

УДК 576.315.42

## СКАНИРОВАНИЕ МУТАЦИЙ В КОРОТКИХ АМПЛИКОНАХ: ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПЛАВЛЕНИЯ ДНК

© 2012 г. И. В. Ботезату<sup>1</sup>, К. И. Жордания<sup>1</sup>, А. И. Карселадзе<sup>1</sup>, А. М. Строганова<sup>1</sup>,  
В. Н. Кондратова<sup>1</sup>, В. П. Шелепов<sup>1</sup>, М. В. Телков<sup>2</sup>, А. В. Лихтенштейн<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук,  
Москва, 115478

<sup>2</sup> ООО “БИО-РАД Лаборатории”, Москва, 117105

Поступила в редакцию 23.10.2011 г.

Принята к печати 21.11.2011 г.

Анализ кривых плавления ДНК в режиме высокого разрешения (high resolution melting analysis, HRMA) – новый высокоэффективный метод генотипирования и сканирования мутаций. HRMA проводят непосредственно после ПЦР, в так называемом “закрытом” формате (“closed tube” format), что обеспечивает высокую производительность метода. “Закрытый” формат делает, однако, HRMA “заложником” условий ПЦР и тем самым ограничивает его возможности. Разработанный нами ранее “открытый” формат (постамплификационное укорочение ампликона и оптимизированный состав ионной среды) применен для сканирования мутаций онкогена *K-RAS* в опухолевой ткани (биоптатах и формализированных, заключенных в парафиновые блоки образцах). Показано, что “открытый” формат плавления существенно повышает чувствительность обнаружения мутантных аллелей при использовании приборов разного уровня – как оборудованных, так и не оборудованных модулем HRMA. Более высокая чувствительность метода плавления ДНК по сравнению с секвенированием по Сэнгеру позволяет снизить число ложноотрицательных результатов мутационного тестирования, что имеет большое значение при некоторых формах онкологических заболеваний.

**Ключевые слова:** плавление ДНК, мутации, *K-RAS*, ПЦР, рак, HRMA.

MUTATION SCANNING OF SHORT AMPLICONS: OPTIMIZATION OF DNA MELTING CONDITIONS, by I. V. Botezatu<sup>1</sup>, K. I. Zhordania<sup>1</sup>, A. I. Karseladze<sup>1</sup>, A. M. Stroganova<sup>1</sup>, V. N. Kondratova<sup>1</sup>, V. P. Shelepov<sup>1</sup>, M. V. Telkov<sup>2</sup>, A. V. Lichtenstein<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup> Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia, \*e-mail: alicht@online.ru; <sup>2</sup> BIO-RAD Laboratories, Moscow, 117105 Russia). High resolution melting analysis (HRMA) using special “saturating” fluorescent dyes is a new and very effective approach to genotyping and mutation scanning. HRMA, which is carried out usually just after PCR without any intermediate manipulations (the “closed tube” format), is simple and high-throughput method excluding sample cross-contaminations. The “closed tube” format makes, however, HRMA dependent on PCR mixes and, as such, limits its capability. The “open tube” format (post-PCR amplicon shortening and optimization of the ionic medium) proposed by us earlier, although somewhat more laborious, significantly increases sensitivity of the method and makes it possible to scan mutations in the short amplicons using conventional SYBR Green I dye and a standard (not adapted specifically for HRMA) real-time PCR instrument. Detection of mutant *K-RAS* in DNA of clinical specimens (tumor tissues, formalin-fixed paraffin-embedded samples) reveals equal, at least, sensitivity of this method as compared with the HRMA and much higher as compared with Sanger sequencing. The problem of false-negative results in mutation scanning of *K-RAS*, which is highly important in some forms of cancer, is discussed.

**Keywords:** DNA melting, mutations, *K-RAS*, PCR, cancer, HRMA.

Принятые сокращения: HRMA (High Resolution Melting Analysis) – анализ плавления ДНК в режиме высокого разрешения; RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов; RFU (Relative Fluorescence Units) – относительные единицы флуоресценции;  $T_{пл}$  – температура плавления ДНК; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени.

\* Эл. почта: alicht@online.ru

Один из наиболее эффективных способов выявления генных полиморфизмов и мутаций — это анализ плавления ДНК в режиме высокого разрешения (HRMA), т.е. физический метод плавления ампликонов, полученных в ходе ПЦР [1, 2]. Этот метод основан на зависимости температуры плавления ( $T_{пл}$ ) двойной спирали ДНК от ее длины, нуклеотидного состава (содержания GC-пар), нуклеотидной последовательности и степени комплементарности нитей [3]. Благодаря появлению в последние годы “насыщающих” флуоресцентных красителей ДНК, не ингибирующих ПЦР даже в высоких концентрациях, а также приборов ПЦР с модулем плавления ДНК высокого разрешения и соответствующим программным обеспечением, оказалось возможным идентифицировать вариации нуклеотидного состава: как единичный полиморфизм (SNP), так и мутации — в протяженных (до 1000 п.н.) последовательностях ДНК [1, 4–7].

Одним из важных направлений применения HRMA стало выявление мутаций в “горячих” участках генома (mutation hot spots) — коротких последовательностях ДНК, где функционально значимые мутации встречаются особенно часто. Ампликоны тестируют в этих случаях обычно посредством меченых и немеченых зондов, праймеров типа “скорпион” (snapback primers) и флуоресцентных красителей [1, 2, 7–12]. Последние применяются наиболее часто, благодаря относительно низкой цене и универсальности применения. О присутствии неспаренных оснований в гетеродуплексах ДНК и, следовательно, о наличии в них мутаций свидетельствуют характерные изменения кривых плавления. Их выявление требует применения высокотехнологичного оборудования и специализированного программного обеспечения. В результате оказывается возможным обнаружить небольшую долю (~5%) мутантных аллелей в избытке последовательностей дикого типа [2, 13].

К одному из главных достоинств HRMA следует отнести возможность выполнения процедуры в так называемом “закрытом формате” (“closed tube” format), что позволяет анализировать ампликоны непосредственно после ПЦР, не открывая реакционную пробирку и не производя дополнительных манипуляций. “Закрытый формат” обеспечивает высокую производительность метода и минимизирует возможность взаимных загрязнений анализируемых проб.

Преимущества HRMA и “закрытого формата” имеют, однако, и оборотную сторону. Во-первых, широкое применение этого метода ограничено высокой стоимостью соответствующего оборудования. Во-вторых, “закрытый формат” делает HRMA “заложником” условий предшествующей ПЦР. По этой причине HRMA, крайне чувстви-

тельный к солевому составу среды [14], почти всегда реализуется в условиях, не соответствующих оптимальным [2, 15]. Один и тот же ампликон нередко получают в разных реакционных средах, состав которых в коммерческих наборах зачастую неизвестен, что затрудняет стандартизацию получаемых профилей плавления. В-третьих, буферная среда ПЦР содержит Трис, pH которого заметно меняется с изменением температуры [16], а, следовательно, и в ходе плавления ДНК. Этот фактор, не всегда учитываемый, оказывает влияние на стабильность двойной спирали. Кроме того, снижение pH с 8–9 единиц (обычные значения буфера ПЦР при комнатной температуре) до слабокислой (6–7 единиц в момент денатурации) может вызывать в условиях повышенной температуры депуринизацию ДНК. В-четвертых, “закрытый формат” обуславливает плавление ДНК при потенциально активном синтезе ДНК, для которого имеется все необходимое (dNTPs, праймеры, матричная ДНК, ДНК-полимераза, соли). Синтез ДНК должен, по-видимому, препятствовать свободной рекомбинации комплементарных нитей и формированию гетеродуплексов, т.е. тех структур, на выявлении которых во многом основан данный метод. Возможно, именно этим обстоятельством объясняется факт более полного выявления гетеродуплексов при увеличении скорости реассоциации-денатурации ДНК [8].

Суммируя сказанное выше, можно прийти к заключению, что хотя HRMA в его общепринятой форме весьма эффективен при решении многих экспериментальных и клинических задач, для реализации всех его возможностей необходимо отказаться от “закрытого” формата. Предложенный нами ранее “открытый” формат (постамплификационное укорочение ампликона и оптимизация ионного состава среды) [17] позволяет за счет некоторого увеличения трудоемкости анализа повысить его чувствительность и сделать его доступным в более простой системе (имеются в виду стандартный, не оборудованный модулем HRMA, прибор ПЦР-РВ и широко используемый краситель SYBR Green I).

В данной работе этот способ применен для выявления мутаций *K-RAS* в клинических образцах (биоптатах опухолевой ткани и формализированных образцах, заключенных в парафиновые блоки) в сопоставлении с другими методами анализа: секвенирования и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (restriction fragments length polymorphism; RFLP). Мутации онкогена *K-RAS* (кодоны 12 и 13) часто обнаруживают во многих злокачественных новообразованиях [18]. Надежное выявление мутантных аллелей в опухолях ряда локализаций (рак толстой кишки, немелкоклеточный рак легкого) крайне важно, поскольку позволяет прогнозировать ход заболевания и выработать стратегию его лечения [13, 15, 19].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Образцы ДНК.** Кровь здоровых доноров и образцы опухолевой ткани (рак яичников, рак толстой кишки) получали в клинике Онкологического научного центра РАМН. ДНК выделяли из клеток крови и опухолевой ткани методом фенольно-хлороформенной депротеинизации, а из парафиновых блоков — с использованием коммерческого набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (“QIAGEN”) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Количество ДНК определяли спектрофотометрически (Nano-Drop 1000, “Thermo Scientific”) или флуориметрически на приборе Plate Reader Chameleon V multilabel counter (“Hidex Oy”; Turku, Finland).

**Выявление мутации *K-RAS* методом RFLP.** Для тестирования кодона 12 гена *K-RAS* непосредственно перед ним создали искусственный сайт рестрикции BstNI, который исчезает при замене первых двух нуклеотидов этого кодона. Рестриктаза BstNI расщепляет ампликон размером 87 п.н. на три фрагмента (42, 29 и 16 п.н.) в случае последовательности дикого типа, тогда как в мутантной — на два фрагмента (71 и 16 п.н.) [20–22].

**Секвенирование.** Ампликоны *K-RAS* секвенировали методом Сэнгера.

**Плавление ДНК.** Мутации в ампликоне *K-RAS* сканировали, варьируя условия ПЦР-РВ, режимы плавления (“закрытый” и “открытый” форматы), а также приборы (Bio-Rad CFX96 и Bio-Rad iQ5, соответственно оборудованный и не оборудованный модулем HRMA).

*а) HRMA — система “высокого” уровня (CFX96/“насыщающий” краситель EvaGreen/“закрытый” формат).* Фрагмент *K-RAS* размером 55 п.н., содержащий кодоны 12 и 13, амплифицировали посредством ПЦР-РВ в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (“Bio-Rad Laboratories”). В праймеры KRAS-55-f (5'-ataaacctgtggc-cggttggga) и KRAS-55-r (5'-biotin-tgtatcgtcaaggccctctt) вводили замены по позициям соответственно 13—14 (TA → CC) и 15 (A → C) — для создания двух искусственных сайтов рестрикции HaeIII (пояснения в тексте). ПЦР-РВ вели в 25 мкл реакционной смеси с EvaGreen (“Синтол”, Россия), содержащей 0.1 мкМ каждого из праймеров и 100 нг ДНК. Условия ПЦР: денатурация при 95°C 5 мин; 10 циклов при 95°C 10 с и 50°C 20 с; 30 циклов при 95°C 10 с и 58°C 20 с. По завершении амплификации ДНК прогревали при 95°C 3 мин, выдерживали при 40°C 3 мин, после чего подвергали плавлению в температурном режиме от 50 до 90°C (шаг 0.3°C, выдержка 12 с). Результаты анализировали с использованием Bio-Rad Precision Melt Analysis software (“Bio-Rad Laboratories”).

*б) Система “базового” уровня (iQ5/“обычный” краситель SYBR Green I/“открытый” формат) [17].* Фрагмент *K-RAS* размером 55 п.н. амплифици-

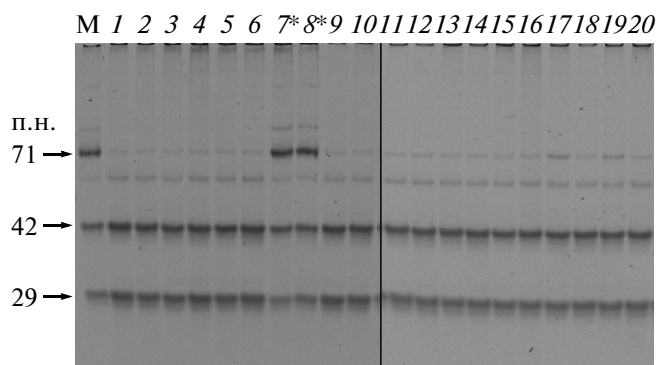
ровали посредством ПЦР-РВ на приборе iQ5 (“Bio-Rad Laboratories”) с красителем SYBR Green I (разведение 1 : 75000). Инкубационная среда (25 мкл) ПЦР включала 67 мМ Трис-НСl, рН 8.8, 16.6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.25% Tween-20, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.2 мМ dNTPs, 0.1 мкМ каждого из праймеров KRAS-55-f и KRAS-55-r (“Синтол”, Россия), 100 нг ДНК, 1 ед. *Taq* полимеразы. Условия ПЦР: денатурация при 95°C 5 мин, 10 циклов при 95°C 10 с и 50°C 20 с, 30–32 цикла при 95°C 10 с и 58°C 20 с. Постамплификационная процедура оптимизации условий плавления ДНК состояла из двух этапов: укорочение ампликона (инкубация с 1 ед. рестриктазы HaeIII 60 мин при 37°C) и разбавление пробы тремя объемами стандартного раствора (80 мМ Na-фосфат, рН 7, 4.5 мМ EDTA и SYBR Green I в разведении 1 : 16000). Ампликоны прогревали 3 мин при 95°C, выдерживали 3 мин при 40°C и плавили от 50°C до 90°C (шаг 0.5°C, выдержка 25 с). Данные, полученные посредством iQ5 Optical System software, экспортировали в Microsoft Excel и пики плавления (т.е. отрицательную производную кривой плавления) нормализовали по отношению к максимальному значению (принято за 100%).

Биотинилированный праймер KRAS-55-r дает возможность в случае необходимости провести дополнительную очистку ампликона от мешающих примесей (посредством его иммобилизации на магнитных гранулах Streptavidin-coupled magnetic Dynabeads (“Invitrogen Dynal AS”, Норвегия [17]) непосредственно перед этапом рестриктазной обработки.

*в) “Смешанная” система (CFX96/“насыщающий” краситель EvaGreen/“открытый” формат).* Фрагмент *K-RAS* размером 55 п.н. амплифицировали, как описано выше (пункт *а*), после чего проводили процедуру оптимизации условий плавления: ампликон укорачивали (инкубация с 1 ед. рестриктазы HaeIII 60 мин при 37°C) и пробу разбавляли равным объемом четырехкратного раствора EvaGreen (“Синтол”). Затем ДНК прогревали 3 мин при 95°C, выдерживали 3 мин при 40°C и плавили от 50 до 90°C (шаг 0.3°C, выдержка 12 с).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В предварительных опытах сканирования мутаций *K-RAS* в системе iQ5 — SYBR Green I мы пытались воспользоваться праймерами типа “скорпион” (snapback primers), формирующими в обеих нитях ампликона искусственные “шпильки” [11, 12]. Температура плавления этих шпилек различается в ампликонах дикого типа и мутантных (из-за присутствия в последних неспаренных оснований). Данный подход, весьма эффективный в условиях HRMA, в системе “низкого уровня” (т.е. в отсутствие соответствующего оборудо-



**Рис. 1.** Выявление мутаций кодона 12 онкогена *K-RAS* в 20 образцах ДНК рака яичников методом RFLP. Образцы 7 и 8 (отмечены звездочками) содержат мутантный онкоген, о чем свидетельствует присутствие фрагмента размером 71 п.н. Полосы слабой (фоновой) интенсивности появляются в результате неполного расщепления ампликонов рестриктазой *Bst*NI. М – маркер; цифрами по горизонтали обозначены номера образцов ДНК.

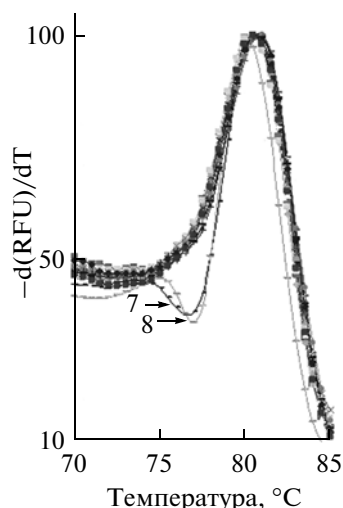
вания и программного обеспечения) не удовлетворял предъявляемым требованиям из-за высокого фона (в ходе асимметричной ПЦР возникает много неспецифических продуктов) [23].

Эта неудача побудила нас перейти к анализу гетеродуплексов, образующихся в циклах денатурации-реассоциации нормальных и мутантных ампликонов, и разработать “открытый” формат, способствующий наиболее эффективному выявлению гетеродуплексов [17]. При работе в “открытом” формате, во-первых, возможно максимально уменьшить размер анализируемых ампликонов, что повышает вероятность выявления мутации ( $T_{пл}$  ДНК снижается в среднем на 1.0–

1.5°C при снижении гомологии дуплекса на 1% [24]), и, во-вторых, оптимизировать ионный состав среды плавления ДНК. Эти цели достигаются тем, что исходно короткий ампликон *K-RAS* (55 п.н.), содержащий два искусственных сайта рестрикции *Hae*III, еще более укорачивается (до 30 п.н.) в результате постамплификационной рестриктазной обработки. Кроме этого реакционную смесь разбавляют в несколько раз стандартным раствором, содержащим Na-фосфатный буфер, EDTA и SYBR Green I (что приводит к снижению концентрации ионов  $Mg^{2+}$ , ингибирующих связывание красителя с ДНК; стабилизации pH; достижению необходимой концентрации красителя и прекращению синтеза ДНК).

На первом этапе работы для оценки эффективности “открытого” формата исследовали 20 образцов ДНК, выделенных из ткани рака яичников и предварительно проанализированных методом RFLP [22]. Присутствие мутантного *K-RAS* в двух образцах (7 и 8) установлено как методом RFLP (рис. 1), так и методом плавления ДНК (рис. 2), о чем свидетельствует появление в первом случае фрагмента размером 71 п.н., а во втором – дополнительного пика плавления – слева от основного ( $T_{пл}$  гетеродуплексов с неспаренными основаниями ниже, чем полностью комплементарных). Следует отметить, что для идентификации гетеродуплекса атипичная форма пика плавления имеет большее значение, чем изменение его положения. Последнее может быть обусловлено как разбросом температур в лунках прибора, так и флуктуациями солевого состава образцов, для чего в приборах HRMA предусмотрены программные способы коррекции [1, 15, 25, 26].

На следующем этапе оценивали возможность применения “открытого” формата для анализа наиболее трудных для исследования клинических объектов – формализированных образцов, заключенных в парафиновые блоки. Выделенная из



**Рис. 2.** Выявление мутаций онкогена *K-RAS* в 20 образцах ДНК рака яичников методом плавления (“открытый” формат). Образцы 7 и 8, содержащие мутантные аллели, отмечены стрелками. Значения  $-d(RFU)/dT$  (где RFU – относительные единицы флуоресценции, T – температура, °C) нормализованы по отношению к максимальной величине, принятой за 100%.

Сопоставление методов выявления мутаций *K-RAS*

Образцы ДНК	Патология	Мутации		
		секвенирование	RFLP	плавление ДНК
1	Рак прямой кишки	C12. GGT>GTT	+	+
2	Рак прямой кишки	—	—	?
3	Рак прямой кишки	C12. GGT>GAT	+	+
4	Рак сигмовидной кишки	C12. GGT>GAT	+	+
5	Рак толстой кишки	—	—	?
6	Рак ободочной кишки	C13. GGC>GAC	—	+
7	Рак сигмовидной кишки	C12. GGT>GCT	+	+
8	Рак прямой кишки	—	—	?
9	Рак прямой кишки	C13. GGC>TGC	—	+
10	Метастаз рака кишки в печень	C12. GGT>GTT	+	+
11	Рак сигмовидной кишки	—	—	—
12	Рак прямой кишки	—	—	—
13	Рак сигмовидной кишки	C12. GGT>GTT	+	+
14	Рак толстой кишки	C13. GGC>GAC	—	+
15	Рак толстой кишки	C12. GGT>GTT	+	+
16	Рак толстой кишки	—	—	—
17	Рак прямой кишки	—	—	—
18	Рак толстой кишки	C12. GGT>GAT	+	+
19	Рак слепой кишки	C12. GGT>GAT	н.о.	+
20	Рак сигмовидной кишки	C12. GGT>TGT	+	+

? — Предположительно содержит мутацию (положительный результат в тесте плавления ДНК; отрицательный результат в секвенировании и RFLP); н.о. — не определяли.

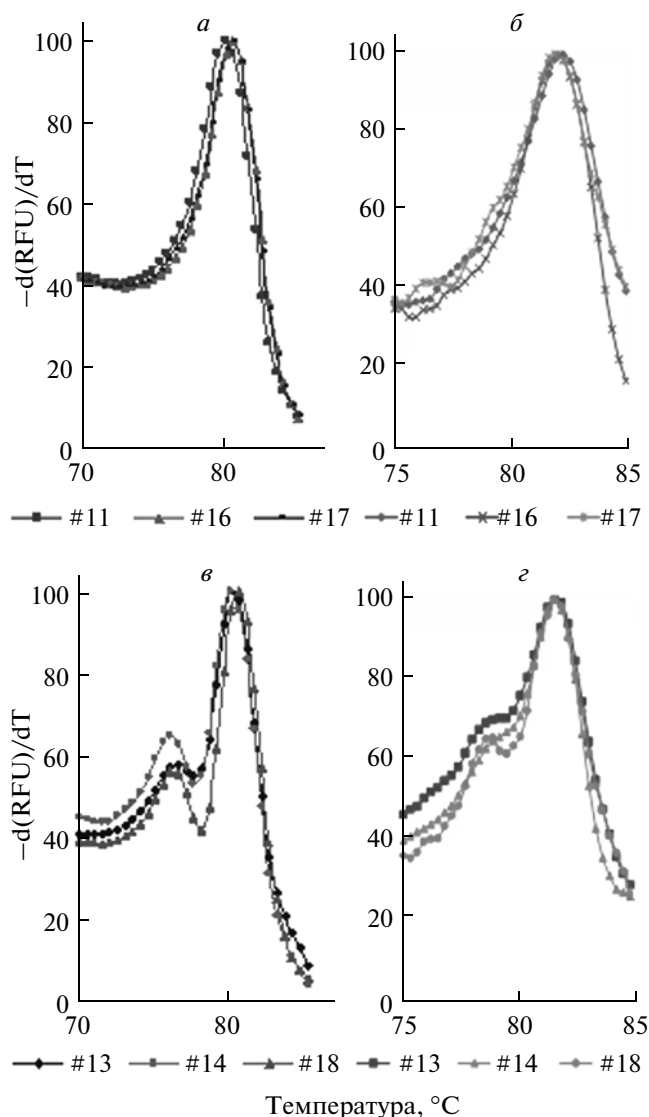
них ДНК обычно фрагментирована [15, 27], что осложняет анализ и ограничивает выбор возможных ампликонов в пользу наиболее коротких. Тем не менее, в клинической практике именно эти объекты наиболее часто используют для анализа генотипа.

Образцы ДНК из опухолей толстой кишки (где мутации *K-RAS* наиболее распространены) исследовали тремя методами: секвенированием по Сэнгеру (стандартный метод клинической генодиагностики), RFLP (используют для анализа кодона 12) и плавлением ДНК в предложенном нами варианте (таблица). Секвенирование выявило отклонения в 13 образцах из 20: мутации кодона 12 обнаружены в 10 образцах (подтверждено RFLP для всех образцов, за исключением образца 19, где из-за низкого, по-видимому, качества ДНК амплификация не прошла); мутации кодона 13 — в трех образцах (метод RFLP не используют для оценки состояния этого кодона).

При анализе плавления ДНК, проведенном в “открытом” формате, не выявлено отклонений от дикого типа в четырех образцах и показано наличие дополнительного пика — слева от основного — в 13 образцах, причем именно в тех, которые предва-

рительно идентифицированы как мутантные секвенированием и RFLP. Каждая из этих групп представлена на рис. 3 типичными образцами, которые анализировали двумя способами: 1) в системе “базового” уровня и “открытом формате” (iQ5 — SYBR Green I; ампликон размером 30 п.н.) (рис. 3а,б) и 2) в системе “высокого” уровня и “закрытом формате” (CFX96—EvaGreen; ампликон размером 55 п.н.) (рис. 3б,г). В обеих системах различия между нормальными и мутантными ампликонами вполне очевидны, однако возможность их дискриминации значительно выше в условиях “открытого формата”.

Более того, анализ кривых плавления показал, что помимо 17 четко определенных образцов есть три сомнительных (образцы 2, 5 и 8), “пропущенных” секвенированием и RFLP (отмечены в таблице вопросительными знаками): их отклонение от нормы выражено относительно небольшим “выпячиванием” левой стороны пика плавления (рис. 4а). Такую картину можно объяснить, предположив, что лишь в небольшой доле клеток ген *K-RAS* мутирован. Для выяснения этого вопроса “сомнительные” образцы исследовали в условиях “открытого формата” (очистка ампликонов им-



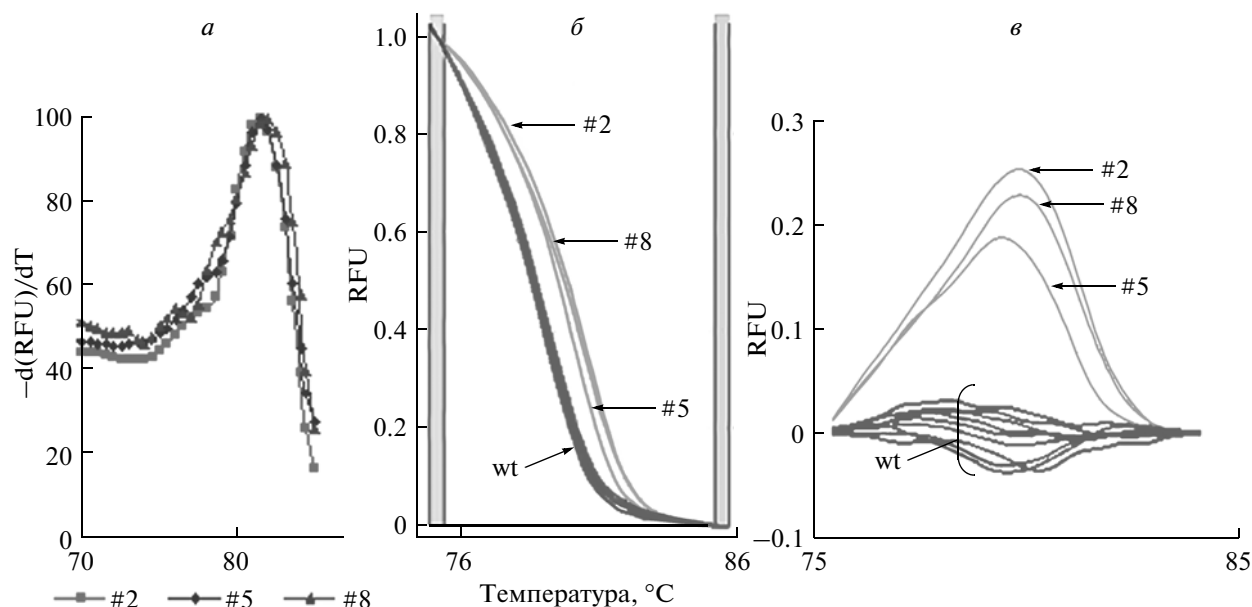
**Рис. 3.** Выявление методом плавления мутаций онкогена *K-RAS* в образцах ДНК, выделенных из формализированной и заключенной в парафиновые блоки ткани рака толстой кишки. *a* и *в* – Система “базового” уровня и “открытый” формат; *б* и *г* – система “высокого” уровня (HRMA) и “закрытый” формат. *a* и *б* – Образцы ДНК дикого типа; *в* и *г* – образцы ДНК, содержащие мутантные аллели. Обозначения те же, что в подписи к рис. 2.

мобилизацией на магнитных гранулах и их последующее укорочение) и, в дополнение к этому, с использованием программных возможностей HRMA (нормализация кривых плавления, разностные кривые, коррекция температурных флуктуаций). В результате проведенного анализа установлено, что аномальное плавление “сомнительных” образцов обусловлено присутствием в них мутантных аллелей (рис. 4*б*, *в*).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выявление мутаций определенных генов в опухоли представляет собой чрезвычайно важную задачу, поскольку этот показатель позволяет строить прогнозы и разрабатывать индивидуаль-

ные стратегии лечения заболевания [28]. Удельный вес клеточного клона с мутацией может меняться по ходу опухолевой прогрессии (в частности, от незначительного в начале до преобладающего в конце), что подчеркивает необходимость его надежного выявления на всех, и особенно на ранних, этапах процесса. Именно поэтому чувствительность метода, выбранного для обнаружения мутации, имеет первостепенное значение. Вместе с тем, судя по данным литературы, чувствительность выявления мутаций *K-RAS* секвенированием по Сэнгеру невелика и гораздо хуже, чем при использовании HRMA [2]. При последовательном разведении мутантной, полученной из клеток SW480, ДНК в избытке ДНК дикого типа получены результаты, также свидетельствующие в пользу высокой чув-



**Рис. 4.** Анализ методом плавления в “открытом” формате “сомнительных” (не выявленных секвенированием и RFLP) образцов ДНК. Плавление фрагментов размером 30 п.н., очищенных иммобилизацией на магнитных гранулах, проводили в системе “базового” уровня iQ5-SYBR Green I (*a*) и в системе “высокого” уровня CFX96-EvaGreen (*б* и *в*). *a* – Пики плавления (отрицательная первая производная кривых плавления ДНК); *б* – нормализованные кривые плавления (по вертикали – относительные единицы флуоресценции); *в* – разностные кривые (difference curves) с компенсацией температурных флуктуаций. Цифрами указаны исследуемые образцы ДНК, wt – образцы ДНК дикого типа.

ствительности метода “открытого” формата плавления ДНК по сравнению с секвенированием (предел обнаружения мутантных аллелей соответствует ~5% и 20–30%) [17]. При исследовании клинических образцов недостаточная чувствительность метода секвенирования ДНК приводит к высокой доле ложноотрицательных результатов [29].

Однако следует заметить, что преимущество метода секвенирования состоит в том, что в результате можно точно определить место мутации и ее тип, тогда как плавление ДНК обычно позволяет лишь констатировать ее присутствие в ампликоне. Хотя в клинической медицине одной такой констатации обычно достаточно для практических выводов, в некоторых случаях возможен следующий компромисс, экономящий время, труд и средства: предварительный HRMA-скрининг для выявления образцов ДНК, содержащих мутантные аллели, и затем секвенирование только этих образцов (желательно, в более чувствительном, чем секвенирование по Сэнгеру, варианте, например, пиросеквенирования [30] или “холодной ПЦР” [31]) – для подтверждения и детализации обнаруженных на первом этапе мутаций.

Описанный в данной работе “открытый” вариант плавления ДНК не только повышает чувствительность генотипирования и сканирования мутаций, что может, в частности, способствовать снижению числа ложноотрицательных результатов при обследовании онкологических больных,

но и позволяет использовать для этой цели приборы, не предназначенные специально для HRMA, т.е. менее дорогие и достаточно распространенные. Простота, высокая производительность и чувствительность метода плавления ДНК делают его весьма привлекательным для применения в генодиагностике.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 10-04-00060).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Erali M., Wittwer C.T. 2010. High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods*. **50**, 250–261.
2. Vossen R.H., Aten E., Roos A., den Dunnen J.T. 2009. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum. Mutat.* **30**, 860–866.
3. Reed G.H., Kent J.O., Wittwer C.T. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. **8**, 597–608.
4. Herrmann M.G., Durtschi J.D., Bromley L.K., Wittwer C.T., Voelkerding K.V. 2006. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin. Chem.* **52**, 494–503.
5. Lipsky R.H., Mazzanti C.M., Rudolph J.G., Xu K., Vyas G., Bozak D., Radel M.Q., Goldman D. 2001. DNA melting analysis for detection of single nucleotide polymorphisms. *Clin. Chem.* **47**, 635–644.
6. Montgomery J., Wittwer C.T., Palais R., Zhou L. 2007. Simultaneous mutation scanning and genotyping by

- high-resolution DNA melting analysis. *Nat. Protoc.* **2**, 59–66.
7. Reed G.H., Wittwer C.T. 2004. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin. Chem.* **50**, 1748–1754.
  8. Gundry C.N., Vandersteen J.G., Reed G.H., Pryor R.J., Chen J., Wittwer C.T. 2003. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin. Chem.* **49**, 396–406.
  9. Zhou L., Myers A.N., Vandersteen J.G., Wang L., Wittwer C.T. 2004. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clin. Chem.* **50**, 1328–1335.
  10. Zhou L., Wang L., Palais R., Pryor R., Wittwer C.T. 2005. High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution. *Clin. Chem.* **51**, 1770–1777.
  11. 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. *Clin. Chem.* **54**, 1648–1656.
  12. Zhou L., Palais R.A., Smith G.D., Anderson D., Rowe L.R., Wittwer C.T. 2010. Enrichment and detection of rare alleles by means of snapback primers and rapid-cycle PCR. *Clin. Chem.* **56**, 814–822.
  13. Deschoolmeester V., Boeckx C., Baay M., Weyler J., Wuyts W., van Marck E., Peeters M., Lardon F., Vermorken J.B. 2010. KRAS mutation detection and prognostic potential in sporadic colorectal cancer using high-resolution melting analysis. *Br. J. Cancer.* **103**, 1627–1636.
  14. Seipp M.T., Durtschi J.D., Liew M.A., Williams J., Damjanovich K., Pont-Kingdon G., Lyon E., Voelkerding K.V., Wittwer C.T. 2007. Unlabeled oligonucleotides as internal temperature controls for genotyping by amplicon melting. *J. Mol. Diagn.* **9**, 284–289.
  15. van Eijk R., van Puijenbroek M., Chhatta A.R., Gupta N., Vossen R.H., Lips E.H., Cleton-Jansen A.M., Morreau H., van Wezel T. 2010. Sensitive and specific KRAS somatic mutation analysis on whole-genome amplified DNA from archival tissues. *J. Mol. Diagn.* **12**, 27–34.
  16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, pp. B13–B14.
  17. Botezatu I.V., Kondratova V.N., Shelepov V.P., Lichtenstein A.V. 2011. DNA melting analysis: application of the “open tube” format for detection of mutant KRAS. *Analyt. Biochem.* **419**, 302–308.
  18. Gonzalez-Bosquet J., Calcei J., Wei J.S., Garcia-Closas M., Sherman M.E., Hewitt S., Vockley J., Lisowska J., Yang H.P., Khan J., Chanock S. 2011. Detection of somatic mutations by high-resolution DNA melting (HRM) analysis in multiple cancers. *PLoS ONE.* **6**, e14522.
  19. Крпуй М., Newnham G.M., Thomas D.M., Conron M., Dobrovic A. 2006. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* **6**, 295.
  20. Kahn S.M., Jiang W., Culbertson T.A., Weinstein I.B., Williams G.M., Tomita N., Ronai Z. 1991. Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-RAS genes via ‘enriched’ PCR amplification. *Oncogene.* **6**, 1079–1083.
  21. Koprski M.S., Benko F.A., Kwee C., Leitzel K.E., Eskander E., Lipton A., Gocke C.D. 1997. Detection of mutant K-RAS DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br. J. Cancer.* **76**, 1293–1299.
  22. Su Y.H., Wang M., Brenner D.E., Ng A., Melkonyan H., Umansky S., Syngal S., Block T.M. 2004. Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. *J. Mol. Diagn.* **6**, 101–107.
  23. Tomblin G., Bellizzi D., Sgaramella V. 1996. Heterogeneity of primer extension products in asymmetric PCR is due both to cleavage by a structure-specific exo/endonuclease activity of DNA polymerases and to premature stops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 2724–2728.
  24. Bonner T.I., Brenner D.J., Neufeld B.R., Britten R.J. 1973. Reduction in the rate of DNA reassociation by sequence divergence. *J. Mol. Biol.* **81**, 123–135.
  25. Palais R., Wittwer C.T. 2009. Mathematical algorithms for high-resolution DNA melting analysis. *Methods Enzymol.* **454**, 323–343.
  26. Herrmann M.G., Durtschi J.D., Wittwer C.T., Voelkerding K.V. 2007. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clin. Chem.* **53**, 1544–1548.
  27. Ogasawara N., Bando H., Kawamoto Y., Yoshino T., Tsuchihara K., Ohtsu A., Esumi H. 2011. Feasibility and robustness of amplification refractory mutation system (ARMS)-based KRAS testing using clinically available formalin-fixed, paraffin-embedded samples of colorectal cancers. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **41**, 52–56.
  28. Лихтенштейн А.В., Потапова Г.И. 2003. Генетические дефекты как маркеры опухолевого роста. *Молекуляр. биология.* **37**, 181–193.
  29. Querings S., Altmuller J., Ansen S., Zander T., Seidel D., Gabler F., Peifer M., Markert E., Stemshorn K., Timmermann B., Saal B., Klose S., Ernestus K., Scheffler M., Engel-Riedel W., Stoelben E., Brambilla E., Wolf J., Nurnberg P., Thomas R.K. 2011. Benchmarking of mutation diagnostics in clinical lung cancer specimens. *PLoS ONE.* **6**, e19601.
  30. Weidlich S., Walsh K., Crowther D., Burczynski M.E., Feuerstein G., Carey F.A., Steele R.J.C., Wolf C.R., Miele G., Smith G. 2011. Pyrosequencing-based methods reveal marked inter-individual differences in oncogene mutation burden in human colorectal tumours. *Br. J. Cancer.* **105**, 246–254.
  31. Santis G., Angell R., Nickless G., Quinn A., Herbert A., Cane P., Spicer J., Breen R., McLean E., Tobal K. 2011. Screening for EGFR and KRAS mutations in endobronchial ultrasound derived transbronchial needle aspirates in non-small cell lung cancer using COLD-PCR. *PLoS ONE.* **6**, e25191.