

宽皮柑橘单核苷酸多态性的高分辨率熔解曲线分型

吴波^{1,2,3}, 杨润婷¹, 朱世平², 钟云³, 姜波³, 曾继吾³, 钟广炎^{3,*}

(¹西南大学园艺园林学院, 重庆 400715; ²中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712; ³广东省农业科学院果树研究所, 农业部热带亚热带果树生物学与遗传资源利用重点实验室, 广州 510640)

摘要: 高分辨率熔解曲线分析 (High resolution melting analysis, HRM) 可以检测单碱基改变引起的 DNA 双链熔解温度 (T_m) 值变化, 从而可以对样本在单核苷酸多态性分子标记 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 上进行基因分型。通过分析 NCBI 数据库中宽皮柑橘的表达序列标签 (Expressed sequence tag, EST) 数据鉴别 SNP 位点, 并用小片段扩增法高分辨率熔解曲线分型技术 (High resolution melting analysis of small amplicons) 分析 11 个宽皮柑橘 (*Citrus reticulata*) 品种以及柳橙 (*Citrus sinensis* Osbeck var. 'Liucheng') 的 5 个 SNP 位点的基因型。结果显示, 小片段扩增法高分辨率熔解曲线分型可以快速、清楚地分辨纯合与杂合基因型, 在校正温度差异后也可以很好地分辨同一个 SNP 位点不同的纯合型。统计分析表明样本在所有 SNP 位点上均存在多态性, 5 个 SNP 位点的平均多态性信息含量 (PIC) 为 0.3190, 显示样本在这组 SNP 位点上具有较高的杂合率。

关键词: 宽皮柑橘; 高分辨率熔解曲线; 单核苷酸多态性; 基因分型

中图分类号: S 666.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 04-0777-06

Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms in Mandarin Cultivars Using High Resolution Melting Analysis

WU Bo^{1,2,3}, YANG Run-ting¹, ZHU Shi-ping², ZHONG Yun³, JIANG Bo³, ZENG Ji-wu³, and ZHONG Guang-yan^{3,*}

(¹College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400715, China; ²Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China; ³Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fruit Biology and Genetic Resource Utilization, Ministry of Agriculture, Fruit Tree Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: High resolution melting analysis (HRM) is capable of detecting changes in melting temperature (T_m) of double strand DNA sequences caused by single nucleotide changes, and is suitable to genotype genetic samples using known single nucleotide polymorphic sites (SNPs). *Citrus reticulata* ESTs from NCBI EST database were searched for SNPs, and 5 SNPs were selected to genotype 11 mandarin and 1 sweet orange cultivars using HRM genotyping of small amplicons. The results showed that, at a given

收稿日期: 2011-11-28; 修回日期: 2012-03-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30971992); 国家现代产业 (柑橘) 技术体系项目 (CARS-27); 长江学者和创新团队发展计划项目 (IRT0976)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: gy_zhong@163.com)

SNP site, a heterozygous genotype could be easily and clearly distinguished from a homozygous genotype by HRM, and 2 different homozygous genotypes could also be easily identified when temperature was calibrated. All 5 SNPs were found polymorphic in analyzed citrus samples, with an average polymorphic information content (PIC) value of 0.3190, indicating that these samples are highly heterozygous at these SNP sites.

Key words: mandarin; high resolution melting; single nucleotide polymorphism; genotyping

单核苷酸多态性分子标记 (SNP) 是动、植物基因组中数量最多、分布最广的分子标记, 被广泛用于关联分析、生物多样性评价以及遗传图谱构建等。甜橙和温州蜜柑 EST 序列分析显示栽培柑橘种内存在大量 SNP, 但目前柑橘中 SNP 分子标记的开发和应用仍较少, 用到的 SNP 分型方法是扩增片段酶切多态性检测 (Cleaved amplified polymorphic sequences, CAPS) 和单链构象多态性检测 (Single strand conformation polymorphism, SSCP) (Zhong et al., 2008)。CAPS 只能应用于引起内切酶识别位点发生改变的突变位点, SSCP 则需要 PCR 扩增后聚丙烯酰胺电泳, 这两种方法试验周期均较长。利用高分辨率熔解曲线技术 (High resolution melting, HRM) 进行 SNP 分型, 具有快速、灵敏、普遍适用的特点, 因此在人类致病突变的检测中应用广泛 (Erali et al., 2008; López-Villar et al., 2010; Montgomery et al., 2010), 在植物尤其在果树研究中的应用相对较少 (Lehmensiek et al., 2008; Wu et al., 2008)。为提高效率, 本研究中引入了小片段扩增法高分辨率熔解曲线分型技术进行柑橘 SNP 分型, 结果显示该方法是一种较好的 SNP 分型技术。

1 材料与方 法

1.1 生物信息学分析及 SNP 位点的获得

于 2011 年 6 月从 NCBI EST 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载宽皮柑橘 EST 序列后, 先用 SeqClean (Pertea et al., 2003) 去除载体污染序列与简单重复末端序列, 再用 CAP3 (Huang & Madan, 1999) 软件拼接序列, 然后用 QualitySNP 处理鉴别 SNP (Tang et al., 2006)。从 Phytozome (<http://www.phytozome.org>) 下载克里曼丁橘基因组序列, 建立本地 BLAST 数据库 (Camacho et al., 2008), 利用 BLASTN 程序将 EST 拼接组与基因组序列对应。为了尽可能获得遵循自由分离规律的分子标记, 随机筛选了 5 个位于不同基因组拼接大片段上的 SNP (表 1) 进行下一步分析。

1.2 试验材料

于 2011 年 8 月从国家柑橘种质资源圃采取柳橙和 11 个宽皮柑橘叶片样本 (表 1), 利用 Easy-Pure Plant Genomic DNA Kit (Transgen Biotech) 提取全基因组 DNA, 所提取 DNA 浓度为 $20 \sim 50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由于甜橙在这些位点上的基因型已先期通过 EST 序列分析获得, 故将柳橙作为一个参照基因型。

1.3 引物设计

采用小片段扩增法进行 HRM 分型 (Liew et al., 2004)。为提高同一 SNP 位点上两种不同纯合型扩增片段的熔解温度 (T_m) 值之间的差异, 应使扩增片段尽可能短, 本研究中采用的扩增片段长度在 $36 \sim 55 \text{ bp}$ 之间。用 primer5 软件设计引物, 正反向引物的 3' 端尽可能靠近 SNP 位点, 尽量避免二级结构与引物二聚体的形成。一般认为引物 T_m 值在 $50 \sim 60 \text{ }^\circ\text{C}$ 之间即可, 本试验中引物的 T_m 值被限制在 $(53 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 范围内, 以便于 PCR 中使用相同的反应条件。由于在仪器读取熔解曲线过程中, 96 孔板上各孔之间温度可能存在一定差异, 故引入 T_m 已知的序列作为内参进行温度校正,

使用 T_m 60 °C 和 90 °C 的内参序列, 分别为 5'-TTAAATTATAAAATATTTATAATATTAATTATATA TATATAAATATAATA-C3-3' 和 5'-GCGCGGCCGCGCACTGACCCGAGACTCTGAGCGGCTGCTGA GGTGCGGAAGCGGAGGGGCGGG-C3-3' 及各自的反向互补序列, 内参序列的 3' 羟基末端均引入 3 碳烷基 (-C3) 修饰以阻止内参链在 PCR 过程中延伸 (Gundry et al., 2008)。

1.4 PCR 反应

PCR 扩增在 Biometra PCR 仪上进行, 采用 10 μ L 反应体系, 包含 40 ng 基因组 DNA, 0.5 U EasyTaq DNA 聚合酶 (Transgen Biotech), 1 \times PCR 缓冲液 (含 Mg^{2+}), 0.2 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 300 nmol \cdot L⁻¹ 正向和方向引物, 4 种内参脱氧核糖核苷酸链各 100 nmol \cdot L⁻¹, 1 \times LCGreen Plus 染料 (Idaho Technology)。PCR 反应步骤如下: 95 °C 变性 3 min; 然后 95 °C 10 s, 56 °C 10 s, 72 °C 8 s, 55 个循环, 紧接着 95 °C 变性 1 min, 最后 25 °C 复性 1 min。

1.5 HRM 检测及数据分析

高分辨率溶解曲线分析在 96 孔式 LightCycler (Spectron) 上进行, 在 55 ~ 95 °C 范围内收集荧光信号强度数据, 温度上升速率为 0.1 °C \cdot s⁻¹。

数据分析在 LightScanner 96 软件上进行, 第一步排除假阳性样本, 去除未点样及 PCR 无目标产物的点样孔。由于可能存在起始模板浓度差别、荧光信号收集差别以及孔间温度偏差, 对荧光信号进行标准化处理: 首先将转折出现前后的两个点定为 1 和 0, 然后利用内参对各孔温差进行校正。通过曲线形状可区分杂合基因型与纯合基因型, 通过 T_m 值之间的差异可以区分不同的纯合基因型。

1.6 分型结果的生物统计学分析

用 PowerMarker version3.25 对分型结果进行了生物统计学分析 (Liu & Muse, 2005), 重点分析等位基因频率 (allele frequency)、基因多样性 (gene diversity)、杂合率 (heterozygosity) 以及多态性信息含量 (PIC)。基因多样性值是从一个群体中随机抽取两个等位基因在给定分子标记位点不相同的概率, 它等于根据等位基因频率计算得到的预测杂合率值。PIC 值预测从一个群落中随机抽取两个个体在某一个多态性位点上基因型不同的概率。

2 结果与分析

2.1 小片段扩增法高分辨率溶解曲线分型

小片段扩增法高分辨率溶解曲线分型技术中使用了与双链 DNA 结合的饱和荧光染料, 荧光信号强度与 DNA 双链浓度成正比, 通过逐步增加温度同时监测每一步的荧光信号来产生溶解曲线, 该溶解曲线的一阶导数图在 DNA 双链的 T_m 值上有一特征峰, 具有不同 T_m 值的 DNA 双链形成的特征峰的位置存在差异。本研究试验结果显示, 溶解曲线分析可以清楚地区分同一个 SNP 位点上的杂合基因型与纯合基因型以及两种不同的纯合基因型。图 1 是标准化后的 clementine0.9_014051m 118A/C SNP 位点的溶解曲线图 (图 1, a), 以及荧光强度对温度的一阶导数图 (图 1, b)。由于 A/A 和 C/C 纯合型样本的 PCR 扩增产物中均只含一种 DNA 双链, 分别是“A 等位基因片段 + A 等位基因互补链”和“C 等位基因片段 + C 等位基因互补链”, 因此它们得到的溶解曲线形状一致 (图 1, a), 一阶导数曲线均是单峰 (图 1, b), 只是由于 T_m 值不同而都在温度轴上有平移, 溶解曲线图和一阶导数图均清楚地显示 A/A 型样本扩增片段的 T_m 值低于 C/C 纯合型样本, 这是因为碱基配对时 A/T 之间只有 2 个氢键而 C/G 有 3 个氢键。由于 A/C 杂合型样本的 PCR 扩增产物变性后会产生 4

种单链: A 等位基因片段, C 等位基因片段, 以及它们各自的互补链。因此, 在退火时会形成 4 种类型双链: A 等位基因片段 + A 等位基因互补链; A 等位基因片段 + C 等位基因互补链; C 等位基因片段 + C 等位基因互补链; C 等位基因片段 + A 等位基因互补链。由于第 2 种与第 4 种双链结构中有 1 个碱基错配, 因此理论上这两种链的 T_m 值应当明显低于第 1 种和第 3 种双链结构。由于有 4 种双链的存在, 杂合基因型样本的熔解曲线实际上是 4 种不同双链熔解曲线的叠加, 因此具有明显不同于纯合型样本的熔解曲线形状 (图 1, a)。实际上, 由于 1, 3 两种双链之间 T_m 值差异较小, 它们的在一阶导数图中的特征峰往往形成重叠, 2, 4 两种双链之间同样如此, 因此在一阶导数图中往往不能观察到 4 个不同的特征峰 (图 1, b), 但仍明显区别于纯合型的单峰 (图 1, b)。

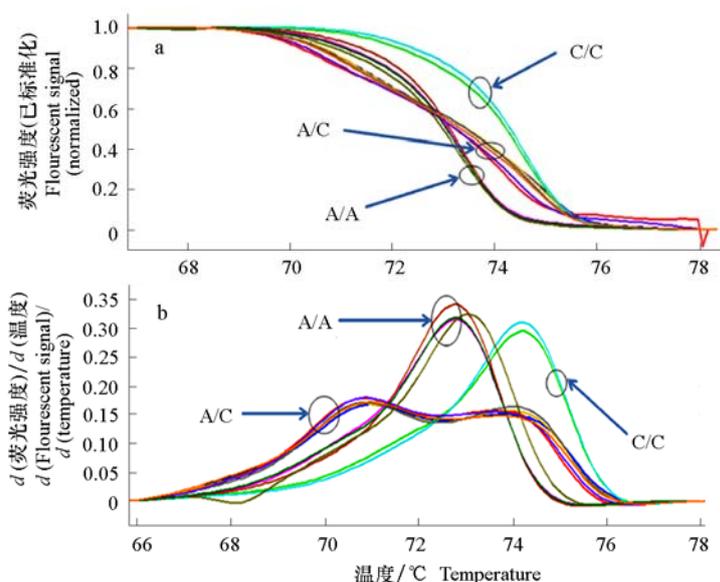


图 1 含 SNP 位点 (clementine0.9_014051m 118A/C) PCR 产物的高分辨率熔解曲线分析 (HRM) 图

图 a, b 中不同的曲线代表分别代表不同样本的标准化熔解曲线和荧光信号强度对温度的一阶导数图。

相同基因型样本的曲线由同一个圆圈标明。A/C: 杂合 SNP 位点, C/C 和 A/A: 纯合 SNP 位点。

Fig. 1 Melting curves of PCR products containing SNP clementine0.9_014051m 118A/C

Different curves in panel a, b were the melting curves and derivative melting curves for different samples, respectively.

The curves for different genotypes were denoted by separate circles.

A/C: The heterozygous genotype; C/C and A/A: The homologous genotypes.

2.2 样本的分型结果

理论上, 每个 SNP 位点可以将样本分为 3 组, 其中两组为纯合, 一组为杂合, 因此 5 个符合自由组合规律的 SNP 位点理论上可以区分 243 个不同遗传背景的本样本。HRM 分型数据显示, 本研究中筛选得到的 5 个 SNP 在样本中均存在多态性, 各样本至少在 1 个 SNP 位点有不同基因型, 已将各品种分开 (表 1)。结果还显示, 4 个 SNP 位点出现了全部 3 种预期基因型, 而在 clementine0.9_018003m 688C > T 位点只出现 T/C 杂合以及 C 纯合两种基因型。

生物信息学统计结果 (表 2) 显示, 5 个 SNP 位点的主要等位基因频率在 0.5833 ~ 0.9167 之间。不同 SNP 位点的杂合率与基因多样性值的差异程度不同, clementine0.9_003840m 632C > T 位点的杂合率高达 0.6667, 显著高于基因多样性值 0.4861, 而 clementine0.9_012548m 535T > C 位点的杂合率为 0.2500, 低于基因多样性值 0.4688。clementine0.9_018003m 688C > T 位点的杂合率最低, 为 0.1667。5 个 SNP 位点的平均 PIC 值为 0.3190, 除 clementine0.9_018003m 688C > T 位点的 PIC 值只有 0.1411 外, 其余 4 个位点的 PIC 值均大于 0.3500, 杂合率较高。

表 1 样本在 5 个 SNP 位点的分型结果

Table 1 Genotyping 11 mandarin and 1 sweet orange cultivars using 5 SNPs

柑橘样本 Citrus accessions	SNP 名称 SNP name				
	clementine 0.9_012548m 535T > C	clementine 0.9_014051m 118A > C	clementine 0.9_003840m 632C > T	clementine 0.9_025095m 147G > A	clementine 0.9_018003m 688C > T
柳橙 Sweet orange	T/C	A/C	T/C	A/A	T/C
帕森橘 Parson Mandarin	C/C	A/A	T/C	G/A	C/C
爱林达尔橘 Ellendale Mandarin	T/C	A/A	T/T	G/A	C/C
荔枝柑 Leeche Mandarin	C/C	A/C	T/C	G/A	C/C
默科特 Murcott	T/T	A/A	T/C	G/A	C/C
马塔里桔 Matathari Mandarin	T/C	A/C	C/C	G/A	C/C
瓯柑 Ougan	T/T	C/C	T/C	G/G	T/C
马蜂橘 Mafengju	T/T	A/A	T/C	G/G	C/C
提切橘 Tiche Mandarin	C/C	A/C	C/C	G/A	C/C
鹅蛋红橘 Edanhongju	T/T	A/C	C/C	G/G	C/C
卡拉 Cara Cara	T/T	C/C	T/C	G/G	C/C
安江红橘 Anjiang Hongju	T/T	A/C	T/C	G/A	C/C

注: clementine0.9_012548m 535T > C 指的是 Phytozome 克里曼丁基因组的 clementine0.9_012548m 转录物第 535 个核苷酸位点的一个 T/C 转换, T > C 指 T 等位基因频率高于 C。其余依此类推。

Note: clementine0.9_012548m 535T > C is a T/C transversion at the 535 nucleotide of the transcript "clementine0.9_012548m" from clementine genome (www.phytozome.org). T > C indicates that T occurs at a higher frequency than does C. The rest follow the same rule.

表 2 分型结果的生物统计学分析

Table 2 Bio-statistical analysis of genotyping data

SNP 名称 SNP name	主要等位基因频率 Major allele frequency	基因多样性 Gene diversity	杂合率 Heterozygosity	多态性信息含量 Polymorphic information content (PIC)
clementine0.9_012548m 535T > C	0.6250	0.4688	0.2500	0.3589
clementine0.9_014051m 118A > C	0.5833	0.4861	0.5000	0.3680
clementine0.9_003840m 632C > T	0.5833	0.4861	0.6667	0.3680
clementine0.9_025095m 147G > A	0.6250	0.4688	0.5833	0.3589
clementine0.9_018003m 688C > T	0.9167	0.1528	0.1667	0.1411
平均值 Average value	0.6667	0.4125	0.4333	0.3190

3 讨论

HRM 是较新的试验方法,可检测各种遗传变异,包括 SNP、插入/缺失以及 SSR 多态性(Ganopoulos et al., 2011),还可检测相同核苷酸序列的甲基化差异(White et al., 2007)。小片段扩增法 HRM 只需通过 PCR 扩增一个不超过 100 bp 的片段便可上样进行熔解曲线检测(Liew et al., 2004),整个反应过程不超过 2 h,在有快速 PCR 仪的情况下甚至可在 30 min 内完成分型。在引物设计理想的情况下,HRM 的分型结果可以明确分开 3 种不同基因型。在已知扩增片段所含 SNP 类型的情况下,可以预测 3 种基因型熔解曲线及其一阶导数的形状和特征峰的位置,甚至不需要已知基因型的参照样本便能可靠地推测熔解曲线代表的基因型,这一点在 DNA 序列信息尚匮乏物种的基因分型中十分有用,可节省测序成本。HRM 几乎可用于所有的 SNP 位点,即使两种不同纯合型扩增片段之间的 T_m 值差异低于 0.4 °C,也可根据加入一种已知纯合型扩增片段后的熔解曲线很容易地分辨样本的基因型(Liew et al., 2004)。在以往的 HRM SNP 分型中需要加入序列较短的探针(Zhou et al., 2008; Nguyen-Dumont et al., 2009),改变一个碱基可以导致 2 ~ 8 °C 的 T_m 值改变,以增加分辨率。本研究中为节约成本,未使用探针而是通过缩短 PCR 扩增产物的方法提高分辨率,结果表明,在将扩增片段长度限制到 50 bp 以内,不同纯合型片段 T_m 值的差异能够达到 1 ~ 3 °C,虽然 T_m 值差异幅度不如探针法,但分型结果同样清晰可靠,这可能得益于 LightCycler 因控温精度较高,所获得熔解曲线的分辨率较高(0.1 °C)。此外,引入内参序列进行温度校正也大大提高了小片段扩增法高分辨率

熔解曲线分型对不同纯合型的分辨能力 (Gundry et al., 2008)。

本研究中, 11 个宽皮柑橘的 5 个 SNP 位点分型结果主要等位基因频率从 0.58 到 0.92 不等, 表明这些 SNP 所在的基因组区域受到的自然选择压力和进化类型可能不同。所有宽皮柑橘样本在所分析的 SNP 位点上杂合率均超过 10%, 且其中 3 个 SNP 位点杂合率不低于 50%, 显示栽培宽皮柑橘杂合程度比较高。不同 SNP 位点的杂合率有明显的异质性。同一 SNP 位点杂合率与基因多样性值也有差别。clementine0.9_012548m 535T > C、clementine0.9_003840m 632C > T、clementine0.9_025095m 147G > A 3 个 SNP 位点的基因多样性值与杂合率相差 20% 以上, 这种差异可能反应实际情况也可能由于样本较小而存在取样偏差。5 个 SNP 位点 PIC 平均值为 0.3190, 其中 4 个高于 0.3500, 显示这些 SNP 位点在品种区分、杂种鉴定、遗传多样性评价上应用价值较高。作者正在探索利用 10 个左右 SNP 来区分所有宽皮柑橘资源和品种材料的可能性, 希望能借此解决同物异名、同名异物问题, 并为每个资源材料找到一个由 SNP 组成的独一无二的 DNA 身份条码。

References

- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden T L. 2008. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10: 421.
- Erali M, Voelkerding K V, Wittwer C T. 2008. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and Molecular Pathology*, 85: 50 - 58.
- Ganopoulos L, Argiriou A, Tsaftaris A. 2011. Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for authenticity testing of protected designation of origin (PDO) sweet cherry products. *Food Control*, 22: 532 - 541.
- Gundry C N, Dobrowolski S F, Martin Y R, Robbins T C, Nay L M, Boyd N, Coyne T, Wall M D, Wittwer C T, Teng D H F. 2008. Base-pair neutral homozygotes can be discriminated by calibrated high-resolution melting of small amplicons. *Nucleic Acids Research*, 36: 3401 - 3408.
- Huang X, Madan A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9: 868 - 877.
- Lehmensiek A, Sutherland M W, McNamara R B. 2008. The use of high resolution melting (HRM) to map single nucleotide polymorphism markers linked to a covered smut resistance gene in barley. *Theoretical and Applied Genetic*, 117: 721 - 728.
- Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C. 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical Chemistry*, 50: 1156 - 1164.
- Liu K, Muse S V. 2005. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21: 2128 - 2129.
- López-Villar I, Ayala R, Wesselink J, Morillas J D, López E, Marín J C, Díaz-Tasende J, González S, Robles L, Martínez-López J. 2010. Simplifying the detection of MUTYH mutations by high resolution melting analysis. *BMC Cancer*, 10: 408.
- Montgomery J L, Sanford L N, Wittwer C T. 2010. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 10: 219 - 240.
- Nguyen-Dumont T, Le Calvez-Kelm F, Forey N, McKay-Chopin S, Garritano S, Gioia-Patricola L, De Silva D, Weigel R, Sangrajang S, Lesueur F, Tavtigian S V. 2009. Description and validation of high-throughput simultaneous genotyping and mutation scanning by high-resolution melting curve analysis. *Human Mutation*, 30: 884 - 890.
- Pertea G, Huang X, Liang F, Antonescu V, Sultana R, Karamycheva S, Lee Y, White J, Cheung F, Parvizi B, Tsai J, Quackenbush J. 2003. TIGR gene indices clustering tools (TGICL): A software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics*, 19: 651 - 652.
- Tang J, Vosman B, Voorrips R E, van der Linden C G, Leunissen J A M. 2006. QualitySNP: A pipeline for detecting single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in EST data from diploid and polyploid species. *BMC Bioinformatics*, 7: 438.
- White H E, Hall V J, Cross N C P. 2007. Methylation-sensitive high resolution melting-curve analysis of the SNRPN gene as a diagnostic screen for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Clinical Chemistry*, 53: 1960 - 1962.
- Wu S B, Wirthensohn M G, Hunt P, Gibson J P, Sedgley M. 2008. High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 1 - 14.
- Zhong G Y, Zeng Z R, Ye Q L, Jiang D. 2008. Development of SNP markers for citrus genotype analysis. *Proceedings of the 11th International Citrus Congress*, Wuhan, China. Beijing: China Agriculture Press: 448.
- Zhou L, Errigo R J, Lu H, Poritz M A, Seipp M T, Wittwer C T. 2008. Snapback primer genotyping with saturating DNA dye and melting analysis. *Clinical Chemistry*, 54: 1648 - 1656.