

УДК 543.426; 543.9

© Д. А. Белов, Ю. В. Белов, А. Н. Зубик, В. Е. Курочкин, 2022

ПОВЫШЕНИЕ ДОСТОВЕРНОСТИ МЕТОДА ПЛАВЛЕНИЯ ДНК ПУТЕМ ПРОВЕДЕНИЯ ПОВТОРНЫХ АНАЛИЗОВ

В статье изучена возможность использования повторных анализов методом плавления ДНК для повышения их достоверности, а именно уменьшения погрешности определения температуры плавления ДНК T_m . Экспериментально выявлено статистически значимое различие значений T_m анализируемых образцов в последовательно проведенных анализах, препятствующее повышению достоверности. Показано, что увеличение температуры плавления T_m в проведенной серии экспериментов в среднем на 0.12 град. обусловлено испарением 1.65% воды из пробирки. Экспериментально выявлено изменение массы на $0.8 \pm 0.1\%$ от общей массы воды в пробирках в результате теплового режима, аналогичного анализу методом плавления, что частично подтверждает предположение. Рекомендовано при повторных анализах методом плавления ДНК учитывать этот эффект и реализовывать мероприятия, препятствующие испарению воды. Приведены аналитические выражения для относительной оценки изменения концентрации ионов натрия и объема воды в пробе.

Кл. сл.: метод плавления ДНК, HRMA, испарение

ВВЕДЕНИЕ

Современный метод плавления ДНК выполняется после полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на детектирующих амплификаторах, при этом для генерации флуоресцентного сигнала используются интеркалирующие красители, молекулы которых присоединяются к двойной цепи ДНК. При повышении температуры двойная цепь ДНК постепенно распадается на две одноцепочечные молекулы, вызывая отсоединение молекул красителя и спад интенсивности флуоресценции [1].

Графики плавления ДНК (ГП) представляют собой зависимости флуоресцентного отклика пробы от температуры и отличаются друг от друга формой и значением температуры плавления T_m , что позволяет определять различия во фрагментах ДНК по их составу, длине и статусу метилирования и применять метод во множестве прикладных задач, таких как геномное сканирование, генотипирование, сопоставление последовательностей и эпигенетические исследования [2].

Значение T_m соответствует температуре, при которой 50% нуклеотидов в молекулах ДНК теряют водородные связи [3], и традиционно определяется как координата точки перегиба ГП, что соответствует значению максимума отрицательной производной ГП по температуре [4]. В ряде задач требуется высокая точность определения температуры T_m , например, для достоверного генотипиро-

вания штаммов *M. tuberculosis* необходимо выявлять различия в значениях T_m менее 0.1 град. [5].

С целью уменьшения погрешности измерения температуры T_m применяются известные методики, основанные на фильтрации и/или аппроксимации ГП различными непрерывными функциями, например полиномом третьей степени в ограниченном диапазоне изменения температуры, как в программе ANK Melting [6], или усовершенствованной сигмоидальной функцией (СФ) [7]. В статьях [8–10] рекомендуется после предварительной нормализации выполнять численное дифференцирование графиков плавления с помощью полиномов Савицкого – Голея второй степени в каждой точке [11].

Метод плавления ДНК является неразрушающим, поэтому одним из дополнительных способов повышения достоверности результатов анализа может быть повторение экспериментов для накопления статистики. В настоящей статье рассматривается возможность применения такого подхода.

ПОЛУЧЕНИЕ И ОБРАБОТКА ИСХОДНЫХ ДАННЫХ

Для получения исходных данных выполнен трехкратный анализ методом плавления ДНК трех известных образцов ампликонов цитокератина (СК-19) на анализаторе нуклеиновых кислот АНК-32,

который серийно выпускается в Институте аналитического приборостроения РАН (Россия). Ампликоны были получены в результате 50 циклов ПЦР-РВ с интеркалирующим красителем SYBR Green I ("ПЦР-Микс" М-427, ООО "Синтол", Россия) и специально разработанными праймерами (ООО "ДНК-Синтез", Россия). Образцы 1, 2 и 3 в четырех пробирках каждый анализируются

лишь в диапазоне температур 70–95 °С с шагом 0.5 град. и длительностью выдержки на каждом шаге 30 с. Образцы 1, 2 и 3 имеют соответственно содержание нуклеотидов гуанина и цитозина во фрагменте ДНК [G + C], равное 53, 59 и 58% при длине фрагментов L_p , равной 103, 209 и 309 пар нуклеотидов (п. н.). Начальная концентрация ионов натрия во всех пробах равна 0.125 моль/л.

Табл. 1. Значения температур плавления анализируемых образцов (°С)

№ эксперимента	№ образца		
	1	2	3
1	84.37 ± 0.04	90.55 ± 0.10	90.72 ± 0.08
2	84.53 ± 0.05	90.68 ± 0.09	90.85 ± 0.06
3	84.65 ± 0.09	90.83 ± 0.12	90.98 ± 0.06

Примечание. Уровень значимости 0.05, объем выборки 4

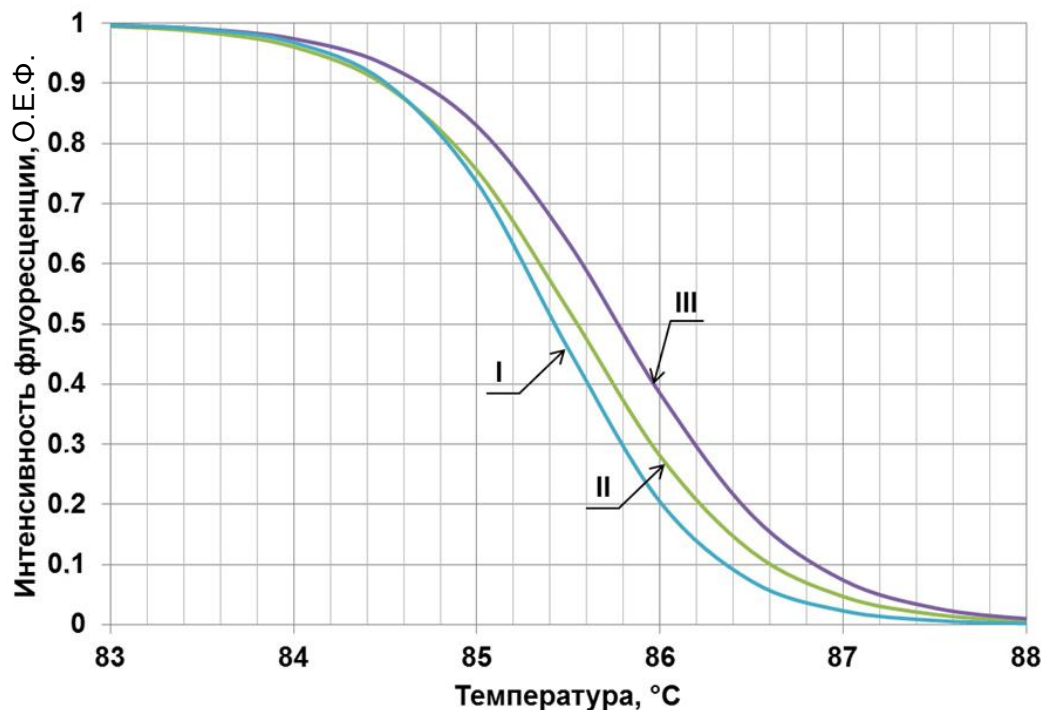


Рис. Графики плавления образца 1 по результатам первого (I), второго (II) и третьего (III) анализов

Значения температур плавления образцов были определены путем применения методики на основе СФ [7]. В табл. 1 приведены средние значения температур плавления трех образцов в трех последовательных анализах.

На рисунке изображены графики плавления от одной пробирки с образцом 1, полученные в результате трех последовательных анализов после нормализации модельной функцией СФ. Графики позволяют наглядно сравнить различия значений T_m , соответствующих температуре, при которой интенсивность флуоресценции равна 0.5. Видно, что при каждом следующем анализе значение T_m увеличивается.

На основе вычисленных значений парного t -критерия Стьюдента выявлено статически значимое различие между результатами последовательных экспериментов с уровнем значимости $p < 0.05$. Эти различия не позволяют использовать повторные анализы методом плавления ДНК для увеличения их достоверности. Актуальным является определение причин изменения значений T_m образцов при повторных анализах.

ПРИЧИНЫ ИЗМЕНЕНИЯ ТЕМПЕРАТУР ПЛАВЛЕНИЯ ОБРАЗЦОВ ПРИ ПОВТОРНЫХ АНАЛИЗАХ

В соответствии с работой [12], значение T_m определяется по формуле:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \cdot \lg[\text{Na}^+] + 0.41 \cdot [G + C] - 675 / L_p, \quad (1)$$

где $[\text{Na}^+]$ — концентрация ионов натрия, моль/л.

Слагаемое $16.6 \cdot \lg [\text{Na}^+]$ включено и в другие известные модели [13, 14].

Изменение значений T_m может быть обусловлено испарением воды из анализируемой пробы. Так как значения $[G + C]$ и L_p из формулы (1) остаются постоянными, изменение значений T_m сопровождается увеличением концентрации ионов натрия $[\text{Na}^+]$.

Сравнение существующих моделей для вычисления температуры плавления ДНК показало значительное расхождение результатов применения

моделей с экспериментальными данными [15]. В статьях [16, 17] предложено применять модели, учитывающие зависимость температуры T_m только от факторов, величина которых изменяется в серии экспериментов. Авторы представили формулу (1) в виде упрощенной модели:

$$T_m = T_1 - \frac{T_2}{L_p} + 0.41 \cdot [G + C]. \quad (2)$$

Здесь значение параметра T_1 равно сумме $81.5 + 16.6 \cdot \lg([\text{Na}^+])$.

В табл. 2 приведены вычисленные параметры T_1 и различия параметров T_1 , определенных при повторных анализах. В столбце d103 находятся: значение 0.08 — это разность параметров T_1 при втором и первом анализах образца 1, значение 0.11 этой разницы при третьем и втором анализах и значение 0.19 — при третьем и первом анализах. Аналогично определены изменения параметров T_1 в столбцах d209 и d309 для образцов 2 и 3 (d209 и d309 соответственно).

Изменения параметров T_1 для образцов 1, 2 и 3 после проведения трех анализов направлены в сторону увеличения T_1 : 0.19; 0.27 и 0.26 град. соответственно. Среднее изменение температуры T_m между последовательными анализами составило 0.12 град.

Начальная концентрация натрия во всех пробах равна 0.125 моль/л, что соответствует: $16.6 \cdot \lg[0.125] = T_1 - 81.5$. Увеличение концентрации натрия на 2% вызывает увеличение параметра T_m на 0.14 град. Следовательно, испарение воды в пробирке и увеличение концентрации натрия составляют примерно 2%.

Для проверки этого предположения проанализировано изменение массы заполненных дистиллированной водой тонкостенных пробирок на 0.2 мл (SSI, США) до и после нагрева. 32 пробирки (4 стрипа по 8 шт.) заполняли дистиллированной водой по 25 мкл, закрывали крышки и выдерживали в эксикаторе для удаления мелких капель воды с внешней поверхности пробирок. Нагрев проводили в АНК-32 по программе плавления от 70 °C до 95 °C с шагом 0.5 град. и продолжительностью 30 с на каждой температуре. Взвешивание до и после нагрева, а также до и после заполнения водой

Табл. 2. Различия параметров T_1 при проведении повторных анализов (°C)

№ анализа	103	d103	209	d209	309	d309
1	69.09	0.08	69.83	0.12	69.15	0.13
2	69.20	0.11	69.95	0.16	69.28	0.13
3	69.28	0.19	70.11	0.27	69.41	0.26

(для определения суммарной массы воды) проводили на аналитических весах высшего I специального класса точности (ЗАО "САРТОГОСМ", Россия), дискретность измерений которых составляет $d = 0.1$ мг, предельно допустимая погрешность $e = 1$ мг.

Эксперимент проводили на трех сериях образцов. Итоговое изменение массы 32 пробирок после нагрева составило 6.0 ± 0.5 мг ($n = 3$), что соответствовало $0.8 \pm 0.1\%$ от общей массы воды в пробирках.

Чтобы удостовериться, что полученный результат действительно связан с испарением воды через закрытую крышку пробирки, дополнительную серию из 32 пробирок заполнили водой с минеральным маслом (25 мкл воды и 15 мкл масла). Изменение массы таких пробирок после нагрева было сопоставимо с погрешностью весов и составило 0.5 мкл (0.06% от расчетной массы воды).

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ НАТРИЯ

В соответствии с формулой (1) при неизменных параметрах $[G + C]$ и L_p изменение температуры плавления образца определяется следующим образом:

$$\Delta T_m = 16.6 \cdot \lg(\Delta[\text{Na}^+]), \quad (3)$$

где $\Delta[\text{Na}^+]$ — изменение концентрации ионов натрия в пробе.

Отсюда:

$$\Delta[\text{Na}^+] = (10^{\frac{\Delta T_m}{16.6}} - 1) \cdot 100\%. \quad (4)$$

Долю испарившейся воды $\Delta V_{\text{H}_2\text{O}}$ можно оценить по следующей формуле:

$$\Delta V_{\text{H}_2\text{O}} = \left(1 - \frac{V_{\text{H}_2\text{O}}}{10^{\frac{\Delta T_m}{16.6}}}\right) \cdot 100\%. \quad (5)$$

С помощью формул (4) и (5) можно более точно оценить значения $\Delta[\text{Na}^+]$ и $\Delta V_{\text{H}_2\text{O}}$, соответствующие среднему изменению температуры T_m на 0.12 град. в проведенной серии экспериментов: $\Delta[\text{Na}^+] = 1.68\%$, $\Delta V_{\text{H}_2\text{O}} = 1.65\%$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование повторных анализов методом плавления ДНК для увеличения их достоверности, а именно уменьшения погрешности температуры плавления ДНК T_m , затруднено вследствие изме-

нения значений T_m с каждым повтором. Для успешного использования описанного подхода необходимо предотвратить процесс испарения воды из пробы, однако полностью исключить испарение является сложной задачей [18].

В проведенной серии экспериментов выявлено среднее увеличение значений T_m на 0.12 град., что объясняется увеличением концентрации ионов натрия на 1.68% и уменьшением объема воды на 1.65%. Изменение массы 32 пробирок с водой в результате теплового режима, аналогичного анализу методом плавления, составило $0.8 \pm 0.1\%$ от общей массы воды в пробирках, что частично подтверждает предположение.

Выявление различных температур плавления образцов может использоваться для оценки количества испарившейся воды в емкостях, где оценка другими способами, как путем измерения массы пробы, затруднена или невозможна. Примером таких емкостей являются микрофлюидные чипы.

Работа выполнена в ИАП РАН в рамках государственного задания № 075-00761-22-00 Министерства науки и высшего образования РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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, is. 2. P. 154–160. DOI: 10.1006/abio.1996.9916
2. Montgomery J.L., Sanford L.N., Wittwer C.T. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics // *Expert Rev Mol Diagn.* 2010. Vol. 10, is. 2. P. 219–240. DOI: 10.1586/erm.09.84
3. Wright T.A., Stewart J.M., Page R.C., Konkolewicz D. Extraction of thermodynamic parameters of protein unfolding using parallelized differential scanning fluorimetry // *J Phys Chem Lett.* 2017. Vol. 8, is. 3. P. 553–558. DOI: 10.1021/acs.jpcclett.6b02894
4. Веденов А.А., Дыхне А.М., Франк-Каменецкий М.Д. Переход спираль – клубок в ДНК // *Успехи физических наук.* 1971. Т. 105, № 11. С. 479–519. DOI: 10.3367/UFNr.0105.197111d.0479
5. Pholwat S., Liu J., Stroup S. et al. Integrated microfluidic card with TaqMan probes and high-resolution melt analysis to detect tuberculosis drug resistance mutations across 10 genes // *mBio.* 2015. Vol. 6, is. 2. e02273. DOI: 10.1128/mBio.02273-14
6. Альдекеева А.С., Белов Д.А., Белов Ю.В., Широкоград А.Л. Разработка экспериментальной версии программного обеспечения на основе новой методики определения температуры плавления ДНК // *Научное приборостроение.* 2019. Т. 29, № 2. С. 22–29. DOI: 10.18358/np-29-2-i2229
7. Белов Д.А., Корнева Н.А., Альдекеева А.С., Белов Ю.В., Киселев И.Г. Повышение разрешающей способности генетических анализаторов при определении температуры плавления ДНК // *Научное приборостроение.*

2016. Т. 26, № 2. С. 17–22.
URL: <http://213.170.69.26/mag/2016/abst2.php#abst2>
8. Wittwer C.T., Reed G.H., Gundry C.N., Vandersteen J.G., Pryor R.J. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen // *Clinical Chemistry*. 2003. Vol. 49, is. 6. P. 853–860. DOI: 10.1373/49.6.853
 9. Gundry C.N., Vandersteen J.G., Reed G.H., et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: A closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes // *Clinical Chemistry*. 2003. Vol. 49, is. 3. P. 396–406. DOI: 10.1373/49.3.396
 10. Herrmann M., Durtschi J., Bromley L., Wittwer C., Voelkerding K. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: Cross-platform comparison of instruments and dyes // *Clinical chemistry*. 2006. Vol. 52, is. 3. P. 494–503. DOI: 10.1373/clinchem.2005.063438
 11. Press W.H., Teukolsky S.A., Vetterling W.T., Flannery B.P. Numerical recipes in C. 2nd ed., 1992. Cambridge University Press, New York. 994 p.
 12. Календарь Р.Н., Сиволан Ю.М. Полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами // *Biopolymers and cell*. 1995. Т. 11, № 3-4. С. 55–65. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=23336409>
 13. Howley P.M., Israel M.F., Law M.-F., Martin M.A. A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs. Evaluation of polyomavirus genomes // *J. Biol. Chem*. 1979. Vol. 254, is. 11. P. 4876–4883. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)30093-5
 14. SantaLucia J., Allawi H.T., Seneviratne P.A. Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability // *Biochemistry*. 1996. Vol. 35, is. 11. P. 3555–3562. DOI: 10.1021/bi951907q
 15. Panjkovich A., Melo F. Comparison of different melting temperature calculation methods for short DNA sequences // *Bioinformatics*. 2005. Vol. 21, is. 6. P. 711–722. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti066
 16. Курочкин В.Е., Белов Д.А., Белов Ю.В., Зубик А.Н. Определение модельных констант при вычислении температуры плавления ДНК // *Научное приборостроение*. 2020. Т. 30, № 2. С. 10–16. DOI: 10.18358/np-30-2-i1016
 17. Belov D.A., Belov Yu.V., Kiselev I.G. Modeling of the DNA melting point dependence on various analysis factors // *IEEE 2020 International Multi-Conference on Industrial Engineering and Modern Technologies (FarEastCon)*. 2020. P. 1–3. DOI: 10.1109/FarEastCon50210.2020.9271634
 18. Polini A., Mele E., Sciancalepore A.G., et al. Reduction of water evaporation in polymerase chain reaction microfluidic devices based on oscillating-flow // *Biomicrofluidics*. 2010. Vol. 4, is. 3. Id. 036502. DOI: 10.1063/1.3481776

**Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург**

Контакты: Белов Дмитрий Анатольевич,
onoff_10@mail.ru

Материал поступил в редакцию 30.09.2022

INCREASING THE DNA MELTING METHOD VALIDITY BY RE-ANALYSIS IMPLEMENTATION

D. A. Belov, Yu. V. Belov, A. N. Zubik, V. E. Kurochkin

Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint Petersburg, Russia

The article explores the possibility of using repeated analyses based on the DNA melting method to increase their validity, namely, to reduce the error in determining the DNA melting temperature T_m . A statistically significant difference in the T_m values of the analyzed samples in successive analyses was experimentally revealed, which prevents the validity from increasing. It is shown that an increase in the temperature T_m on average by 0.12 deg. in the series of experiments is due to the evaporation of 1.65% of water from the test tube. A change in mass by $0.8 \pm 0.1\%$ of the total mass of water in test tubes was experimentally revealed as a result of a thermal regime similar to the analysis by the melting method, which partially confirms the assumption. It is recommended to take this effect into account during re-analyses using the DNA melting method and to implement measures that prevent water evaporation. Analytical expressions are given for the relative assessment of the sodium ion concentration changes and the water volume in the sample.

Keywords: DNA melting, HRMA, evaporation

INTRODUCTION

The modern method of DNA melting is performed after polymerase chain reaction in real time (qPCR) on qPCR machines while intercalating dyes are used to generate a fluorescent signal, the molecules of which are attached to the DNA double strand. The fluorescence intensity decreases and dye molecules separate as the temperature rises because of the progressive splitting of the DNA double strand into two single strand molecules [1].

DNA melting curves (MCs) represent the fluorescent response of a sample versus temperature and differ in shape and melting temperature value T_m , allowing for the determination of differences in DNA fragments by composition, length, and methylation status, and application of the method in a variety of applied tasks such as genomic scanning, genotyping, sequence matching, and epigenetic studies [2].

The T_m value corresponds to the temperature at which 50% of nucleotides in DNA molecules lose hydrogen bonds [3], and is traditionally defined as the coordinate of the MC inflection point, which corresponds to the maximum value of the negative MC derivative [4]. In a number of tasks, high accuracy in temperature T_m determination is required. For example, for reliable genotyping of *M. tuberculosis* strains, it is necessary to identify differences in T_m values of less than 0.1 deg. [5].

In order to reduce the error in measuring the temperature T_m , well-known techniques are used based on filtering and/or approximating the MC with various continuous functions, for example, a polynomial of the third degree in a limited range of temperature

changes, as in the ANK_Melting software program [6], or the improved sigmoid function (SF) [7]. In articles [8–10], it is recommended to perform numerical differentiation of MC using Savitzky-Golay polynomials of the second degree at each point [11] after preliminary normalization.

The DNA melting method is non-destructive, so one of the additional ways to increase the reliability of the analysis results is to repeat experiments to accumulate statistics. This article discusses the possibility of applying such an approach.

PREPARATION AND PROCESSING OF INPUT DATA

To obtain the initial data, DNA fusion analysis of three known samples of cytokeratin (CK-19) amplicons was performed three times on an ANK-32 nucleic acid analyzer (Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Russia). Amplicons were obtained as a result of 50 cycles of qPCR with SYBR Green I intercalating dye (PCR-Mix M-427, Sintol LLC, Russia) and specially developed primers (DNK-SynteZ LLC, Russia). Samples 1, 2 and 3 in four test tubes each, were analyzed in the temperature range of 70–95 °C with 0.5 deg. steps and 30 s exposure time at each step. Samples 1, 2 and 3 have, the content of guanine and cytosine nucleotides in a DNA fragment [$G + C$] equal to 53, 59, and 58% with the length of fragments L_p equal to 103, 209, and 309 base pairs (bp). The initial concentration of sodium ions in all samples is 0.125 mol/L.

The T_m values of the samples were determined by applying the technique based on SF [7]. Tab. 1 shows

the average melting points of three samples in three consecutive analyses.

Tab. 1. Melting temperature values of samples, °C

Fig. shows MCs obtained using one tube with sample 1, as a result of three consecutive analyses after normalization with the model function SF. The graphs make it possible to visually compare the differences in the T_m values corresponding to the temperature at which the fluorescence intensity is 0.5. The T_m value increases with each subsequent analysis.

Fig. Melting curves of sample 1 as a result of the first (I), second (II) and third (III) analyses

Based on the calculated values of the paired Student's t-test, a statistically significant difference was found between the results of consecutive experiments with a significance level of $p < 0.05$. These differences preclude the use of repeated DNA melting assays to increase their validity. It is important to determine the reasons for the change in the T_m values of the samples during re-analyses.

REASONS FOR THE MELTING TEMPERATURE VALUES SHIFT

In accordance with [12], the value T_m is determined by the formula:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \cdot \lg[\text{Na}^+] + 0.41 \cdot [G + C] - 675 / L_p, \quad (1)$$

where $[\text{Na}^+]$ is the concentration of sodium ions, mol/L.

The term $16.6 \cdot \lg[\text{Na}^+]$ is also included in other known models [13, 14].

The change in T_m values may be due to water evaporation from the analyzed sample. Since the values of $[G + C]$ and L_p from formula (1) remain constant, the change in the values of T_m is accompanied by an increase in the concentration of sodium ions $[\text{Na}^+]$.

A comparison of existing models for calculating the DNA melting temperature showed a significant discrepancy between the results of applying the models and experimental data [15]. Models that take into account the dependence of the temperature T_m only on factors whose magnitude changed in a series of experiments were proposed [16, 17]. The authors presented formula (1) as a simplified model:

$$T_m = T_1 - \frac{T_2}{L_p} + 0.41 \cdot [G + C]. \quad (2)$$

Here, the value of the parameter T_1 is equal to the sum of $81.5 + 16.6 \cdot \lg([\text{Na}^+])$.

Tab. 2 shows the calculated parameters T_1 and the differences in parameters T_1 determined from the repeated analyses. Column d103 contains: a value of 0.08 is the difference of parameters T_1 for the second and first analyses of sample 1, a difference value of 0.11 for the third and second analyses, and a value of 0.19 for the third and first analyses. Changes in parameters T_1 in columns d209 and d309 for samples 2 and 3 (d209 and d309, respectively) are determined similarly.

Tab. 2. Differences in parameters T_1 during re-analyses, deg.

The change in T_1 parameters for samples 1, 2 and 3 after three analyses is directed towards increasing: 0.19; 0.27, and 0.26 deg. respectively. The average change in temperature T_m between successive analyses was 0.12 deg.

In all samples, the initial sodium concentration is 0.125mol/L, which corresponds to $16.6 \cdot \lg[0.125] = T_1 - 81.5$. An increase in sodium concentration of 2% causes an increase in the parameter T_m of 0.14 deg. Therefore, water evaporation in the test tube and the increase in sodium concentration are about 2%.

To test this assumption, we analyzed the change in the mass of thin-walled test tubes per 0.2 ml (SSI, USA) filled with distilled water before and after heating. 32 test tubes (4 strips of 8 pcs.) were filled with distilled water, 25 μl each, the lids were closed and the tubes were kept in a desiccator to remove small drops of water from the outer surface. Heating was performed in ANK-32 according to the melting program from 70 °C to 95 °C in 0.5 deg. steps lasting 30 s each. Weighing before and after heating, as well as before and after filling with water (to determine the total mass of water), was carried out on an analytical balance of the highest special accuracy class I (SARTOGOSM, Russia), the measurement discreteness of which is $d = 0.1$ mg, the maximum permissible error is $e = 1$ mg.

The experiment was performed on three sets of samples. The final change in the weight of 32 test tubes after heating was 6.0 ± 0.5 mg ($n = 3$), which corresponded to $0.8 \pm 0.1\%$ of the total weight of water in the test tubes.

To make sure that the result obtained is really due to the evaporation of water through the closed cap of the test tube, an additional series of 32 tubes was filled with water and mineral oil (25 μl of water and 15 μl of oil). The change in the mass of such test tubes

after heating was comparable with the error of the scales and amounted to 0.5 μL (0.06% of the calculated mass of water).

CALCULATION OF THE SODIUM IONS CONCENTRATION CHANGES

According to formula (1), with constant parameters $[G + C]$ and L_p , the change in the sample melting point is determined as follows:

$$\Delta T_m = 16.6 \cdot \lg(\Delta[\text{Na}^+]), \quad (3)$$

where $\Delta[\text{Na}^+]$ is the change in the concentration of sodium ions in the sample.

Thus:

$$\Delta[\text{Na}^+] = (10^{\frac{\Delta T_m}{16.6}} - 1) \cdot 100\%. \quad (4)$$

The proportion of evaporated water $\Delta V_{\text{H}_2\text{O}}$ can be estimated using the following formula:

$$\Delta V_{\text{H}_2\text{O}} = (1 - \frac{V_{\text{H}_2\text{O}}}{10^{\frac{\Delta T_m}{16.6}}}) \cdot 100\%. \quad (5)$$

Using formulas (4) and (5), one can more accurately estimate the values of $\Delta[\text{Na}^+]$ and $\Delta V_{\text{H}_2\text{O}}$ corresponding to the average change in temperature T_m of 0.12 deg. in the conducted series of experiments: $\Delta[\text{Na}^+] = 1.68\%$, $\Delta V_{\text{H}_2\text{O}} = 1.65\%$.

CONCLUSION

The use of repeated DNA melting assays to increase their validity, namely, to reduce the error in the melting temperature of DNA T_m , is difficult due to the change in T_m values with each repetition. To successfully use the described approach, it is necessary to prevent the evaporation of water from the sample, but completely eliminating evaporation is a difficult task [18].

The series of experiments revealed an average increase in T_m values of 0.12 deg, which is explained by an increase in the concentration of sodium ions by 1.68% and a decrease in water volume by 1.65%. The change in the weight of 32 tubes with water as a result of a thermal regime similar to the melting analysis was $0.8 \pm 0.1\%$ of the total mass of water in the test tubes, which partly confirms the assumption.

The detection of differences in the melting points of samples can be used to estimate the amount of evaporated water in containers where estimation by other means, such as measuring the mass of a sample, is difficult or impossible. Microfluidic chips are an example of such containers.

REFERENCES

- 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, pp. 154–160. DOI: 10.1006/abio.1996.9916
- Montgomery J.L., Sanford L.N., Wittwer C.T. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*, 2010, vol. 10, no. 2, pp. 219–240. DOI: 10.1586/erm.09.84
- Wright T.A., Stewart J.M., Page R.C., Konkolewicz D. Extraction of thermodynamic parameters of protein unfolding using parallelized differential scanning calorimetry. *J Phys Chem Lett.*, 2017, vol. 8, no. 3, pp. 553–558. DOI: 10.1021/acs.jpcllett.6b02894
- Vedenov A.A., Dykhne A.M., Frank-Kamenetskii M.D. [The helix-coil transition in DNA]. *Uspekhi fizicheskikh nauk* [Soviet Physics Uspekhi], 1971, vol. 105, no. 11, pp. 479–519. DOI: 10.3367/UFNr.0105.197111d.0479 (In Russ.).
- Pholwat S., Liu J., Stroup S., et al. Integrated microfluidic card with TaqMan probes and high-resolution melt analysis to detect tuberculosis drug resistance mutations across 10 genes. *mBio*, 2015, vol. 6, no. 2, Id e02273. DOI: 10.1128/mBio.02273-14
- Al'dekeeva A.S., Belov D.A., Belov Yu.V., Shirokorad A.L. [Development of an experimental version of quantitative PCR analysis software]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2019, vol. 29, no. 2, pp. 22–29. DOI: 10.18358/np-29-2-i2229 (In Russ.).
- Belov D.A., Korneva N.A., Al'dekeeva A.S., Belov Yu.V., Kiselev I.G. [Genetic analyzer resolution increasing at DNA melting temperature determination]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2016, vol. 26, no. 2, pp. 17–22. DOI: 10.18358/np-26-2-i1722 (In Russ.).
- Wittwer C.T., Reed G.H., Gundry C.N., Vandersteen J.G., Pryor R.J. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry*, 2003, vol. 49, no. 6, pp. 853–860. DOI: 10.1373/49.6.853
- Gundry C.N., Vandersteen J.G., Reed G.H., et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: A closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clinical Chemistry*, 2003, vol. 49, no. 3, pp. 396–406. DOI: 10.1373/49.3.396
- Herrmann M., Durtschi J., Bromley L., Wittwer C., Voelkerding K. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: Cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clinical chemistry*, 2006, vol. 52, no. 3, pp. 494–503. DOI: 10.1373/clinchem.2005.063438
- Press W.H., Teukolsky S.A., Vetterling W.T., Flannery B.P. *Numerical recipes in C*. 2nd ed., 1992, Cambridge University Press, New York. 994 p.
- Calendar R.N., Syvolap Yu.M. [Polymerase chain reaction with arbitrary primers]. *Biopolymers and cell*, 1995, vol. 11, no. 3-4, pp. 55–65. (In Russ.). URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=23336409>
- Howley P.M., Israel M.F., Law M.-F., Martin M.A. A rapid method for detecting and mapping homology

- between heterologous DNAs. Evaluation of polyomavirus genomes. *J. Biol. Chem.*, 1979, vol. 254, no. 11, pp. 4876–4883. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)30093-5
14. SantaLucia J., Allawi H.T., Seneviratne P.A. Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability. *Biochemistry*, 1996, vol. 35, no. 11, pp. 3555–3562. DOI: 10.1021/bi951907q
 15. Panjkovich A., Melo F. Comparison of different melting temperature calculation methods for short DNA sequences. *Bioinformatics*, 2005, vol. 21, no. 6, pp. 711–722. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti066
 16. Kurochkin V.E., Belov D.A., Belov Yu.V., Zubik A.N. [Model constants determination in the DNA melting temperature calculating]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2020, vol. 30, no. 2, pp. 10–16. DOI: 10.18358/np-30-2-i1016 (In Russ.).
 17. Belov D.A., Belov Yu.V., Kiselev I.G. Modeling of the DNA melting point dependence on various analysis factors. *IEEE 2020 International Multi-Conference on Industrial Engineering and Modern Technologies (FarEastCon)*, 2020, pp. 1–3. (In Russ.). DOI: 10.1109/FarEastCon50210.2020.9271634
 18. Polini A., Mele E., Sciancalepore A.G., et al. Reduction of water evaporation in polymerase chain reaction microfluidic devices based on oscillating-flow. *Biomicrofluidics*, 2010, vol. 4, no. 3. Id 036502. DOI: 10.1063/1.3481776

Contacts: *Belov Dmitriy Anatol'evich*,
onoff_10@mail.ru

Article received by the editorial office on 30.09.2022