-1 gene mutations in Marfan syndrome by high-resolution melting analysis. *Anal Biochem* 2009; 389: 102-6. doi: 10.1016/j.ab.2009.03.032.
30. Sestini R, Provenzano A, Bacci C, Orlando C, Genuardi M, Papi L. NF2 mutation screening by denaturing high-performance liquid chromatography and high-resolution melting analysis. *Genet Test* 2008; 12: 311-8. doi: 10.1089/gte.2007.0096.

31. Lonie L, Porter DE, Fraser M, Cole T, Wise C, Yates L, et al. Determination of the mutation spectrum of the EXT1/EXT2 genes in British Caucasian patients with multiple osteochondromas, and exclusion of six candidate genes in EXT negative cases. *Hum Mutat* 2006; 27: 1160.
32. Margraf RL, Mao R, Wittwer CT. Rapid diagnosis of MEN2B using unlabeled probe melting analysis and the LightCycler 480 instrument. *J Mol Diagn* 2008; 10: 123-8. doi: 10.2353/jmoldx.2008.070111.
33. Millat G, Chanavat V, Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R. Rapid, sensitive and inexpensive detection of SCN5A genetic variations by high resolution melting analysis. *Clin Biochem* 2009; 42: 491-9. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.10.014.
34. Provaznikova D, Kumstyrova T, Kotlin R, Salaj P, Matoska V, Hrachovinova I, et al. High-resolution melting analysis for detection of MYH9 mutations. *Platelets* 2008; 19: 471-5. doi: 10.1080/09537100802140013.
35. Laurie AD, Smith MP, George PM. Detection of factor VIII gene mutations by high-resolution melting analysis. *Clin Chem* 2007; 53: 2211-4. doi: 10.1373/clinchem.2007.093781.
36. Almomani R, van der Stoep N, Bakker E, den Dunnen JT, Breuning MH, Ginjaar IB. Rapid and cost effective detection of small mutations in the DMD gene by high resolution melting curve analysis. *Neuromuscul Disord* 2009; 19: 383-90. doi: 10.1016/j.nmd.2009.03.004.
37. Dobrowolski SF, Ellingson C, Coyne T, Grey J, Martin R, Naylor EW, et al. Mutations in the phenylalanine hydroxylase gene identified in 95 patients with phenylketonuria using novel systems of mutation scanning and specific genotyping based upon thermal melt profiles. *Mol Genet Metab* 2007; 91: 218-27. doi: 10.1016/j.ymgme.2007.03.010.
38. Dobrowolski SF, Ellingson CE, Caldovic L, Tuchman M. Streamlined assessment of gene variants by high resolution melt profiling utilizing the ornithine transcarbamylase gene as a model system. *Hum Mutat* 2007; 28: 1133-40. doi: 10.1002/humu.20558.
39. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DEC, Rosen B, Bradley L, Fan I, et al. Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: A kin-cohort study in Ontario, Canada. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1694-706. doi: 10.1093/jnci/djj465.
40. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Grzelczak Z, Zielenski J, et al. Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA Published by: American Association for the Advancement of Science Science (80-) 1989; 245: 1066-73.
41. Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: Advancements and limitations. *Hum Mutat* 2009; 30: 857-9. doi: 10.1002/humu.20951.
42. Den Dunnen JT, Grootsholten RM, Bakker E, Blonden LAJ, Ginjaar HB, Wapenaar MC, et al. Topography of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Gene: FIGE and cDNA Analysis of 194 Cases Reveals 115 Deletions and 13 Duplications. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 835-47.
43. Esterhuizen AI, Wilmshurst JM, Goliath RG, Greenberg LJ. Duchenne muscular dystrophy: High-resolution melting curve analysis as an affordable diagnostic mutation scanning tool in a south african cohort. *South African Med J* 2014; 104: 779-84. doi: 10.7196/SAMJ.8257.
44. Borun P, Bartkowiak A, Banasiewicz T, Nedoszytko B, Nowakowska D, Teisseyre M, et al. High Resolution Melting analysis as a rapid and efficient method of screening for small mutations in the STK11 gene in patients with Peutz-Jeghers syndrome. *BMC Med Genet* 2013; 14(1): 58. doi: 10.1186/1471-2350-14-58
45. Borun P, Kubaszewski L, Banasiewicz T, Walkowiak J, Skrzypczak-Zielinska M, Kaczmarek-Rys M, et al. Comparative-high resolution melting: A novel method of simultaneous screening for small mutations and copy number variations. *Hum Genet* 2014; 133: 535-45. doi: 10.1007/s00439-013-1393-1.
46. Nguyen-Dumont T, Le Calvez-Kelm F, Forey N, McKay-Chopin S, Garritano S, Gioia-Patricola L, et al. Description and validation of high-throughput simultaneous genotyping and mutation scanning by high-resolution melting curve analysis. *Hum Mutat* 2009; 30: 884-90. doi: 10.1002/humu.20949.
47. Polak E, Ficek A, Radvanszky J, Soltysova A, Uрге O, Cmelova E, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency in the Slovak population: Genotype-phenotype correlations and genotype-based predictions of BH4-responsiveness. *Gene* 2013; 526: 347-55. doi: 10.1016/j.gene.2013.05.057.
48. Zhan XH, Zha GC, Jiao JW, Zheng YZ, Yang LY, Zhan XF, et al. Rapid identification of apolipoprotein E genotypes by high-resolution melting analysis in Chinese Han and African Fang populations. *Exp Ther Med* 2015; 9: 469-75. doi: 10.3892/etm.2014.2097.
49. Wang Z, Ma W, Rong Y, Liu L. The Association between Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Mild Cognitive Impairment among Different Ethnic Minority Groups in China. *Int J Alzheimer Dis* 2014; 150628.
50. Chiras D, Tzika K, Kokotas H, Oliveira SC, Grigoriadou M, Kastania A, et al. Development of novel LOXLI genotyping method and evaluation of LOXLI, APOE and MTHFR polymorphisms in exfoliation syndrome/glaucoma in a Greek population. *MolVis* 2013; 19: 1006-16: 1006-16.
51. Zhou L, Myers AN, Vandersteen JG, Wang L, Wittwer CT. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clin Chem* 2004; 50: 1328-35. doi: 10.1373/clinchem.2004.034322.
52. Rosendahl J, Landt O, Bernadova J, Kovacs P, Teich N, Bodeker H, et al. CFTR, SPINK1, CTRE and PRSS1 variants in chronic pancreatitis: is the role of mutated CFTR overestimated? *Gut* 2012; 582-92. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300645.
53. Zhou L, Wang L, Palais R, Pryor R, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution. *Clin Chem* 2005; 51: 1770-7. doi: 10.1373/clinchem.2005.054924.
54. Margraf RL, Mao R, Highsmith WE, Holtegaard LM, Wittwer CT. RET proto-oncogene genotyping using unlabeled probes, the masking technique, and amplicon high-resolution melting analysis. *J Mol Diagn* 2007; 9: 184-96. doi: 10.2353/jmoldx.2007.060091.