

High resolution melting analysis on temperature allows the genotype determination of indicators related to beef¹

El análisis de alta resolución en la temperatura de disociación permite genotipificación de marcadores relacionados con la carne de bovino¹

L. E. López Rojas^{1,2}, Laura Patiño Cadavid¹, Juliana María Martínez Garro¹, Silvana Durán Ortiz¹, Lina Johana Correa Agudelo¹, Santiago González Escudero¹, Albeiro López Herrera² and José Julián Echeverri Zuluaga²

¹Grupo Biología CES-EIA, Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES, Colombia.
Calle 10 A No. 22-4, Medellín, Colombia

²Grupo Biodiversidad y Genética Molecular "BIOGEM", Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede de Medellín
E-mail: lelopez@ces.edu.co

Some SNPs within μ -calpain (CAPN1), calpastatin (CAST) and leptin (LEP) genes have been associated to beef tenderness and, in order to optimize the processes of genetic improvement in cattle rearing farms, it is necessary to apply fast, reliable and accessible methodologies to producers, for determining the genotype of these polymorphisms. Although there are several methodologies, the HRM is stated as a promising alternative that meets these conditions. Therefore, the PCR-HRM was standardized and validated for genotyping the SNPs CAPN4751, CAPN316, CAST2959, CAST282, E2FB and E2JW of 50 animals from *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds, using PCR-RFLP as gold standard test. There was an agreement among the results obtained by PCR-HRM, compared to PCR-RFLP, and high sensitivity, specificity and appropriate negative and positive predictive values for PCR-HRM. Similarly, repeatability and reproducibility were verified after obtaining homogeneity in the intra-run and inter-run results. Although the results show that the PCR-HRM is an efficient technique, and allows to obtain reliable results in a short time, these can be affected by the extraction method, quality and quantity of DNA, among other undetermined factors that can generate false positives and atypical dissociation profiles. Therefore, these variables must be controlled and the PCR should be monitored to identify unusual dissociation curves, caused by excess or deficiency in the amplification.

Keywords: *quality, calpastatin, leptin, μ -calpain, HRM.*

Introduction

High resolution analysis of the dissociation temperature (HRM) of DNA fragments, amplified by the polymerase chain reaction (PCR), allows detecting single nucleotide polymorphisms (SNPs) (Druml and Cichna-Markl 2014), very fast and at a low cost, with high sensitivity, specificity and low contamination risk (Reed and Wittwer 2004 and Kysel'ová *et al.* 2012). PRC-HRM is possible because of the development of sensors for detecting second generation dyes, which fluoresce when they are bound to double stranded DNA (dsDNA) and used in high concentrations to ensure saturation of dsDNA without inhibiting PCR (Gudnason *et al.*, 2007). Diagnosis

Algunos SNPs presentes en los genes μ -calpaína (CAPN1), calpastatina (CAST) y leptina (LEP) han sido asociados a la terneza de la carne de bovino, y con el fin de optimizar los procesos de mejoramiento genético en ganaderías de carne, es necesario adoptar metodologías rápidas, confiables y accesibles a los productores para determinar el genotipo de estos polimorfismos. Aunque existen varias metodologías, la HRM se plantea como alternativa promisoriosa que cumple con estas condiciones. Por lo anterior, se estandarizó y validó la PCR-HRM para la genotipificación de los SNPs CAPN4751, CAPN316, el CAST2959, CAST282, E2FB y E2JW en 50 animales de razas *Bos taurus* y *Bos indicus*, utilizando la PCR-RFLP, como prueba de oro. Se observó concordancia entre los resultados obtenidos por PCR-HRM, comparado con la PCR-RFLP, y se observó alta sensibilidad, especificidad y valores predictivos negativos y positivos adecuados para la PCR-HRM. De igual manera se corroboró la repetitividad y reproducibilidad al obtener homogeneidad en los resultados intracorrida e intercorrida. Aunque los resultados muestran que la PCR-HRM es una técnica eficiente y permite obtener resultados confiables en poco tiempo, sin embargo, éstos pueden ser afectados por el método de extracción, la calidad y cantidad del DNA, entre otros factores no determinados que pueden generar perfiles de disociación atípicos y falsos positivos. Por lo anterior se deben controlar estas variables y la reacción de PCR para identificar las curvas de disociación inusuales ocasionadas por exceso o deficiencia en la amplificación.

Palabras clave: *Calidad, calpastatina, leptina, μ -calpaína, HRM.*

Introducción

El análisis de alta resolución de la temperatura de disociación (HRM) de fragmentos DNA amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) (Druml y Cichna-Markl, 2014) de manera rápida y a bajo costo, con alta sensibilidad y especificidad y bajo riesgo de contaminación (Reed y Wittwer 2004 y Kysel'ová *et al.* 2012). La PRC-HRM es posible gracias al desarrollo de sensores para la detección de colorantes de segunda generación, los cuales fluorescen cuando están unidos al DNA de doble cadena (dsDNA) y ser utilizados en altas concentraciones para asegurar la saturación del dsDNA sin inhibir la PCR (Gudnason *et al.*, 2007). El diagnóstico se

¹Paper presented at the V Congreso de Producción Animal Tropical, La Habana, Cuba, 2015

carried out by analyzing the melting temperature (T_m) and the profile of HRM, plotting the dissociation kinetics of dsDNA to single stranded DNA (ssDNA), when the temperature increases (Kristensen and Dobrovic 2008).

Therefore, taking into account the need of methodologies to improve productivity of animal husbandry sector in Colombia, the PCR-HRM was standardized and validated for determining the genotypes of SNPs related to tenderness of beef (CAPN316, CAPN4751, CAST282, CAST2959, LEP E2FB and LEP E2FW), using PCR-RFLP as gold standard test.

Materials and Methods

Supported by the Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales (CICUA) from the CES University, the total DNA of peripheral blood was obtained from 25 *Bos taurus* and 25 *Bos indicus* animals.

In order to amplify by PCR, primers were designed, which surround fragments from 58 to 144 pb that potray the CAPN4751, CAPN316, CAST282, E2FB, and E2JW SNP (table 1).

Each SNP was analyzed independently, in a reaction mixture of 25 μ L, containing 2 ng/ μ L of total DNA, 10 μ M of primers, 12.5 μ L of Master Mix HRM Genotyping PCR (QIAGEN, Hilden, Germany), diluted in water free of RNases. The amplification was performed in a Rotor-Gene 6000 thermal cycler (Corbett Life Science, Concorde, NSW, Australia), with preheating at 95 °C for 5 minutes, followed by 40 cycles, with a denaturation step at 95 °C for 10 seconds, a an annealing step, specific for each pair of primers for 30 seconds and one of elongation at 72°C for 10 seconds. The high resolution melt (HRM) profiles were built with the use of Rotor-Gene 6000 series© program (Corbett Life Science, Concorde, NSW, Australia), putting into a graph the fluorescence values, after exposing the amplified ones to a gradient with temperatures between 60 and 80 °C, which increased at a rate of 0.05 °C/s.

As gold standard test, the digestion of PCR fragments was used with restriction enzymes (PCR-RFLP) (table 1), incubated in a thermal cycler TC-512 (Techne™), according to the conditions suggested by the commercial house. Samples were exposed to gel electrophoresis of agarose type II at 1%, dyed with SYBR Green© (Promega©, Madison, Wisconsin), run at 60 V for 40 minutes, and photographed under an UV light in a Epicchemy System (UVP, Upland, CA) photo-documentation equipment.

Sensitivity, specificity, predictive value of positive test, predictive value of negative test, repeatability, reproducibility and strength of genotype discrimination with HRM, were determined using RFLP as gold test, for each analyzed SNP.

realiza analizando la temperatura de disociación (T_m) y el perfil de HRM, graficando la cinética de disociación del dsDNA a DNA de cadena sencilla (ssDNA) en la medida que aumenta la temperatura (Kristensen y Dobrovic 2008).

Por lo anterior, al tener en cuenta la necesidad de metodologías para mejorar la productividad del sector ganadero en Colombia, se estandarizó y validó la PCR-HRM para genotipificar los SNPs relacionados con la ternera de la carne de bovinos, CAPN316, CAPN4751, CAST282, CAST2959, LEP E2FB y LEP E2FW, utilizando la PCR-RFLP, como prueba de oro.

Materiales y Métodos

Con el aval del comité institucional para el uso y cuidado de los animales (CICUA) de la Universidad CES, se obtuvo el DNA total de sangre periférica de 25 animales *Bos taurus* y 25 *Bos indicus*.

Para la amplificación por PCR se diseñaron cebadores que flanquean fragmentos de 58 a 144 pb, los cuales portan los SNP CAPN4751, CAPN316, CAST282, E2FB, y E2JW (tabla 1).

Cada SNP se analizó de manera independiente, en una mezcla de reacción de 25 μ L que contenía 2 ng/ μ L de DNA total, 10 μ M de cebadores, 12,5 μ L de Master Mix HRM Genotyping PCR (QIAGEN, Hilden, Germany), diluidos en agua libre de RNAsas. La amplificación se realizó en un termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Concorde, NSW, Australia), así: precalentamiento a 95°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos, con una etapa de desnaturalización a 95 °C por 10 segundos, una de alineamiento específica para cada par de cebadores por 30 segundos y una de extensión a 72°C por 10 segundos. Los perfiles de disociación normalizados (HRM), se construyeron utilizando el programa Rotor-Gene 6000 series© (Corbett Life Science, Concorde, NSW, Australia) graficando los valores de la fluorescencia, al someter los amplificados a un gradiente de temperatura entre 60-80°C que incrementó a una tasa de 0.05°C/s.

Como prueba de oro se utilizó la digestión de fragmentos de PCR utilizando enzimas de restricción (PCR-RFLP), (tabla 1), incubadas en un termociclador TC-512 (Techne™), de acuerdo con las condiciones sugeridas por la casa comercial. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa tipo II al 1%, teñidas con SYBR Green© (Promega©, Madison, Wisconsin), y corridas a 60 V durante 40 minutos y fotografiados bajo luz ultravioleta en un equipo de fotodocumentación Epicchemy System (UVP, Upland, CA).

Se determinó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo de la prueba positiva, valor predictivo de la prueba negativa, repetitividad, reproducibilidad y robustez de la genotipificación con HRM, utilizando RFLP como prueba de oro, para cada uno de los SNP analizados.

Table 1. Sequences of primers and temperatures of theoretical alignments, size of the amplifications and expected digestion products.

Genes	BTA	SNPs	GenBank	Base	Primers	Tm (°C)	Ampl (pb)	PCR-RFLP (pb)	Enzyme	
CAPN1	29	CAPN316	AF248054	5709	F: TAGAGGCTGGGCAGGTCAGT	61	113	C	BtgI	
					R: CATCTTGACCCCGGAGCTGCT	60		G	113	
CAST	7	CAST282	AF248054	6545	F: AGTTCCCTCCCTGGCATCCTC	60	102	C	DdeI	
					R: CAGCCTTAGGGTCACCTGTAG	58		T	54.40	
		CAST2959	AF159246	2959	F: TGCTGAATTTGGGAAGGAAG	58	58	C	65	Csp6I
					R: TGTGACAAAATTCACCTTTGGG	58		G	42.23	
LEP	4	E2FB	AF120500	73	F: TTCTCATGACCCCTTTCCTC	60	65	A	DdeI	
					R: CAAACCCAAAGAAACATCAAACA	58		G	58	
		E2JW	AY138588	252	F: ATGCGCTGTGGACCCCTGTATC	61	144	T	74.70	HpyCH4V
					R: CGTGTGTGAGATGTCATTGAT	60		C	144	
					F: AAGGAAAATGCGGTGTGGA	56	73	T	Bsu15I	
					R: CACAGCCTCCACGTAAGACT	58		A	45.28	

Results and Discussion

The efficiency of PCR-HRM was verified after comparing it with PCR-RFLP, and the SNPs genotype was determined (CAPN4751, CAPN316, el CAST2959, CAST282, E2FB and E2JW) in 50 *Bos taurus* and *Bos indicus* animals.

All genotyped samples, with PCR-RFLP, showed bands with the expected size in the amplification, after digestion of bovine genome fragments that carried CC genotypes of CAST282 and TT of E2FW.

Using PCR-HRM the differences between heterozygote and homozygote genotypes were demonstrated using the melting profile, evidenced in the normalized fluorescence curve, regarding the temperature (figure 1 A, C, G and I). On the other hand, homozygote genotypes were differentiated using a graph with normalized fluorescence, regarding temperature, in which a genotype was used as normalizer (figure 1. B, D, F, H, J, L) and based on melting temperature (T_m).

The SNP can be classified according to the type of homoduplex (A/T and G/C) or heteroduplex (A/G, A/C, T/C and T/G), which are produced after the amplification of a heterozygote (Liew 2004). Group 1 includes C/T and A/G transitions, with CAPN4751 and E2FB, presented by C/T, and CAST2959 with G/A. Group 2 shows C/A and G/T transversions and group 3 is C/G transversion, which includes CAPN316 and CAST282. Finally, group 4 is T/A transversion that classifies E2FW. SNP from group three and four were the most complex to differentiate, theoretically, there would be similar T_m values for heterozygote and homozygote due to the same pair of bases (C/G or T/A). Nevertheless, the HRM allows to differentiate them efficiently, as it was verified in this study.

There was an agreement among the results obtained by PCR-HRM, compared to PCR-RFLP. This previous fact demonstrates high sensitivity, specificity and proper positive and negative predictive values for PCR-HRM. Likewise, repeatability and reproducibility were demonstrated after obtaining homogeneity in the intra-run and inter-run results. The best results were reached with the use of HRM and amplification reaction conditions, described in the methodology. However, after evaluating the strength of the test, effect of the analyst skill was evident because variables like amount of DNA and reaction volume may affect the results.

The previous information confirms the efficiency of PCR-HRM as a promising molecular tool for determining the genotype of SNPs because of its high sensitivity, specificity and strength, similar to the suggestions of other researchers (Krypuy *et al.* 2006, Davoli *et al.* 2012 and Druml and Cichna-Markl 2014).

Resultados y Discusión

Se corroboró la eficiencia de la PCR-HRM al compararla con la PCR-RFLP y se logró determinar el genotipo de los SNPs: CAPN4751, CAPN316, el CAST2959, CAST282, E2FB y E2JW en 50 animales de razas *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Todas las muestras genotificadas usando la PCR-RFLP presentaron las bandas del tamaño esperado en la amplificación y luego de la digestión de los fragmentos del genoma de bovino portadores de los SNPs en estudio (tabla 1). En la población evaluada se encontraron todos los genotipos de los SNPs CAPN4751, CAPN316, CAST2959 y E2FB, mientras que no se presentaron individuos portadores de los genotipos CC de CAST282 y TT de E2FW.

Con la PCR-HRM se diferenciaron los genotipos heterocigóticos de los homocigóticos utilizando el perfil de disociación evidenciado en la curva de fluorescencia normalizada con respecto a la temperatura (figura 1. A, C, G, I). Por su parte, los genotipos homocigóticos se discriminaron graficando la fluorescencia normalizada con respecto a la temperatura en el cual se utilizó un genotipo como normalizador (figura 1. B, D, F, H, J, L) y basado en la temperatura de disociación (T_m).

Los SNP se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de homoduplex (A/T y G/C) o heteroduplex (A/G, A/C, T/C y T/G) que se producen después de la amplificación de un heterocigoto (Liew 2004). En la clase uno se encuentran las transiciones C/T y A/G, en esta están CAPN4751 y E2FB que presentan C/T y CAST2959 con G/A; en la clase dos están las transversiones C/A y G/T; la clase tres es la transversión C/G, en la que se encuentran CAPN316 y CAST282, y la clase cuatro es la transversión T/A donde se clasifica E2FW. Los SNP de clase tres y cuatro fueron los más complejos de discriminar, puesto que en teoría se tendrían valores de T_m similares, tanto en los heterocigotos, como en los homocigotos, dado que se trata del mismo par de bases (C/G o T/A), no obstante la HRM permite discriminarlos de manera eficiente, como se pudo verificar en el presente trabajo.

Se observó concordancia entre los resultados obtenidos por PCR-HRM, comparado con la PCR-RFLP, lo anterior demuestra alta sensibilidad, especificidad y valores predictivos negativos y positivos adecuados para la PCR-HRM. De igual manera se corroboró la repetitividad y reproducibilidad al obtener homogeneidad en los resultados intracorrida e intercorrida. Los mejores resultados se lograron al utilizar las condiciones de reacción de amplificación y HRM descritos en la metodología. No obstante al evaluar la robustez de la prueba, se evidenció el efecto de la destreza del analista, dado que variables como la cantidad de DNA y el volumen de reacción pueden afectar los resultados.

Lo anterior confirma la eficiencia de la PCR-HRM como una herramienta molecular promisoría para la genotificación de SNPs dada su alta sensibilidad,

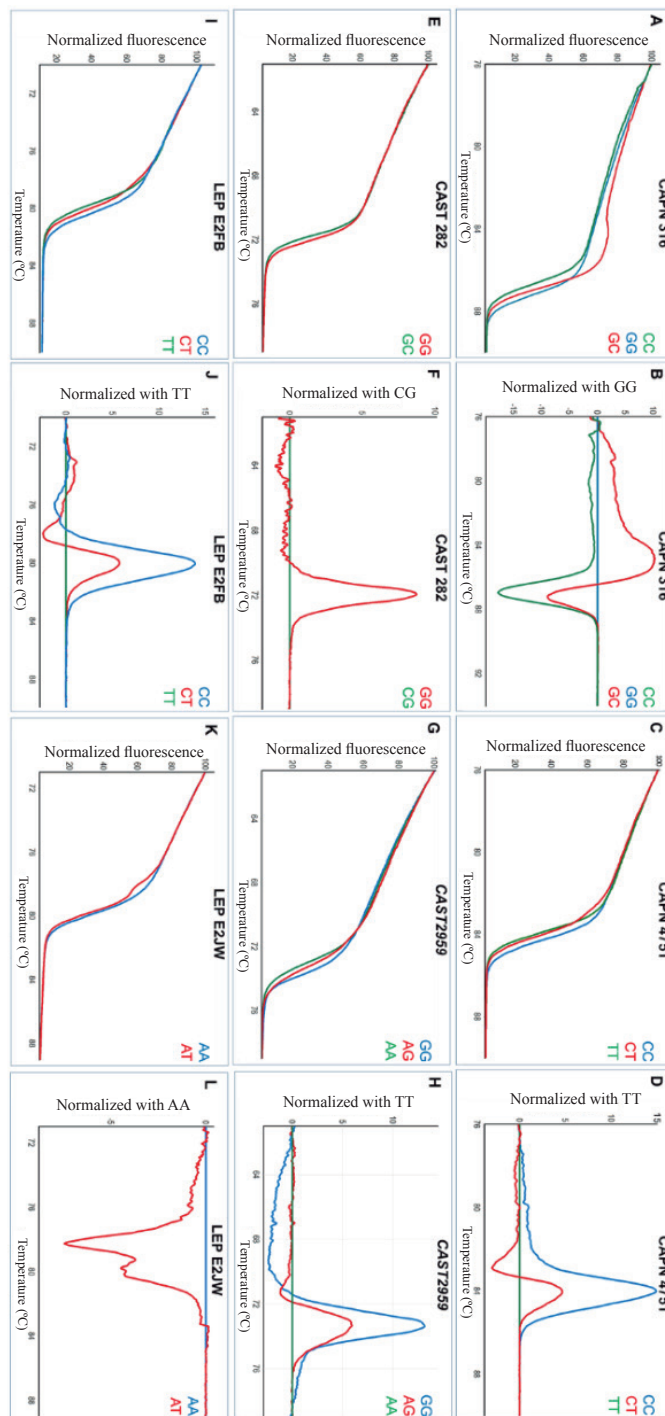


Figure 1. Graphs of normalized HRM of genotyped SNPs (A, C, E, G, I, K) Normalized HRM curves (B, D, F, H, J, L) Graphs of normalized SNPs with a genotype as reference. Y axis: normalized fluorescence and X axis: temperature (°C).

Conclusions

The potential of PCR-HRM was confirmed for determining genotype of SNPs CAPN4751, CAPN316, el CAST2959, CAST282, E2FB and E2JW, determining the genotype on 50 *Bos taurus* and *Bos indicus* animals. In all the samples evaluated by this technique, there was confirmation of the genotypes observed when using PCR-RFLP and sequencing, and 100% of sensitivity and specificity besides absence of false negative and false positive.

Results demonstrate that PCR-HRM is an efficient technique that allows to obtain reliable results in short

especificidad, y robustez, similar a lo sugerido por otras investigaciones (Krypuy *et al.* 2006, Davoli *et al.* 2012 y Druml y Cichna-Markl 2014).

Conclusiones

Se corroboró el potencial de la PCR-HRM para la genotipificación de los SNPs CAPN4751, CAPN316, el CAST2959, CAST282, E2FB y E2JW, lográndose determinar el genotipo en 50 animales de razas *Bos taurus* y *Bos indicus*. En todas las muestras evaluadas por esta técnica se confirmaron los genotipos observados al utilizar la PCR-RFLP y secuenciación, encontrándose 100% en la especificidad y sensibilidad, además ausencia de falsos positivos y negativos.

time. However, it may be affected by the extraction method, DNA amount and quality, among other undetermined factors that may generate atypical melting profiles and false positives (unpublished data). Therefore, these variables should be controlled and PCR reaction should be monitored in order to identify unusual dissociation curves, provoked by excess or deficiency of amplification.

Acknowledgements

The authors thank to Dirección de Gestión del Conocimiento de la Universidad CES and to Colciencias (122870048969) for financing the research project that supported the results presented in this study.

Los resultados demuestran que la PCR-HRM es una técnica eficiente, que permite obtener resultados confiables en poco tiempo. Sin embargo, puede ser afectada por el método de extracción, la calidad y cantidad del DNA, entre otros factores no determinados que pueden generar perfiles de disociación atípicos y falsos positivos (datos no mostrados). Por lo anterior se debe controlar estas variables y la reacción de PCR para identificar las curvas de disociación inusuales ocasionadas por exceso o deficiencia en la amplificación.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dirección de Gestión del Conocimiento de la Universidad CES y a Colciencias (122870048969) por el financiamiento del proyecto de investigación que soportó los resultados que se presentan en este documento.

Referencias

- Davoli, R., Braglia, S., Valastro, V., Annarratone, C., Comella, M., Zambonelli, P., Nisi, I., Gallo, M., Buttazzoni, L. & Russo, V. 2012. "Analysis of MC4R polymorphism in Italian Large White and Italian Duroc pigs: Association with carcass traits". *Meat Science*, 90 (4): 887–892, ISSN: 0309-1740, DOI: 10.1016/j.meatsci.2011.11.025.
- Druml, B. & Cichna-Markl, M. 2014. "High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis". *Food Chemistry*, 158: 245–254, ISSN: 0308-8146, DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.111.
- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D. D. & Wolff, A. 2007. "Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature". *Nucleic Acids Research*, 35 (19), p. e127, ISSN: 0305-1048, 1362-4962, DOI: 10.1093/nar/gkm671, PMID: 17897966.
- Kristensen, L. S. & Dobrovic, A. 2008. "Direct Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms in Methyl Metabolism Genes Using Probe-Free High-Resolution Melting Analysis". *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 17 (5): 1240–1247, ISSN: 1055-9965, 1538-7755, DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-07-2531, PMID: 18483346.
- Krypuy, M., 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, p. 295, ISSN: 1471-2407, DOI: 10.1186/1471-2407-6-295.
- Kysel'ová, J., Rychtářová, J., Sztankóová, Z. & Czerneková, V. 2012. "Simultaneous identification of CSN3 and LGB genotypes in cattle by high-resolution melting curve analysis". *Livestock Science*, 145 (1): 275–279, ISSN: 1871-1413, DOI: 10.1016/j.livsci.2011.12.018.
- Liew, M. 2004. "Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons". *Clinical Chemistry*, 50 (7): 1156–1164, ISSN: 0009-9147, DOI: 10.1373/clinchem.2004.032136, PMID: 15229148.
- Reed, G. H. & Wittwer, C. T. 2004. "Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis". *Clinical Chemistry*, 50 (10): 1748–1754, ISSN: 0009-9147, 1530-8561, DOI: 10.1373/clinchem.2003.029751, PMID: 15308590.

Received: June 20, 2015