

---

## TECNICA

### Soluzione rapida e automatizzata per la rilevazione di mutazioni

## DHPLC per l'analisi del DNA

---

La DHPLC può essere impiegata come tecnica per la rilevazione di nuove mutazioni (SNPs, inserzioni, delezioni e tandem repeat) o per lo screening su popolazioni per la ricerca

di una specifica mutazione. Questa tecnica cromatografica sta guadagnando il favore degli studiosi nella ricerca e nello screening di SNP, perché è completamente automatizzabile, molto sensibile, rapida e - fatto salvo l'investimento iniziale - ha costi operativi ridotti.

Può essere utilizzata anche per purificare i prodotti provenienti dalla PCR, per garantirne un uso esente da contaminazioni, e per separazioni di frammenti di DNA tagliati con enzimi di restrizione.

di Silvia Guenzi

M

Molte delle mutazioni del DNA, che sono la causa di malattie o che determinano la predisposizione ad essere colpiti da un infarto o da un dato tumore, sono rappresentate dalla modifica di un solo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism, SNP).

Tra le molte tecniche impiegate per la rilevazione delle mutazioni puntiformi nel DNA, la DHPLC o HPLC denaturante è forse la più rapida ed automatizzabile; inoltre ha una sensibilità superiore al 97%, affermandosi anche come strumento utile non solo a livello diagnostico (cioè per la ricerca di una o più mutazioni note in una sequenza) ma anche e soprattutto per la ricerca di nuove mutazioni.

Rilevazione delle mutazioni mediante DHPLC

La DHPLC è una tecnica sviluppata nel laboratorio del Prof. Cavalli-Sforza alla Stanford University (USA) per la rivelazione di mutazioni nel DNA.

Essa si basa sulla differente velocità di migrazione, in un mezzo simile ad un gel quale è la colonna HPLC, per gli eteroduplex e omoduplex. Questi duplex si formano quando un frammento amplificato di DNA mutato ed uno non mutato vengono denaturati termicamente e lasciati ricombinare. Una qualsiasi variazione tra la molecola originale (wild type) e quella mutata porta alla formazione di un eteroduplex (combinazione di due catene di DNA a singola catena non perfettamente corrispondenti, caratterizzata dalla presenza di una "bolla" dove c'è la mutazione)(fig. 1).

L'eteroduplex si comporta cromatograficamente in modo differente dall'omoduplex non mutato. I tempi di ritenzione sono differenti, in particolare l'eteroduplex è solitamente più veloce (meno trattenuto) dell'omoduplex e da ciò si può caratterizzare la presenza di una mutazione in un campione.

La DHPLC rileva la differenza tra la molecola dell'omoduplex - che ad una determinata temperatura è ancora sotto forma di doppia elica - e quella dell'eteroduplex - che alla stessa temperatura mostra una parziale denaturazione in corrispondenza del sito dove si è verificato un misappaiamento. Tale temperatura è detta temperatura di "quasi-denaturazione".

La presenza di una mutazione si evidenzia sotto forma di picchi ulteriori rispetto al "wild"; il grande vantaggio per il ricercatore è che - pur non caratterizzando la mutazione (cioè non viene definito come è stata modificata la sequenza) - la DHPLC è in grado di rivelarne la presenza all'interno del frammento analizzato (fig. 2).

Come funziona e come si usa un sistema DHPLC

La DHPLC impiega il meccanismo di ripartizione in fase inversa ad accoppiamento ionico (RP-IP), che separa le molecole e le eluisce sulla base della dimensione crescente delle molecole.

Questa tecnica utilizza un sistema HPLC completamente inerte, e privo di elementi metallici a contatto con il circuito idraulico e cromatografico, un sistema di controllo della temperatura particolarmente preciso ed esteso a molti più elementi rispetto ad un sistema HPLC tradizionale (dove si termostata solo la colonna).

I campioni sono amplificati normalmente come da protocolli standard della PCR.

Quando il sistema viene usato per screenare una popolazione per una determinata mutazione e devono essere identificate sia il mutante eterozigote che omozigote, si miscelano l'amplificato di un normale (controllo) ed il campione, riscaldati e lasciati ricombinare con un raffreddamento lento (da 95 a 65 °C in 30 minuti). La micropiastrella della PCR può essere posizionata direttamente sull'autocampionatore del sistema, che provvede a prelevare 2 o 5 µL di amplificato PCR (circa 20 - 50 nanogrammi di DNA) ed ad iniettarlo nel sistema DHPLC.

La separazione avviene ad una temperatura molto stabilizzata detta temperatura di "quasi-denaturazione" ottenuta sperimentalmente (con "temperature mapping") oppure tramite l'algoritmo di Stanford (vedi riquadro)

Una volta stabilita questa temperatura, che è specifica per la sequenza in esame, si procede ad analizzare tutti i campioni alle stesse condizioni. Il risultato, che si ottiene nel giro di circa 6-7 minuti, viene registrato dal PC e riportato sotto forma grafica dal cromatogramma; si riconosce la presenza di una o mutazione allorché il cromatogramma riporti più di un picco (fig. 2).

Per monitorare le separazioni ottenute in colonna si utilizza uno spettrofotometro corredato di microcella a flusso, dove l'eluato passa in continuo e ne viene effettuata la lettura nell'ultravioletto a 260 nm. La sensibilità è molto elevata. È anche possibile registrare cromatogrammi standard di pattern di mutazioni per costituire una banca dati delle mutazioni già rilevate.

Altra possibilità offerta dalla DHPLC è quella di recuperare le specie molecolari: si possono raccogliere le frazioni di eluato corrispondenti ai picchi, contenenti gli omoduplex e gli eteroduplex, per caratterizzarli ulteriormente, per esempio sequenziandoli.

Calcolo della temperatura di "quasi denaturazione" per la DHPLC

Ci sono due possibili casi: si conosce già la sequenza del frammento da analizzare

oppure si hanno informazioni non complete.

Nel caso in cui si conosca già la sequenza del frammento da analizzare, è sufficiente collegarsi al sito dell'Università di Stanford (proprietaria del brevetto sulla DHPLC) e accedere all'algoritmo tramite il sito <http://insertion.stanford.edu/melt.html>. Tale algoritmo calcola la temperatura alla quale effettuare la separazione che deve essere sufficiente per la parziale denaturazione dell'eteroduplex eventualmente presente (in caso di una mutazione puntiforme), ma non in grado di denaturare l'omoduplex.

Questa temperatura può richiedere piccoli aggiustamenti (di un paio di gradi) attorno a quella calcolata per trovare sperimentalmente quella più corretta.

Si riconosce la temperatura idonea quando la molecola della coppia omoduplex è ancora intatta, mentre la molecola della coppia eteroduplex mostra una parziale denaturazione nel sito di non perfetta corrispondenza (dove c'è la mutazione) e viene eluita - solitamente - prima della coppia omoduplex.

Se non si conosce precisamente la sequenza del frammento da analizzare, per trovare la temperatura corretta di "quasi denaturazione" bisogna cercarla sperimentalmente (temperature mapping").

Come si confronta la DHPLC con altre tecniche in genetica?

Fino ad oggi la scoperta di SNP era il risultato di massicci sforzi di sequenziamento con sequenziatori automatici (molto costosi sia come investimento sia come costi operativi) di una serie infinita di prodotti amplificati con PCR; in alternativa si opera con una tecnica chiamata SSCP (single stranded conformational polymorphism) che, seppure ancora molto usata, è lenta, richiede molto lavoro manuale ed ha una sensibilità in molti casi insufficiente; per contro è abbastanza economica, non richiedendo investimenti in apparecchiature particolari. Molte pubblicazioni dimostrano la superiorità del metodo DHPLC per la ricerca e lo screening di SNP rispetto alle altre tecniche.

La DHPLC è concettualmente molto simile alla TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), ma, a differenza di questa, non richiede l'aggiunta di segmenti GC (GC clamps).

La DHPLC è molto sensibile anche per mutazioni puntiformi (95-97%) e può essere applicata su frammenti di DNA di dimensioni tra 100 e 700 bp (base pairs, coppie di basi). Il maggior vantaggio della DHPLC è quello di essere totalmente automatizzabile come tutti gli HPLC, è inoltre una tecnica rapida e poco laboriosa, non richiedendo attività addizionali rispetto alla comune amplificazione del DNA mediante PCR.

Produttività e costi della DHPLC

La DHPLC garantisce una funzionalità automatica di 24 ore su 24. Una singola analisi richiede circa 7 minuti e perciò la resa può arrivare ad oltre 200 campioni al giorno. L'iniettore automatico con cambiampioni a micropiastre alloggia fino a 7 micropiastre, permettendo la programmazione del sistema anche per il week-end. Considerando i costi vivi di impiego della tecnica DHPLC, si possono considerare compresi tra le 700 e le 1.000 circa per corsa, includendo il costo dei tamponi e dell'uso della colonna.

Per quali altre applicazioni può essere utilizzata la DHPLC?

Oltre che per la detezione di mutazioni puntiformi, inserzioni, delezioni e tandem repeat del DNA, la DHPLC può essere impiegata per la separazione di frammenti di DNA sulla base delle dimensioni. Per esempio si può valutare la qualità e la purezza del prodotto amplificato con PCR prima di impiegarlo: la purezza dell'amplificato è di fondamentale importanza per evitare problemi successivamente.

Molti test diagnostici sono basati su digestione enzimatica (con enzimi di restrizione) del DNA, e generano frammenti di DNA specifici. L'enzima di restrizione agisce solo su determinate sequenze e, in caso di una mutazione presente nella sequenza, il taglio non avviene: si rileva perciò la presenza di frammenti aventi dimensioni differenti rispetto al DNA normale.

Nel settore biologico va poi ricordato l'uso della DHPLC per la purificazione di proteine e peptidi.

È possibile utilizzare un normale sistema HPLC per ottenere separazioni in DHPLC?

Il sistema DHPLC è un HPLC specializzato: potrebbe perciò essere sufficiente una serie di piccole modifiche per trasformare un buon HPLC in un DHPLC. Le modifiche sono sostanzialmente relative al sistema di termostatazione: in un sistema HPLC viene solitamente termostatata la colonna e l'eventuale precolonna; per la DHPLC è essenziale che la separazione cromatografica avvenga all'esatta temperatura di "quasi-denaturazione" ottenuta sperimentalmente (con "temperature mapping") oppure tramite l'algoritmo di Stanford: per tale motivo è necessario che oltre alla colonna siano termostatati alla stessa temperatura anche i tamponi e il campione; per alcune apparecchiature HPLC è stato costituito un "kit" di aggiornamento che consente di apportare le modifiche necessarie.

## BIBLIOGRAFIA

Oefner, P.J., Huber, C.G., Nathakarnkitkool, S. and Bonn, G.K. (1992) Comparative study of capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography in the analysis of oligonucleotides and DNA. *J.Chromatogr.* 625: 331.

Huber, C.G., Oefner, P.J., Preuss, E. and Bonn, G.K. (1993) High-resolution liquid chromatography of DNA fragments on highly cross-linked poly(styrene-divinylbenzene) particles. *Nucl. Acids Res.* 21: 1061.

Huber, C.G., Oefner, P.J. and Bonn, G.K. (1993) High-resolution liquid chromatography of oligonucleotides on nonporous alkylated styrene-divinylbenzene copolymers. *Anal. Biochem.* 212: 351-358.

Huber, C.G., Oefner, P.J. and Bonn, G.K. (1993) Rapid analysis of biopolymers on modified nonporous polystyrene-divinylbenzene particles. *Chromatographia* 37: 653.

Bonn, G., Huber, C. and Oefner, P. (1994) Verfahren zur Trennung von Nucleinsäuren. Austrian Patent No. 398 973, Vienna, Austria.

## breve storia della dhplc

Nel 1993 il Dr. Huber e il Dr. Oefner (reff.1 - 5) svilupparono un nuovo tipo di colonna per HPLC capace di separare frammenti di DNA con dimensioni comprese tra 50 e 700 bp ( base pairs = coppie di basi ) in soli 6 minuti. Le tecniche

cromatografiche in precedenza impiegate - imperniate sullo scambio ionico- avevano una bassa risoluzione, richiedevano oltre un'ora per separazione e non erano in grado di correlare i tempi di ritenzione con la dimensione del frammento.

Questa nuova tecnica era invece capace di separare frammenti che differivano di sole poche coppie di basi e la tecnica di ripartizione in fase inversa ad accoppiamento ionico da loro utilizzata si rivelò in grado di dare una separazione del DNA in funzione della dimensione dei frammenti. Immediatamente la HPLC apriva nuove strade all'analisi del DNA.

Attualmente la maggior parte delle determinazioni dimensionali del DNA viene eseguita con elettroforesi su gel, ma la HPLC offre i notevoli vantaggi derivanti dalla completa automazione e da quantificazione più affidabile e riproducibile.

Il secondo, decisivo, impulso maturò quando il Dr. Huber e il Dr. Oefner (della Stanford University, Palo Alto - California, USA) scoprirono che questa tecnica era in grado di rilevare differenze minime nel DNA.

Formazione di omoduplex ed eteroduplex  
nel caso dell'omozigote e dell'eterozigote

Durante le operazioni di amplificazione tramite PCR, si generano n copie della sequenza originale. Se il DNA non contiene mutazioni, nella fase di re-annealing si formano solo omoduplex, in quanto i due filamenti (strand) sono complementari e si ricombinano nella forma a doppia elica. Nel caso in cui ci sia una mutazione puntiforme o un'altra alterazione nella sequenza, durante la fase di re-annealing finale oltre agli omoduplex originali, si generano eteroduplex dalla combinazione di uno strand wild type (normale) e di uno mutato.

Nel caso dell'eterozigote, cioè nel caso in cui un cromosoma porti la mutazione e l'altro sia normale, si formeranno sia omoduplex sia eteroduplex.

Nel caso dell'omozigote, in cui la stessa mutazione puntiforme è presente su entrambi i cromosomi, non c'è la possibilità di formare direttamente eteroduplex; si ovvia a tale limite miscelando al campione una quantità analoga di wild type (un campione "normale"). Gli eteroduplex si formeranno tra gli strand del campione e del "wild type" aggiunto, permettendo la rivelazione della mutazione.

hplc: un breve ripasso

L'HPLC o cromatografia in fase liquida ad alte prestazioni è una tecnica di separazione ad elevata efficienza e selettività che consente di caratterizzare differenti molecole in base a specifiche caratteristiche chimiche, chimico-fisiche e steriche (dimensionali e strutturali). Il campione da analizzare viene introdotto in una colonna riempita (impaccata) con materiale cromatografico o fase stazionaria (in genere silice o materiali polimerici con dimensioni di 3 - 5 mm opportunamente derivatizzati con prodotti chimici) ed eluito con tamponi o solventi.

Il principio su cui si fonda è la differente interazione che le molecole da separare, sotto la modulazione chimica e meccanica dell'eluente (i tamponi), mostrano nei confronti del materiale cromatografico. Il risultato è l'eluizione delle molecole secondo un ordine stabilito in funzione della qualità e quantità di interazioni: la molecola caratterizzata dal minor numero di interazioni è eluita più velocemente e via via tutte le altre molecole eluiscono in base alla sempre maggior interazione

generata e subìta. È così possibile differenziare le molecole secondo un preciso criterio.

DHPLC: un po' di terminologia

HPLC inerte (biocompatibile)

È necessario evitare la presenza di ioni metallici (soprattutto ferro), che viene normalmente rilasciato nei tamponi da parte delle pompe (che hanno solitamente le testate in acciaio) perché l'accumulo di ioni Fe può disturbare la riproducibilità della separazione. La soluzione migliore è utilizzare un sistema cosiddetto "biocompatibile", di cui i materiali a contatto con il circuito cromatografico (tubi, capillari di collegamento, testata, miscelatore ecc.) sono in PEEK - un materiale plastico particolarmente resistente ed indicato all'uso con solventi e tamponi - oppure in titanio.

In alternativa, per chi già disponesse di un sistema HPLC non biocompatibile è possibile utilizzare una sorta di "filtro" in linea sui tamponi, che trattiene gli ioni indesiderati. Nella formulazione dei tamponi è inclusa una discreta quantità di sale disodico di EDTA, un agente complessante che la funzione di eliminare, trasportandoli all'esterno della colonna, gli ioni metallici.

IP- RP HPLC : ion pairing reverse phase HPLC: è un modo cromatografico di separazione dove in ausilio della tecnica di ripartizione in fase inversa si impiega un controione (ion pair).

Ripartizione: la molecola, che ha differenti coefficienti di ripartizione nei confronti del solvente e della fase stazionaria, si "ripartisce" (solvata, solubilizza) in proporzione ai rispettivi coefficienti. Il modo di ripartizione di può essere di due tipi: ripartizione in fase diretta (dove la fase stazionaria è più polare della fase mobile) e ripartizione in fase inversa (dove la fase stazionaria è meno polare della fase mobile). Questo meccanismo di ritenzione è il più utilizzato in generale per la sua "robustezza" (veloce nel ristabilire le condizioni iniziali anche in separazioni a gradiente, adatta a un elevato numero di specie molecolari, ecc.) ed è quello utilizzato in DHPLC.

Controione: è una molecola con una doppia funzionalità - lipofila e idrofila - in grado di interagire sia con la molecola da analizzare sia con il supporto cromatografico, facilitandone l'interazione e migliorando la risoluzione della separazione. Il controione è aggiunto in basse quantità (es. 0,1 M) nel tampone, in modo da essere costantemente disponibile.

Nel caso della DHPLC tale funzione è svolta dal Trietil Ammonio Acetato (TEAA), che si forma per azione dell'acido acetico sulla trietilammina. Il controione avvolge la molecola da analizzare ed il complesso sterico risultante interagisce globalmente con la fase stazionaria (il materiale cromatografico con cui la colonna è impaccata). La molecola del DNA viene contornata dalle molecole del TEAA che ha una doppia funzionalità: polare, per interagire con il DNA, e apolare per interagire con la fase stazionaria C18. C18 significa che il materiale cromatografico di cui è impaccata la colonna è stato derivatizzato con molecole di octadecilsilano, che è caratterizzata da uno scheletro alchilico a 18 atomi di carbonio.

Denaturante: l'ambiente cromatografico in cui si analizzano i frammenti di DNA è

definito "quasi-denaturante" per la presenza di TEAA (trietil ammonio acetato) nel tampone, di acetonitrile e per la omogenea termostatazione del sistema cromatografico (colonna - tamponi/solventi e campione).

Temperature mapping: procedura sperimentale per ottenere l'indicazione della temperatura alla quale effettuare la separazione cromatografica per rilevare le mutazioni in un dato frammento di DNA. Questa è la tecnica cui si ricorre qualora si voglia ottenere la massima sensibilità della metodica DHPLC (circa il 97%). Consiste nell'analizzare a tutte le temperature teoriche (tra 55 e 70°C) il frammento di DNA in esame e valutarne il comportamento.

Algoritmo di Stanford: è un algoritmo disponibile tramite Internet al sito <http://insertion.stanford.edu/melt.html> dove si trova il programma per il calcolo delle temperature di parziale denaturazione degli eteroduplex nelle condizioni DHPLC, ossia una temperatura che è sufficiente per la parziale denaturazione dell'eteroduplex eventualmente presente (in caso di una mutazione puntiforme), ma non in grado di denaturare l'omoduplex. Viene anche suggerito il profilo di gradiente da adottare.

Si tratta di inviare la sequenza di interesse; il calcolo è immediato e in tempo reale sullo schermo compare:

- la conferma della sequenza,
- una o più temperature, calcolate secondo l'appropriato algoritmo
- alcuni suggerimenti, sotto forma tabulata, relativi al gradiente da utilizzare per la separazione cromatografica alle differenti temperature.

Da notare le grandi differenze tra le temperature di fusione del DNA in condizioni normali e in quelle DHPLC: possono differire anche di 15- 20°C, differenza è da attribuire alla presenza del TEAA nei tamponi.



[Torna all'indice](#)