

Schmelzkurvenanalyse



J. Arnemann
Abteilung Molekulargenetik, Labor Dr. Wisplinghoff, Köln,
Deutschland

Synonym(e) [Melting curve-Analyse](#)

Englischer Begriff melting curve analysis

Definition Die Schmelzkurvenanalyse charakterisiert die Dissoziation doppelsträngiger DNA während der Erhitzung und ermöglicht die spezifische Detektion von Sequenzabweichungen bzw. definierten pathogenen Mutationen.

Beschreibung Bei der Erhitzung doppelsträngiger DNA kann der Zustand der Dissoziation in 2 Einzelstränge optisch durch die Absorbierungsintensität oder Hyperchromazität verfolgt werden.

Die Doppelhelixstruktur der DNA ist in wässriger Lösung nur bedingt stabil. Unter extremen Bedingungen, wie z. B. starker Erhitzung oder hohen pH-Werten ($>11,5$) werden die beiden Einzelstränge und hier insbesondere die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen in der Helix aufgrund der Strukturänderung voneinander getrennt, sodass der Doppelstrang in 2 Einzelstränge dissoziiert oder „aufgeschmolzen“ wird. Dieser Prozess kann unter UV-Licht bei 260 nm verfolgt werden, da die doppelsträngige DNA einen niedrigen Absorptionskoeffizienten hat und die einzelsträngige DNA einen hohen. Diesen Prozess kann man als Zunahme der Absorption in Abhängigkeit von der Temperatur als Schmelzkurve dokumentieren (Hyperchromizitätseffekt). Die Schmelzkurve hat einen sigmoiden Verlauf, wobei der mathematische Wendepunkt der Kurve dem eigentlichen Schmelzpunkt, spezifisch für die eingesetzte DNA, entspricht und den Zustand von 50 % einzelsträngiger und

50 % doppelsträngiger DNA repräsentiert. Der Schmelzpunkt ist u. a. auch davon abhängig, wie hoch der jeweilige Anteil an G-C- bzw. A-T-Paarungen ist. Da G-C-Bindungen über je 3 Wasserstoffbrückenbindungen, A-T-Bindungen aber nur über 2 verfügen, lösen sich die G-C-Bindungen unter höherer Energie, d. h. höherer Schmelztemperatur.

Dies ist auch das Prinzip der Schmelzkurvenanalyse, bei der heterozygote oder homozygote Varianten gegenüber einer Wildtyp-Sequenz eine leichte Verschiebung der Schmelztemperatur zeigen. Die Schmelzkurvenanalyse erfolgt immer im Anschluss an eine Realtime-PCR, bei der das PCR-Produkt unter langsamer Temperaturzunahme von beispielsweise $0,2\text{ }^{\circ}\text{C/s}$ in einem Temperaturbereich von typischerweise $40\text{--}80\text{ }^{\circ}\text{C}$ „aufgeschmolzen“ wird. Die Genauigkeit dieser Analyse kann dadurch verbessert werden, dass die in der PCR eingesetzten Hybridisierungsproben (HybProbes) oder LightCycler-Sonden direkt über die bekannten Mutationshotspots gelegt werden. Die LightCycler-Sonden bestehen dabei aus 2 Oligonukleotiden, jeweils mit einem Donor- und Akzeptorfarbstoff, die auf der DNA direkt nebeneinander liegen und als FRET-Effekt (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) einen Energietransfer des Donors auf den Akzeptor bewirken. Dissoziiert eine dieser beiden Sonden aufgrund eines Basenmismatches bei einer anderen Temperatur, wird in einer grafischen Darstellung ($-dF/dT$ -Werte zur Temperatur) ein unterschiedlicher, aber spezifischer Peak dargestellt, der in Kombination mit Peaks für homozygote Wildtypsequenzen, heterozygote oder homozygote Mutationen eine zuverlässige Diagnose liefert.

Literatur

Tsiatis AC et al (2010) Comparison of sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations. *J Molecular Diagnostics* 12:425–432