

文章编号 (Article ID): 1009 - 2137(2011)04 - 0999 - 06

• 论著 •

急性髓系白血病 *NPM1* 基因突变检测方法的研究李志鹏^{1,2}, 张绚¹, 赵晓明¹, 李庆阁¹, 陈亚玫², 鹿全意²¹厦门大学生命科学学院, 福建厦门, 361005; ²厦门大学附属中山医院血液科, 福建厦门, 361004

摘要 本研究旨在建立检测急性髓系细胞白血病(AML)患者 *NPM1* 基因突变的方法。针对 *NPM1* 基因突变集中区域设计引物/探针, 建立高分辨溶解曲线方法(HRM)和等位基因特异 PCR 方法(AS-PCR), 通过 89 份 AML 标本进行了临床评估, 并采用毛细管电泳法(CE)和测序法作为对照进行了验证。结果表明, 通过上述 4 种方法共检出阳性标本 17 例(19.1%), 其中 A 型突变 15 例, B 型和 Nm 型突变各 1 例。上述方法中 HRM 法检测全面, 灵敏度为 5%, 而 AS-PCR 法有一定的漏检, 但灵敏度高达 0.01%。结论: 考虑到操作的难易程度, 同时也结合临床样品的检测情况, HRM 在临床上可法用于 *NPM1* 突变筛查, 而 AS-PCR 法可用于后续的微小残留病定量检测。

关键词 急性髓系细胞白血病; *NPM1* 基因; 毛细管电泳; 高分辨溶解曲线法; 等位基因特异 PCR

中图分类号 R733.71; Q503

文献标识码 A

Evaluation of Methods for Detection of *NPM1* Gene Mutations in Acute Myeloid LeukemiaLI Zhi-Peng^{1,2}, ZHANG Xuan¹, ZHAO Xiao-Ming¹, LI Qing-Ge¹, CHEN Ya-Mei², LU Quan-Yi²¹School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China; ²Department of Hematology, Xiamen University Zhongshan Hospital, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Corresponding Author: LI Qing-Ge, Professor. Tel: (0592) 2187363. E-mail: qgli@xmu.edu.cn; LU Quan-Yi, Senior Physician, Professor. Tel: (0592) 2292032. E-mail: quanyilu@hotmail.com

Abstract The purpose of this study was to establish real-time based methods for detection of *NPM1* gene mutation in acute myeloid leukemia (AML). Primers/probes were designed according to the clustered region of *NPM1* mutations on exon 12. Two real-time PCR assays, including high resolution melting curve (HRM) and allele-specific PCR (AS-PCR), were developed and clinically evaluated with 89 AML samples, which were parallely detected by capillary electrophoresis (CE) and sequencing. The results showed that a total of 17 mutation-positive samples were detected, including type A (15 cases), type B (1 case) and type Nm (1 case). HRM assay could detect all mutant types, and the analytical sensitivity was around 5%. In contrast, AS-PCR assay detected only 95% mutant types, but its sensitivity was as high as 0.01%. It is concluded that considering the characteristics of each method as well as the clinical evaluation results, HRM may be used for screening of *NPM1* mutations at diagnosis, while the AS-PCR can be used for the MRD quantification during follow-up.

Key words acute myeloid leukemia; *NPM1* gene; capillary electrophoresis; high resolution melting curve; allele-specific PCR

J Exp Hematol 2011; 19(4): 999 - 1004

急性髓系细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一类临床特征和基因异常呈高度异质性的疾病^[1]。目前在 AML 发现有多种基因突变,其中最典型的是 *NPM1* (nucleophosmin) 基因突变。*NPM1* 突变不仅发生频率高(约 35%),且预后意义较明确, *NPM1* 突变的病人比野生型病人具有较高的完全缓解率,对化疗更为敏感^[2,3]。此外, *NPM1* 突变在病程进展过程中比较稳定^[4,5], 可以作为一种合适的标记物对病人的微小残留病(minimal residual disease, MRD)进行监控^[6]。

目前发现的 *NPM1* 基因突变至少有 55 种类型, 几乎全是外显子 12 的插入突变, 使突变型比野生型

多了 4 个碱基^[7]。常见的是 A、B 和 D 型突变, 约分别占 *NPM1* 突变的 80%、10% 和 5%^[2,8]。检测 *NPM1* 突变的经典方法是毛细管电泳法(CE)、测序法和 DPHLC 法等^[9,10], 但这些方法均需要对 PCR 产物进行后处理, 存在操作、繁琐、耗时、灵敏度低、易造成模板污染和假阳性的缺点。本研究建立了 2 种基于实时 PCR 的检测方法, 并与 CE 和测序法进行了对比, 最终确定了一种适合临床应用的 *NPM1*

通讯作者: 李庆阁, 教授, 博士生导师。电话: (0592) 2187363。E-mail: qgli@xmu.edu.cn; 鹿全意, 主任医师, 教授。电话: (0592) 2292032。E-mail: quanyilu@hotmail.com
2011-7-11 收稿; 2011-7-20 接受

突变检测方案。

材料和方法

病例和细胞系

共收集 89 份 AML 标本,其中 56 份为 2008 年 7 月 -2010 年 1 月在厦门大学附属中山医院住院的病例,33 例由广州市第一人民医院王汉平医生所提供。全部病例经过骨髓形态学和免疫分型分析,符合急性髓性白血病诊断标准。正常对照包括 10 份健康人外周血和 HL-60 细胞购自美国 ATCC。

基因组 DNA (gDNA) 提取

取患者骨髓或外周血,根据 TIANamp Genomic DNA Kit (北京天根生化科技有限公司产品)说明书进行提取。用 ND-4000 紫外分光光度计(美国 Nanodrop 公司产品)进行浓度测定,并将终浓度调为 10 ng/μl。

阳性质粒构建

以 HL-60 gDNA 为模板,通过 PCR 获得 5 种基因序列,包括 *NPM1* 基因(野生型、A 型、B 型、D 型)和 *ABL1* 基因,其中 3 种 *NPM1* 基因突变型序列通过引物重叠延伸法^[11]获得。将所获序列连接到 pMD18-T 载体(大连宝生物工程有限公司产品),并转化到大肠杆菌 DH5α 中,通过 PCR 筛选阳性克隆,送 Invitrogen 公司测序。为鉴定正确的克隆采用质粒提取试剂盒(美国 Omega 公司产品)提取质粒,利用 ND-4000 测定浓度。

毛细管电泳法

PCR 反应总体系为 25 μl,包括 0.2 mmol/L dNTPs, 1 × PCR buffer(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3; 50 mmol/L KCl; 1.5 mmol/L MgCl₂), 1 U TaqHS DNA 聚合酶(大连宝生物工程有限公司产品),每条引物(*NPM1-CE-F* & *NPM1-CE-R*,表 1)各 0.4 μmol/L, 5 μl gDNA(10 ng/μl)。在 T3 热循环仪(德国 Biometra 公司产品)上按以下程序运行:95℃ 3 分钟;95℃ 20 秒,61℃ 20 秒(每经一个循环下降 0.5℃),72℃ 20 秒,18 个循环;95℃ 20 秒,52℃ 20 秒,72℃ 20 秒,17 个循环;72℃ 7 分钟。

PCR 产物首先用去离子水稀释 100 - 400 倍,得到 A。用去离子甲酰胺(SLS)将荧光标记的分子量标准(美国 Beckman Coulter 公司)稀释 10 倍,得到 B。取 1 μl A, 2.5 μl B 与 16.5 μl SLS 混匀后,转移到 96 孔上样板中,在 CEQ 8800 遗传分析系统

Table 1. Sequence of primers and probes

Primer/Probe	Sequence (5' to 3')
<i>NPM1-CE-F</i>	Cy5- TTAACTCTCTGGT TAGAATGAA
<i>NPM1-CE-R</i>	GGTAGGAAAAGTTCTCACTCTGC
<i>NPM1-HRM-F</i>	CCACATTTCTTTTTTTTTTTTCCAGG
<i>NPM1-HRM-R</i>	CAACTGTTACAGAAATGAAATAAGACG
<i>NPM1-AS-F^a</i>	CCAGGCTATTCAAGATCTCTGT
<i>NPM1-AS-R</i>	GGTAGGAAAAGTTCTCACTCTGC
<i>ABL-AS-F</i>	AGAACGAAGCTGGTTTCCAAAG
<i>ABL-AS-R</i>	CTGTGACTGGCGTGATGTAG
<i>NPM-FAM-P(+)^b</i>	FAM-CTGTAACAGTTGATATCTGGCTGTCC-NH ₂
<i>NPM-FAM-P(+)</i>	CAGCCAGATATCAACTGTTACAG -Dabey1
<i>ABL-HEX-P(-)^b</i>	HEX-CATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCA-PO4
<i>ABL-HEX-P(-)</i>	TGTGAAGCCCAAACCAAAAATG-Dabey1

^a: The mismatched base pair of AS-PCR primer is indicated in bold; ^b: The (+) chain of each displacing probe is phosphorothioate modified on its first base.

(美国 Beckman Coulter 公司)上采用“Frag-2”程序进行毛细管电泳。根据仪器自带软件进行“Fragment Analysis”。对于突变阳性标本,根据软件给出的野生型峰面积 S1 和突变型峰面积 S2,按照以下公式来计算突变比例:

$$\text{Mutant level (\%)} = S2 / (S1 + S2) \times 100\%$$

测序法

直接测序法 将 PCR 产物通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离,切下目的条带并回收后,用下游引物(*NPM1-CE-R*)测序。

克隆测序法 将 PCR 产物回收后连接到 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌 DH5α 感受态,挑选至少 4 个菌液 PCR 为阳性的单克隆送 Invitrogen 公司测序。

HRM 法

PCR 反应总体系为 25 μl,包括 0.2 mmol/L dNTPs, 1 × PCR buffer(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3; 50 mmol/L KCl; 5% 甘油), 0.5 U TaqHS, 每条引物(*NPM1-HRM-F* & *NPM1-HRM-R*,表 1)各 0.4 μmol/L, 2.5 mmol/L MgCl₂, 1.5 μmol/L SYTO 9.0 荧光染料(美国 Invitrogen 公司产品), 5 μl gDNA(10 ng/μl)。

实时 PCR 扩增和熔解曲线分析均在 Rotor-Gene™ 6000(Corbett Research, 澳大利亚)上进行。经过优化后,最终的扩增条件为:95℃ 预变性 3 分钟;95℃ 变性 20 秒,55℃ 退火 20 秒,72℃ 延伸 12 秒,40 个循环;72℃ 延伸 7 分钟。每个循环退火阶段收集荧光信号。扩增结束后进行 HRM 分析,经优化后程序为:95℃ 变性 30 秒,55℃ 退火 2 分钟,升

温速率 0.3℃/步 在 70℃ - 90℃ 温度范围内收集荧光信号。每次 PCR 实验均设置 1 个正常对照, 1 个 NTC, 每个标本均设置两个平行管。

AS-PCR 法

经优化, 双重实时 PCR 体系为: 0.2 mmol/L dNTPs, 1 × PCR buffer [67 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 16.6 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 6.7 μmol/L EDTA, 0.085 mg/ml BSA], 1.5 U TaqHS, 每条引物 (NPM1-AS-F & NPM1-AS-R, ABL-AS-F & ABL-AS-R 表 1) 各 0.4 μmol/L, 5 mmol/L MgCl₂, 0.1 μmol/L 双链探针^[12] (*ABL1* 和 *NPM1*) 5 μl gDNA 或质粒, 用水补足至 25 μl。反应在 CFX96 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-RAD 公司产品) 上进行, 经过优化后的程序为: 95℃ 预变性 3 分钟; 95℃ 变性 20 秒, 65 - 61℃ 退火 20 秒 (每经一个循环降低 1℃), 72℃ 延伸 10 秒, 5 个循环; 95℃ 预变性 20 秒, 60℃ 变性 20 秒, 72℃ 退火 10 秒, 50 个循环。在最后 50 个循环的退火阶段采集 FAM 和 HEX 通道的荧光信号。

结 果

CE 法

首先建立 CE 法作为对照方法。所用上游引物标记为 Cy5, 以便 PCR 产物可以被 CEQ8800 的激光所检测。以 HL-60 细胞 gDNA 为模板进行扩增, CE 法的检测结果如图 1A 所示, 在 276 nt 处的蓝色峰为野生型 *NPM1* 基因的扩增产物。对 89 份 AML 标本的检测结果显示, 有 72 份标本都只有一个位于 276 nt 处的野生型峰, 属于 *NPM1* 突变阴性标本。另外 17 份标本除了野生型峰, 还有一个比野生型大 4 bp 的峰, 即为突变型峰。典型结果如图 1B 所示, 根据软件分析出的野生型和突变型峰面积算得该标本突变比例为 46%。

测序法

NPM1 突变均为 4 个碱基的插入突变, 因此如果对突变病人的 PCR 产物直接测序, 将在突变的插入位置开始出现双峰, 但通过人工阅读仍可识别出突变的类型。PCR 产物测序结果表明, 17 份阳性标本中, A 型突变有 15 份, B 型和 Nm 型突变各 1 份。为了获得直观的突变序列, 我们对几份典型标本的 PCR 产物进行单克隆测序, 挑选的单克隆仅含有一种序列 (野生型或突变型), 因此均为单峰、易于判读。典型的单克隆测序结果如图 2 所示。

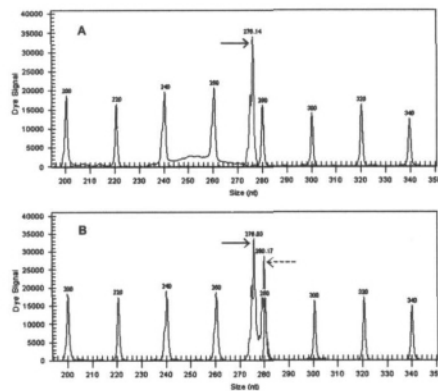


Figure 1. Capillary electropherograms of a wild-type sample (A) and an *NPM1* mutation positive sample (B). The peaks for amplicon of *NPM1* gene are indicated with solid arrow (wild type) and dashed arrow (mutant), respectively. The other peaks correspond to the size standards.

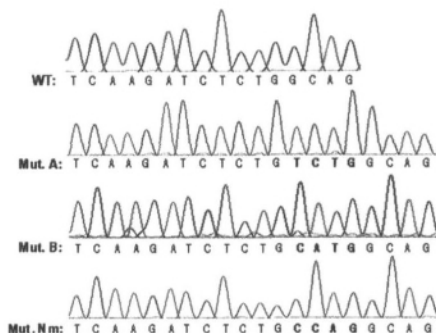


Figure 2. Sequencing analysis of different clones harboring wild-type and mutant (A-, B-, and Nm-type) *NPM1* gene respectively. The inserted base pairs are indicated in bold.

HRM 法

HRM 引物设计原则如下: ①目前报道的 55 种 *NPM1* 突变集中在外显子 12 的一个很小的区域内。因此将引物设计在突变区域两端, 以确保检出各种突变; ②控制 PCR 产物的大小 (不超过 400 bp, 以 200 bp 以内为佳), 以提高突变型与野生型熔点差异的分辨率; ③若有引物二聚体, 其熔点与 PCR 产物熔点不能太接近。为了达到上述目标, 设计了多对引物进行了筛选。

用 HL-60 野生型细胞以及测序验证过的 2 份标本 (阴性、A 型突变各 1 份) 考察 HRM 体系的分辨效果。图 3 所示为典型的 HRM 检测结果图, 顶峰所对应的温度即为 PCR 产物的熔点 (T_m)。可以看到, 阴性标本只有一个熔点峰, 且与野生型对照一致。A 型突变的标本表现为双峰, 与野生型区分明显。在这类标本中, PCR 产物包括野生型产物和 A

型突变产物。在进行 HRM 分析时, PCR 产物先经过高温变性形成单链, 然后回到低温形成二聚体, 最后再进行熔解曲线分析。形成的二聚体包括 2 种同源二聚体(2 条链完全互补, wt/wt' 或 mut/mut') 和 2 种异源二聚体(2 条链存在错配, wt/mut' 或 wt'/mut)。异源二聚体内部存在不匹配, 结合力较弱, 因此熔点较低, 且 2 种异源二聚体熔点接近。因此, 在图 3 中熔点较低的峰对应于 2 种异源二聚体的融合峰, 而熔点较高的峰对应于 2 种同源二聚体的融合峰。

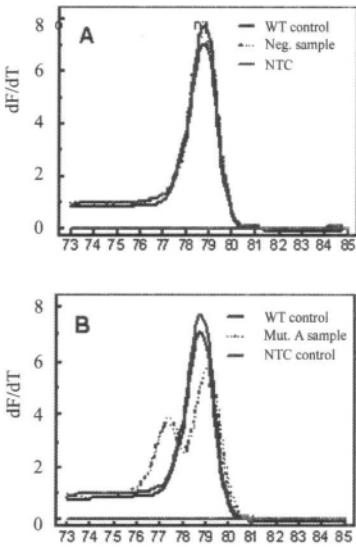


Figure 3. Typical melting curves of clinical samples in the HRM assay. A: a *NPM1* mutation negative sample. B: a *NPM1* A-type mutation positive sample. HL-60 cell gDNA was parallelly detected as wild-type (WT) control while waster as no template control (NTC).

当阳性标本的突变比例太低时, 可能导致异源二聚体太少而无法识别突变。因此对 HRM 的灵敏度进行了考察。随着突变比例的下降, 异源二聚体的熔点峰越来越低。当突变比例为 5% 时仍显示出明显的双峰, 进一步下降到 1% 时已经无法识别异源二聚体的峰, 此时的峰图与野生型图谱无法区分。可见 HRM 法的检测灵敏度约为 5% (图 4)。

最后, 利用 89 份标本对 HRM 法进行临床验证, 检测结果与毛细管电泳、测序均一致。

AS-PCR 法

为了获得高度特异的 AS-PCR 引物的检测, 针对 *NPM1* 基因最常见的 A 型突变设计了多对引物进行筛选, 并通过引入错配碱基提高特异性, 最终确定的引物对可以很好的扩增一个 A 型突变阳性标本的 gDNA, 而 10 份正常人 gDNA 模板均不会产生非

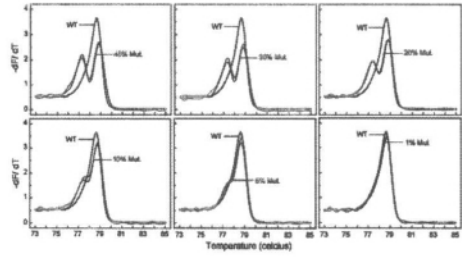


Figure 4. Analytical sensitivity of the HRM assay. Simulated positive samples with six mutant levels, including 46%, 30%, 20%, 10%, 5%, and 1%, were acquired by serial diluting the gDNA of a *NPM1* A-type mutation positive sample (46%, CE result) with HL-60 gDNA. WT, wild type; Mut., mutant.

特异信号。当用质粒进行考察时发现, 该引物对不仅可扩增 A 型质粒, 也可扩增 B 型、D 型质粒, 因此可检测大约 95% 的 *NPM1* 突变类型。

为了避免模板质量差导致的假阴性, 引入了内控基因 *ABL1*, 并将 *NPM1* 基因和 *ABL1* 基因放在同一管, 建立了双重实时 PCR 体系。对双重 ARMS 体系进行反复优化, 包括引物比例、 Mg^{2+} 浓度、*TaqHS* 用量、实时 PCR 程序等。经过优化, *NPM1* A 型突变质粒和 *ABL1* 质粒的灵敏度均可达到 10 个拷贝, B 型和 D 型突变的灵敏度为 100 拷贝。当用突变阳性标本考察灵敏度时, 结果显示双重 AS-PCR 体系的灵敏度高达 0.01% (图 5), 因此本方法适合用于 *NPM1* 突变阳性病人的 MRD 定量。

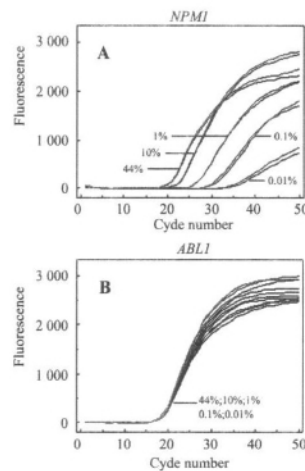


Figure 5. Analytical sensitivity of the duplex AS-PCR assay. A and B show the amplification plots of *NPM1* and *ABL1* gene respectively. Simulated positive samples with five mutant levels, including 44%, 10%, 1%, 0.1%, 0.01%, were acquired by serial diluting the gDNA of a *NPM1* A-type mutation positive sample (44%, CE result) with HL-60 gDNA. The total gDNA contents were the same (50 ng).

利用 89 份 AML 标本对双重 AS-PCR 体系进行了临床验证, 典型结果如图 6 所示。有 73 份标本只有 *ABL1* 基因的 HEX 信号升起, 属于 *NPM1* 突变阴性的标本, 另外 16 份标本则同时有 2 种荧光信号升起, 包括 *ABL1* 的 HEX 信号和 *NPM1* 的 FAM 信号, 属于 *NPM1* 突变阳性标本。与其它 3 种方法相比, Nm 型突变阳性的标本被漏检。

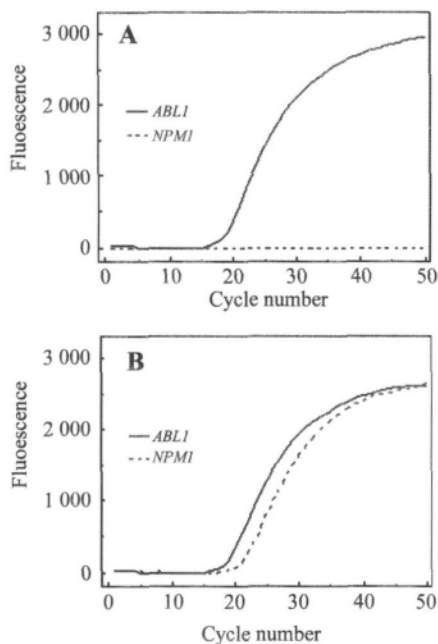


Figure 6. Typical amplification plots of clinical samples in the duplex AS-PCR assay. A: a *NPM1* mutation negative sample. B: a *NPM1* A-type mutation positive sample.

讨 论

本研究针对急性髓性细胞白血病中最常见的 *NPM1* 基因突变建立了 4 种不同的检测方法, 包括 CE 法、测序法、HRM 法和 AS-PCR 法。CE 法可以有效区分 *NPM1* 基因野生型和突变型 PCR 产物之间 4 个

碱基的大小差异, 其优点是直观、准确、可检测已知和未知突变、可对突变比例定量。测序法是所有检测方法的金标准。然而 2 种方法都有灵敏度低、操作繁琐、易污染的优点。

HRM 法是近几年来发展起来的突变筛查技术, 通过产物的熔点差异进行区分^[13,14]。一条特定的熔解曲线就代表一个特定的 DNA 序列, 只要有一个碱基变化, 曲线表现就会有所不同, 因此具有很高的分辨率。在本研究中建立的 HRM 检测体系以 gDNA 为模板, 将上游引物设计在内含子 11 上, 可以避免 7 种 *NPM1* 假基因的影响^[15]。通过引物筛选和体系优化, 最终确立的 HRM 体系可以有效地对野生型和突变型 DNA 标本进行区分, 灵敏度达到 5%。HRM 法检测 89 份标本的结果与 CE 法完全一致, 操作简单快速、价格便宜、灵敏度更高、而且闭管式操作大大降低了模板污染和假阳性的可能性, 因此更适合于临床应用。

AS-PCR 法的特异性最高^[16,17]。以上 3 种方法均同时扩增野生型和突变型模板。通过引入错配碱基、引物筛选和体系优化, 最终确定的 AS-PCR 引物不对野生型 *NPM1* 基因无扩增作用, 具有高度的特异性, 此对于准确的定量也非常重要。为了提高检测的方便性, 在本研究中将 *NPM1* 基因和 *ABL1* 基因放在同一管中并同时扩增, 建立了双重实时 PCR 体系。该体系可以扩增 A 型、B 型和 D 型 *NPM1* 突变模板, 因此可检测大约 95% 的 *NPM1* 突变, 虽然略有些漏检(比如 Nm 型), 但该体系的灵敏度高达 0.01%, 因此更适合用于定量分析和对 MRD 的监控。与之前报道的 AS-PCR 法^[6,18]相比, 本研究中的方法操作也更为简便、检测的突变类型也更广泛。

按照临床标本的检测能力和 4 种检测方法各有的特点, 我们认为, HRM 法可用于对 *NPM1* 突变筛查, 而 AS-PCR 法可用于对后续的 MRD 进行定量。

Table 2. Comparison of the performance of the four methods

Method	Mutation coverage	Sensitivity	MRD quantification	Time required ^a	Cost	Risk of pollution
CE	All	10% - 20%	No	about 4 hours	High	High
Sequencing	All	20% - 30%	No	about 8 hours	Low	High
HRM	All	5%	No	about 2 hours	Low	Low
AS-PCR	95%	0.01%	Yes	about 2 hours	Low	Low

^a: Time required includes the duration of PCR reaction as well as post-PCR analysis.

参 考 文 献

- 1 Lowenberg B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2008; 1 - 11
- 2 Falini B , Mecucci C , Tiacci E , *et al.* Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* ,2005; 352(3) :254 - 266
- 3 Cilloni D , Messa F , Rosso V , *et al.* Increase sensitivity to chemotherapeutical agents and cytoplasmatic interaction between NPM leukemic mutant and NF-kappaB in AML carrying NPM1 mutations. *Leukemia* ,2008; 22(6) :1234 - 1240
- 4 Chou WC ,Tang JL ,Lin Li ,*et al.* Nucleophosmin mutations in *de novo* acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Cancer Res* ,2006; 66(6) : 3310 - 3316
- 5 Palmisano M ,Grafone T ,Ottaviani E ,*et al.* NPM1 mutations are more stable than FLT3 mutations during the course of disease in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* , 2007; 92 (9) : 1268 - 1269
- 6 Gorello P ,Cazzaniga G ,Alberti F ,*et al.* Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia* , 2006; 20 (6) : 1103 - 1108
- 7 Rau R ,Brown P. Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity. *Hematol Oncol* ,2009; 27(4) : 171 - 181
- 8 Thiede C , Koch S , Creutzig E , *et al.* Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML) . *Blood* ,2006; 107(10) :4011 - 4020
- 9 Boissel N , Renneville A , Biggio V , *et al.* Prevalence , clinical profile , and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood* ,2005; 106(10) : 3618 - 3620
- 10 Roti G , Rosati R , Bonasso R , *et al.* Denaturing high-performance liquid chromatography: a valid approach for identifying NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *J Mol Diagn* , 2006; 8(2) : 254 - 259
- 11 Heckman KL , Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* ,2007; 2(4) :924 - 932
- 12 Li Q , Luan G , Guo Q , *et al.* A new class of homogeneous nucleic acid probes based on specific displacement hybridization. *Nucleic Acids Res* ,2002; 30(2) : E5
- 13 Wittwer CT , Reed GH , Gundry CN , *et al.* High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* ,2003; 49(6 Pt 1) : 853 - 860
- 14 Gundry CN , Vandersteen JG , Reed GH , *et al.* Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem* ,2003; 49(3) :396 - 406
- 15 Liu QR , Chan PK. Characterization of seven processed pseudogenes of nucleophosmin/B23 in the human genome. *DNA Cell Biol* ,1993; 12(2) :149 - 156
- 16 Ruano G , Kidd KK. Direct haplotyping of chromosomal segments from multiple heterozygotes *via* allele-specific PCR amplification. *Nucleic Acids Res* ,1989;17(20) :8392
- 17 Newton CR , Graham A , Heptinstall LE , *et al.* Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) . *Nucleic Acids Res* , 1989; 17(7) :2503 - 2516
- 18 Ottone T , Ammatuna E , Lavorgna S , *et al.* An allele-specific rt-PCR assay to detect type A mutation of the nucleophosmin-1 gene in acute myeloid leukemia. *J Mol Diagn* ,2008; 10(3) : 212 - 216