

## VYSOKO-ROZLIŠOVACIA ANALÝZA KRIVIEK TOPENIA (HRM ANALÝZA) – NOVÁ TECHNIKA V BIOMEDICÍNSKOM VÝSKUME

**Dr.h.c., prof., Ing. Jozef Živčák, PhD.**

Katedra biomedicínskeho inžinierstva a merania

KBlaM, TUKE

Letná 9, 042 00 Košice

e-mail: [jozef.zivcak@tuke.sk](mailto:jozef.zivcak@tuke.sk)

**RNDr. Marianna Trebuňová, PhD.**

Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, LF UPJŠ

Trieda SNP č. 1, 040 01 Košice

e-mail: [marianna.treburnova@upjs.sk](mailto:marianna.treburnova@upjs.sk)

**RNDr. Galina Laputková, PhD.**

Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, LF UPJŠ

Trieda SNP č. 1, 040 01 Košice

e-mail: [galina.laputkova@upjs.sk](mailto:galina.laputkova@upjs.sk)

### Abstract

High Resolution Melt (HRM) analysis is a novel, homogeneous, close-tube, post-PCR method, allowing molecular biologists and genomic researchers to analyze genetic variations (SNP, mutations, methylations) in PCR amplicons. HRM gives characteristics of nucleic acid based on their disassociation (melting) behavior. Due to the ease of use, simplicity, flexibility, low cost, nondestructive nature, superb sensitivity, and specificity, HRM analysis is quickly becoming the tool of choice to screen patients for pathogenic variants.

**Key words:** HRM analysis, melting temperature, intercalators, SYBR green

### ÚVOD

Vysoko-rozlišovacia analýza kriviek topenia je nová metóda zavedená v roku 2003. Vznikla pri spolupráci medzi Wittwer Laboratory for DNA Analysis a University of Utah and Idaho Technology, Inc. [1].

Topenie dvojláknovej DNA sa dalo sledovať stanovením absorbancie pomocou UV spektrofotometra už v 60-tych rokoch 20-teho storočia [2]. Táto analýza však si vyžadovala až niekoľko desiatok mikrogramov DNA, trvala niekoľko hodín a vzorka DNA sa pritom pomaly zahrievali v intervale od 0,1 do 1,0 °C/min [1]. Súčasná analýza topenia využíva prístroje založené na meraní fluorescencie [3], čo predstavuje citlivejší spôsob. Množstvo DNA potrebné na analýzu predstavuje iba niekoľko desiatok nanogramov PCR produktu. Fluorescenčná analýza topenia DNA sa stáva populárnou od roku 1997, keď bol vyvinutý nový typ termocykléra: Real-Time PCR Light Cycler. Využíva malé objemy vzoriek, poskytuje lepšiu kontrolu teploty, topenie

prebieha rýchlejšie pri 0,1 – 1,0 °C/s, tým sa skraca čas samotnej analýzy na niekoľko minút [1].

Vysoko-rozlišovacia analýza kriviek topenia je jednoduché riešenie pre sledovanie mutácií v štruktúre DNA a porovnávanie sekvencií. profil tavenia produktu PCR (Polymerase Chain Reaction – biochemická technológia v molekulevej biológii, pri ktorej vzniká niekoľko tisíc až miliónov kópií určitých úsekov DNA) závisí od prítomnosti nukleotidov GC (Guanín, Cytosín), dĺžky skúmaného úseku, sekvenčného usporiadania a komplementarity. Zmeny v štruktúre DNA je možné sledovať pomocou saturačných farbív, ktoré fluoreskujú v prítomnosti dvojláknovej DNA. Štruktúru DNA, pri väčšine variantov, je možné stanoviť z teploty tavenia produktov PCR. Skenovanie mutácií a zodpovedajúce sekvencie závisia od sekvenčných rozdielov v heteroduplexe (útvor vzniknutý spojením dvoch jednoreťazcových vlákien DNA, ktoré pochádzajú pôvodne z dvoch odlišných molekúl). Vysoko-rozlišovacia analýza kriviek topenia má oproti iným metódam niekoľko výhod. Vďaka svojej jednoduchosti a rýchlosti je vhodná pre výskumné laboratória ako rýchla a lacná metóda na predpovedanie terapeutickéj odpovede [3].

### Analýza kriviek topenia

Analýza kriviek topenia spočíva v stanovení disociačných vlastností dvojláknovej DNA počas zahrievania. So zvyšujúcou sa teplotou začína dvojitá vlákna disociovať, čo vedie k nárastu absorbancie - hyperchromicite.

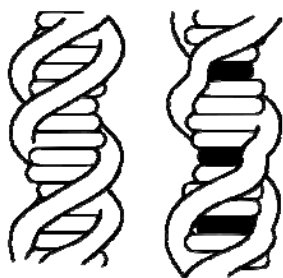
Zhromaždené informácie môžu indikovať prítomnosť a identitu single-nukleotidových polymorfizmov (SNP). Kým GC párovania sú prítomné tri vodíkové väzby, pri AT (Adenín, Tymín) párovani sú potrebné iba dve väzby. DNA s vyšším obsahom GC, či už z dôvodu jeho zdroja alebo, ako už bolo uvedené, v dôsledku SNP, bude mať vyššiu teplotu topenia ako DNA s vyšším obsahom AT [3].

Analýza kriviek topenia poskytuje tiež dôležité informácie týkajúce sa interakcie DNA s molekulami. Molekuly známe ako interkalátory (napr. farbivo viažuce sa na DNA) sa môžu nachádzať medzi párami báz DNA a komunikovať prostredníctvom „pi stacking-u“ (nekovalentné interakcie). To má pozitívny vplyv na stabilitu štruktúry DNA, čo vedie k zvýšeniu jej teploty topenia (rovnako ako aj zvýšená koncentrácia soli). Naopak, negatívny vplyv na stabilitu DNA môže mať pH, čo môže viesť k zníženiu jej teploty topenia [2].

## Realizácia

Energia potrebná k prerušeniu interakcie báza-báza - vodíkových väzieb medzi dvoma reťazcami DNA - závisí od ich dĺžky, GC obsahu a ich komplementarity. Zahrievaním reakčnej zmesi, ktorá obsahuje sekvencie dvojvláknovej DNA a meraním disociácie oproti teplote, môžu byť tieto atribúty odvodené [3].

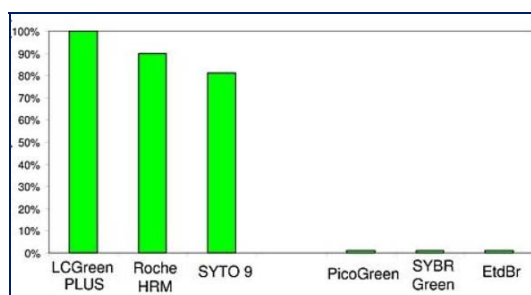
Disociáciu dvoch DNA reťazcov v závislosti od teploty je možné stanoviť s pomocou interkalačných farbív (viď obr. 1). Medzi najviac používané interkalačné farbivá patria SYBR green (používaný od r. 1997 [1]), EvaGreen, Etidium bromid (EtdBr), PicoGreen alebo farbivom značené DNA sondy (ide o fragment DNA s dĺžkou niekoľko 100-1000 báz s určitým sekvenčným poradím nukleotidov, ktorý je používaný v DNA vzorkách na detekciu sekvenčného poradia nukleotidov DNA, pričom sa uplatňuje princíp komplementarity). Disociácia DNA počas zahrievania s použitím interkalačných farbív je sprevádzaná znížením fluorescencie vzorky [3].



Obr. 1. Interkalácia indukujúca štruktúrnu deformáciu. Vľavo: DNA s normálnym reťazcom. Vpravo: reťazec DNA s interkalačným farbivom na troch miestach (čierne oblasti). Zdroj [4]

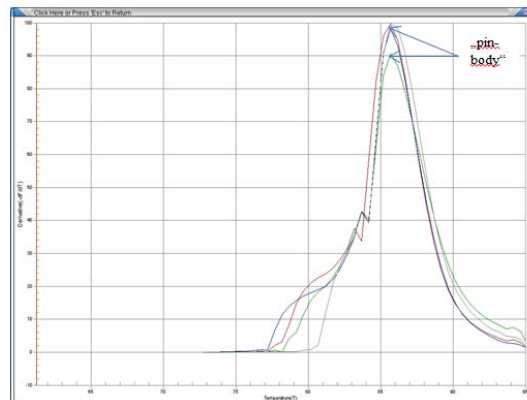
Prípadne sa na stanovenie sekvenčného poradia nukleotidov DNA používa juxtapozicionovaná sonda (farbivo a „zhásač“ intenzity fluorescencie sú tesne vedľa seba).

V súčasnosti sú na trhu dostupné farbivá ako LCGreen I a LCGreen Plus, farbivo od firmy ROCHE a SYTO 9, ktoré sa javia ako najcitlivejšie (viď obr. 2) [5].



Obr. 2. Porovnanie citlivosti rôznych interkalačných farbív. Zdroj [5].

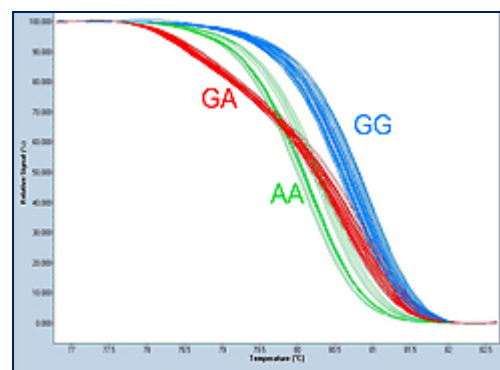
Z grafu reprezentujúceho prvú negatívnu deriváciu krivky topenia môžeme ľahšie určiť teplotný „pin-bod“ (50% molekúl je disociovaných) na základe takto vzniknutých píkov (viď obr. 3) [3].



Obr. 3. Graf reprezentujúci prvú negatívnu deriváciu krivky topenia a „pin body“. Os x: teplota T, y: derivácia  $-dF/dT$ , F-fluorescencia. Prístroj: Line-Gene K, Bioer Technology

## Aplikácia

Koncom 90-tych rokov sa analýza produktov s pomocou SYBR green a ďalších špecifických fluoreskujúcich farbív alebo sond založených na báze kriviek topenia stala takmer všadeprítomná. Využívanie týchto sond je rozšírené pri detekcii jedno-nukleotidových polymorfizmov (SNP), pričom na základe vzorových kriviek topenia vzniknutých disociáciou produktu môžeme rozlíšiť vzorky: homozygot - divoký typ, heterozygot alebo homozygot - mutantný typ (viď obr. 4) [4].



Obr. 4. Vzorové krivky topenia pre rozlíšenie SNP. Zdroj [6].

V súčasnosti vďaka novým prístrojom s vysokým rozlíšením a s využitím fluoreskujúcich farbív je možné vykonať rýchlu a relatívne lacnú analýzu skúmaných amplicónov (úseky DNA

ohraničené presne stanovenými primermi (nevyhnutná časť DNA potrebná k replikácii DNA)). Odporúčané dostupné prístroje na trhu vhodné na túto analýzu sú: Applied Biosystems 7500 Fast System a 7900HT Fast Real-Time PCR System, Idaho Technology's LightScanner (prvý platničkový prístroj), Qiagen's Rotor-Gene a Roche's LightCycler 480. Na trhu sú ponúkané aj prístroje ďalších značiek ako napr. Line-Gene K Fluorescence Quantitative PCR Detection System od Bioer Technology [3].

## ZÁVER

Vysoko-rozlišovacia analýza kriviek topenia detekuje malé rozdiely v sekvencii PCR fragmentov len na základe priameho tavenie. Krivky topenia možno použiť pre skenovanie mutácií, sekvenčné priradovanie a muti-plex genotypizácie – sú to analýzy, ktoré predtým vyžadovali spracovanie produktov PCR elektroforézou alebo iné nehomogénne prostriedky. Kvôli tomu, a aj vďaka jej rýchlosti a jednoduchosť, popularita tejto metódy stále rastie.

V literatúre existuje veľa výskumných a klinických príkladov [7], ktoré poukazujú na využitie vysoko-rozlišovacej analýzy kriviek topenia. Keďže táto metóda je relatívne „mladá“ stále sa odstraňujú jej nedostatky a zároveň sa poukazuje na nové možnosti jej využitia.

## Literatúra

- [1] [https://dna.utah.edu/Hi-Res/TOP\\_Hi-Res%20Melting.html](https://dna.utah.edu/Hi-Res/TOP_Hi-Res%20Melting.html)
- [2] Ansevin, A.T., Vizard, D.L., Brown, B.W., McConathy, J.: High-resolution thermal denaturation of DNA. I. Theoretical and practical considerations for the resolution of thermal subtransitions, *Biopolymers*. 1976, vol. 15, no. 1, p. 153–74.
- [3] Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T.: Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1997, vol. 245, no. 2, p. 154–160.
- [4] [http://en.wikipedia.org/wiki/File:DNA\\_intercalation.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:DNA_intercalation.svg)
- [5] [https://dna.utah.edu/Hi-Res/2\\_Hi-Res\\_Dyes.html](https://dna.utah.edu/Hi-Res/2_Hi-Res_Dyes.html)
- [6] [https://de.vwr.com/app/Header?tmpl=/life\\_sciences/quanta\\_accumelt\\_hrm.htm](https://de.vwr.com/app/Header?tmpl=/life_sciences/quanta_accumelt_hrm.htm)
- [7] Lay, M.J., Wittwer, C.T.: Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem.*, 1997 vol. 43, no. 12, p. 2262-7.

## Podakovanie

Práca vznikla za podpory projektu VEGA 1/0515/13 (25%) a projektov zo štrukturálnych fondov EU: ITMS: 26220220163 (25%), ITMS: 26220 220143 (25%), ITMS: 26220120058 (25%).