

Denaturacja DNA z wysoką rozdzielczością (HRM-PCR) – metoda i jej zastosowanie

mgr inż. Damian Nikodem,
dr inż. Tomasz Cłapa✉,
dr hab. Dorota Narożna, prof.
UPP

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

https://doi.org/10.18388/pb.2021_371

✉ autor korespondujący: tomasz.clapa@up.poznan.pl

Słowa kluczowe: Denaturacja DNA z wysoką rozdzielczością, HRM-PCR, High Resolution Melting PCR, Identyfikacja gatunków

STRESZCZENIE

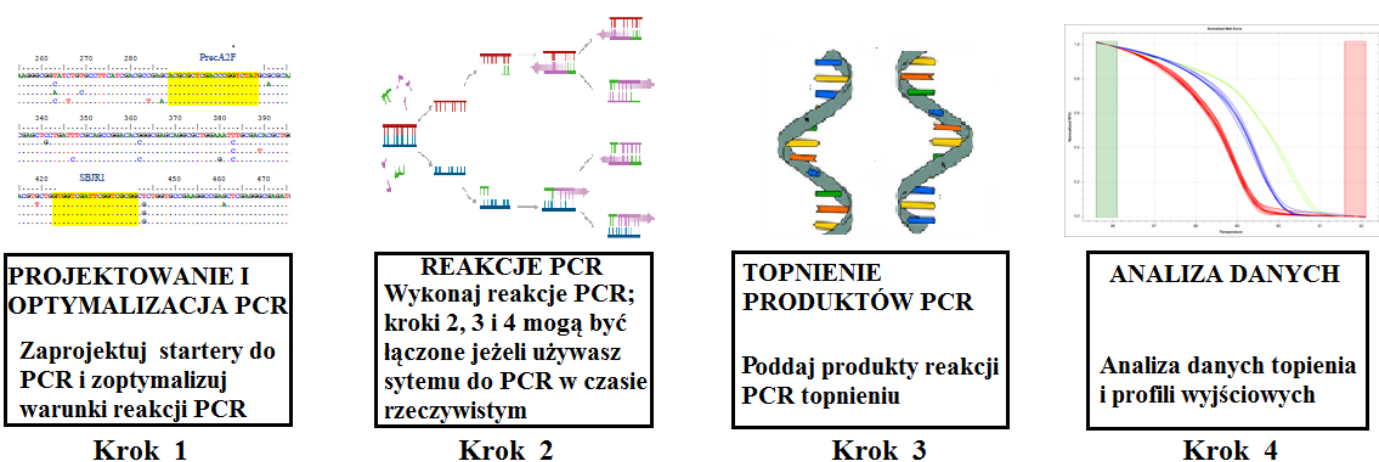
Denaturacja DNA z wysoką rozdzielczością – HRM (ang. *High Resolution Melting*) jest metodą opartą na identyfikacji różnic w denaturacji produktów reakcji PCR w obecności barwników fluorescencyjnych. Stosowana jest do wykrywania zmienności genetycznej w sekwencjach kwasów nukleinowych, w wielu gałęziach nauki, medycyny i przemysłu. Artykuł ten stanowi przegląd literatury dotyczącej metodyki, zastosowań oraz rozwoju analizy HRM, która dzięki zaletom takim jak szybkość, niski koszt, elastyczność i prostota znalazła wiele zastosowań, których spektrum wciąż się powiększa.

WPROWADZENIE

Identyfikacja gatunków jest wymagana w różnych dziedzinach, takich jak systematyka, ekologia, ochrona środowiska, ewolucja, rolnictwo, kryminalistyka, farmakologia, nauki o żywności, a nawet przemysł. Jednak liczba taksonów, które można zidentyfikować na podstawie cech morfologicznych jest ograniczona, co prowadzi do trudności w ich identyfikacji. Do pomocy w identyfikacji gatunków szeroko wykorzystywane są metody oparte na analizie kwasów nukleinowych, a wśród nich szczególne znaczenie ma denaturacja DNA z wysoką rozdzielczością – HRM (ang. *High Resolution Melting*), Ryc. 1.

OPIS METODY HRM-PCR

HRM-PCR to metoda opracowana przez Witter i in., 1997 [1], stosowana do identyfikacji zmienności genetycznej w sekwencjach kwasów nukleinowych. Ta prosta i szybka metoda oparta jest na denaturacji produktów reakcji PCR w obecności ulepszonych barwników fluorescencyjnych wiążących się z dwuniciowym DNA (dsDNA). Metoda wymaga oprzyrządowania i oprogramowania do PCR w czasie rzeczywistym [2]. Temperatury topnienia amplikonu (T_m) i specyficzne kształty krzywych topnienia zależą od komplementarności DNA, kolejności zasad DNA, zawartości G-C i długości amplikonu. Analiza HRM rozpoczyna się od reakcji PCR, w której następuje amplifikacja zdefiniowanego regionu DNA, będącego przedmiotem zainteresowania, w obecności barwnika wiążącego się z dsDNA. Barwnik ten wykazuje niski poziom fluorescencji w stanie niezwiązanym i wysoki poziom fluorescencji po związaniu z dsDNA. Kiedy dsDNA ulega denaturacji (topi się) do pojedynczych nici, barwnik jest uwalniany, co powoduje zmianę poziomu fluorescencji. Rezultatem jest krzywa topnienia charakterystyczna dla danego amplikonu. Krzywa topnienia jest generowana przez powolną denaturację (topienie) dsDNA. Fluorescencja jest wysoka, gdy barwnik jest w stanie związanym z dsDNA, w stanie niezwiązanym przechodzi do roztworu, zmienia konformację, a fluorescencja spada. W niskich temperaturach DNA będzie dwuniciowe, a barwnik będzie silnie fluoryzować. Spadek fluorescencji zaczyna się powoli, ale kiedy dwuniciowy DNA ulegnie całkowitej denaturacji do formy jednoniciowej, wykrywa się gwałtowny spadek fluorescencji (Ryc. 2A). Tempo spadku fluorescencji jest największe w pobliżu temperatury topnienia (T_m) produktu PCR. T_m definiuje się jako punkt na krzywej topnienia, gdzie 50% DNA jest dwuniciowe i 50% jest jednoniciowe (zdenaturowane). Oprogramowanie do analizy HRM definiuje T_m produktu PCR jako punkt przegięcia krzywej denaturacji. Aby zwizualizować T_m , często wykreślane są ujemne pierwsze pochodne, dzięki czemu T_m produktów PCR pojawiają się jako piki, jak widać na Ryc. 2B i 2C. HRM przykładowych produktów PCR jest pokazany na Ryc. 2D. Na krzywej pochodnej mogą również pojawić się niespecyficzne produkty, jednak mają one zwykle niższą intensywność i reprezentują produkty o mniejszej długości, pojawiają się one w niższej temperaturze niż właściwy produkt PCR. Na krzywych można również zobaczyć dimery startów i inne niespecyficzne produkty reakcji PCR, może to być przydatną miarą oceny czystości produktu PCR.



Ryc. 1. Etapy HRM-PCR.

W reakcjach HRM-PCR stosuje się barwniki fluorescencyjne interkalujące z DNA, które są komercyjnie dostępne:

- **SYTO Dye** - wykazuje duże wzmocnienie poziomu fluorescencji, podczas wiązania się z dwuniciowym DNA,
- **Chromofy** - jest monomerycznym asymetrycznym barwnikiem cyjaninowym. Kiedy chromofy wiąże się z dwuniciowym DNA, wykazuje bardzo silny wzrost fluorescencji. Chromofy może być używany do analizy HRM pod kątem SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*),
- **LC Green** są specjalnie zaprojektowane do analizy HRM w celu wykrywania różnych wariantów sekwencji DNA,
- **EvaGreen**, zielony fluorescencyjny barwnik szeroko stosowany do analizy HRM.

ZASTOSOWANIE HRM-PCR

Metoda HRM jest obecnie stosowana głównie do wykrywania SNP, mozaicyzmu genetycznego, potwierdzania wariantu liczby kopii oraz jako alternatywa dla elektroforezy żelowej [3]. Ponadto HRM jest szeroko stosowany do identyfikacji podgatunków i pokrewnych gatunków roślin [4], grzybów [5], *Phytophthora* spp. - glony [6], nicieni [7,8], *Cyjanobakterii* [9], bakterii [10-12].

GENOTYPOWANIE SNP, MAPOWANIE DNA ORAZ SKANOWANIE MUTACJI

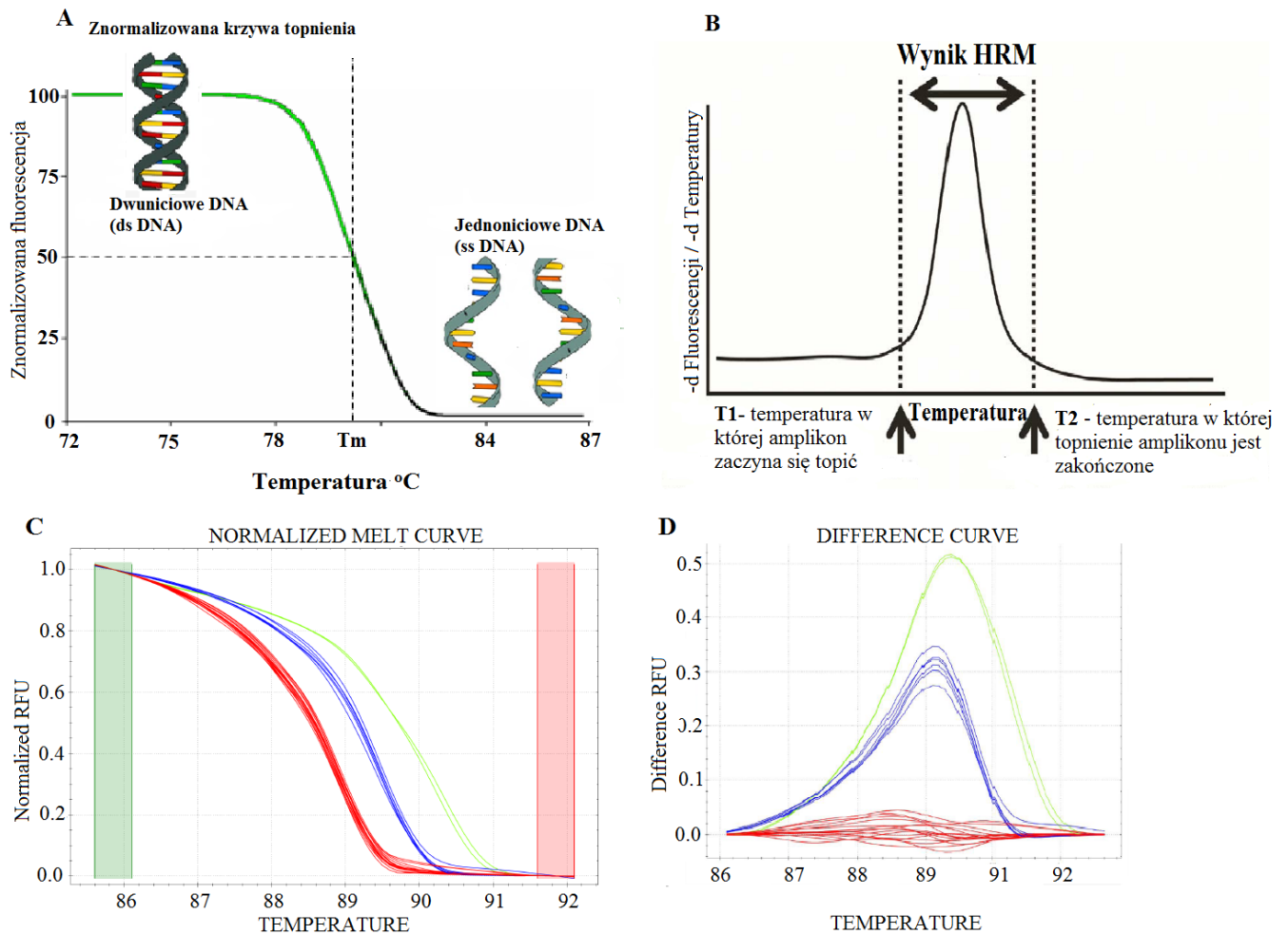
Genotypowanie SNP, jak również skanowanie mutacji z wykorzystaniem techniki HRM-PCR opiera się na różnicach w temperaturze topnienia. Zawartość par GC oraz długość fragmentu wpływają na zmianę tej temperatury. Krótkie amplikony pozwalają na lepsze rozróżnienie niewielkich zmian w sekwencji, takich jak różnice w pojedynczych nukleotydach. Fragmenty te powinny zawierać od 38 do 50 par zasad (pz), co zapewnia prawidłowe różnicowanie genotypów. Wykorzystanie krótkich amplikonów do genotypowania pozwala na lepsze projektowanie starterów, gdyż znajdują się one bardzo blisko miejsca zawierającego SNP. Podczas gdy długość produktów reak-

cji PCR jest mniejsza, różnica pomiędzy temperaturą topnienia względem genotypów jest zwiększona, pozwalając na dokładniejsze różnicowanie badanych próbek. Konsekwencją tego jest możliwość skrócenia czasu trwania reakcji, ze względu na niższą temperaturę topnienia stosowaną podczas denaturacji.

Genotypowanie SNP z wykorzystaniem techniki HRM-PCR można również stosować dla dłuższych amplikonów (zawierających od 160 do 218 pz). Takie podejście zostało wykorzystane do analizy ludzkich antygenów. Homozygota typu dzikiego oraz homozygota zawierająca mutację podlegały zróżnicowaniu w zakresie temperatur od 0,3 do 1°C, podczas gdy heterozygoty były łatwo rozpoznawalne na podstawie kształtu krzywej topnienia [3,13].

Wykorzystanie nieznakowanych sond w reakcji HRM-PCR pozwala na wykonanie jednocześnie w tej samej reakcji genotypowania oraz mapowania DNA. Zarówno temperatury topnienia produktów reakcji PCR jak i sond analizowane są w obecności nasycającego barwnika DNA. Oprócz badań przesiewowych pod kątem dowolnych wariacji sekwencji, można badać polimorfizm, czy występujące mutacje. Ponadto, obiektywne, hierarchiczne grupowanie może dokładnie grupować krzywe topnienia w genotypy. Jedna, dwie lub więcej nieznakowanych sond może być użytych w pojedynczej reakcji PCR [14,15].

Możliwość skanowania genów za pomocą HRM stanowi atrakcyjną technikę dla laboratoriów z ograniczeniami czasowymi i zasobowymi. Staranne projektowanie i optymalizacja umożliwiają wykonanie skanowania genów w mniej niż 8 godzin, a większość sekwencjonowania zostaje wyeliminowana poprzez identyfikację sekwencji i regionów kodujących różnych sekwencji. Ponieważ dokładność skanowania zależy od wysokiej jakości reakcji PCR, optymalizacja reakcji jest punktem krytycznym. Sukces optymalizacji często zależy od dobrego zaprojektowania doświadczenia, jak również znajomości sekwencji samego genu poddanego analizie [16].



Ryc. 2. Krzywe topnienia ampliconu DNA. A - Znormalizowana krzywa topnienia; B, C - Piki topnienia przykładowych produktów PCR; D - HRM przykładowych produktów PCR

IDENTYFIKACJA GATUNKU, BAR-HRM

Bar-HRM (ang. *Barcode DNA-HRM*, Kod Kreskowy Dna W Połączeniu z HRM), który został opracowany około dekadę temu, opiera się na krótkich, standaryzowanych regionach genomu, w celu identyfikacji gatunków roślin i zwierząt [17]. Metodę tę można wykorzystać nie tylko do identyfikacji znanych gatunków, ale także do odkrywania nowych. Liczne sekwencje są przechowywane w internetowych bazach danych na całym świecie. Jednym ze sposobów zaoszczędzenia kosztów i czasu (poprzez pominięcie etapu sekwencjonowania) w identyfikacji gatunków jest wykorzystanie dostępnych danych z kodu kreskowego do zaprojektowania zoptymalizowanych starterów do dalszej analizy, takiej jak analiza HRM. Metoda Bar-HRM znalazła zastosowanie do identyfikacji gatunków, które mają podobne zewnętrzne cechy morfologiczne, zamiast przeprowadzania tradycyjnej identyfikacji taksonomicznej, która wymaga głównych organów (np. liście, kwiaty, owoce). W przypadku roślin można wykorzystać pary starterów pochodzące z regionów chloroplastów (matK, psbA-trnH, rbcL i trnL). Niektóre z tych par starterów okazały się pomocne w identyfikacji osobników na poziomie gatunku, np. para starterów psbA-trnH okazała się przydatna do rozróż-

nienia *Uvaria longipes* i *Uvaria wrayias*, roślin okrytonasiennych z rzędu magnoliowców [18].

WYKRYWANIE METYLACJI DNA Z WYKORZYSTANIEM METODY MS-HRM

MS-HRM (ang. *Methylation-Sensitive High Resolution Melting*) jest czułą i specyficzną metodą wykrywania metylacji. Metylowany i niemetylowany DNA uzyskuje różne sekwencje po potraktowaniu wodorosiarczynem, w wyniku czego powstają produkty PCR o wyraźnie różnych profilach topnienia. Startery do testów MS-HRM są zaprojektowane tak, aby były komplementarne do metylowanego allelu, a specyficzna temperatura hybrydyzacji umożliwia tym starterom hybrydyzację zarówno z metylowanymi, jak i niemetylowanymi allelami, zwiększając tym samym czułość testów. MS-HRM umożliwia oszacowanie poziomu metylacji poprzez porównanie profili topnienia nieznanego produktu PCR z profilami topnienia produktów PCR pochodzących ze wzorców o znanym stosunku matrycy niemetylowanej do metylowanej. Metoda pozwala wykryć metylacje z dużą czułością, umożliwia wykrycie nawet 0,1 – 1% metylowanych alleli na niemetylowanym tle. Wysoka czułość MS-HRM jest przydatna w wykrywaniu biomarkerów nowotworowych w sposób nieinwazyjny, np. w moczu

czy w błonie śluzowej pacjentów. Zdolność do wykrywania kilku kopii metylowanego DNA sprawia, że MS-HRM jest kluczową metodą stosowaną w poszukiwaniu powiązań wpływu środowiska na zmiany epigenetyczne i powstawanie chorób [19].

MOLEKULARNY ODCISK PALCA, MFIN-HRM (ang. FINGERPRINTING-HRM)

Charakterystyka struktury społeczności drobnoustrojów przy użyciu technik molekularnych staje się popularnym podejściem w badaniach próbek środowiskowych. Do skutecznego monitorowania i kontroli społeczności drobnoustrojów w próbkach opracowano metodę molekularnego odcisku palca w połączeniu z HRM, MFin-HRM, opartą na analizie topnienia w wysokiej rozdzielczości [20].

W analizie wykorzystano markery polimorfizmu sekwencji międzymikrosatelitarnych – ISSR (ang. *Inter Simple Sequence Repeat*). Metoda daje porównywalne wyniki grupowania społeczności drobnoustrojów, porównywalne z wynikami uzyskiwanymi w powszechnie stosowanej metodzie elektroforezy w gradiencie czynnika denaturującego (ang. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*; DGGE). Metoda ta przekształca wykresy pików topnienia (ang. *Melting Points*; MP) próbek DNA społeczności drobnoustrojów wygenerowanych w wyniku analizy HRM w molekularne odciski palców i szacuje relacje między społecznościami na ich podstawie. Metoda MFin-HRM oparta na MP stanowi dobrą alternatywę dla monitorowania zmian w strukturze społeczności drobnoustrojów, zwłaszcza w przypadku analizy dużych ilości próbek, ze względu na dużą przepustowość i krótki czas analizy HRM.

PODSUMOWANIE

Analiza topnienia DNA z wysoką rozdzielczością jest wielofunkcyjną technologią (Tab. 1) i standardowym narzędziem, które powinno być obecne w każdym laboratorium badającym kwasy nukleinowe. Metody topnienia w wysokiej rozdzielczości są szybkie, niedrogie, elastyczne i proste. HRM znajduje coraz większe zastosowanie zarówno w diagnostyce jak i laboratoriach badawczych. Analizy HRM ze względu na niski koszt i zastosowanie dostępnego sprzętu rządowania prawdopodobnie wypełnią niszę w regionach i laboratoriach o mniejszych zasobach, ale także będą uzupełnieniem technologii sekwencjonowania.

PIŚMIENNICTWO

1. Wittwer CT, Moss AA, Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22(1): 130-1
2. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT (2007) High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 8(6): 597-608
3. Vossen RHAM, Aten E, Roos A, den Dunnen JT (2009) High-resolution melting analysis (HRMA)-more than just sequence variant screening. *Hum Mutat* 30: 860-866
4. Song M (2016) Applying high-resolution melting (HRM) technology to identify five commonly used *Artemisia* species. *Sci Rep* 6:34133
5. Lu S, Mirchevska G, Phatak SS, Li D, Luka J, Calderone RA, Fonzi WA (2017) Dynamic time warping assessment of high-resolution melt curves provides a robust metric for fungal identification. *PLoS ONE* 12: e0173320
6. Antonios Z, Anastasios S, Aliko X, Maslin O, Leonardo S, Athanasios T, Panagiotis M (2016) Identification of *Phytophthora* species by a high resolution melting analysis: an innovative tool for rapid differentiation. *Plant Protect Sci* 52: 176-181
7. Doyle SR (2016) Discrimination between *Onchocerca volvulus* and *O. ochengi* filarial larvae in *Simulium damnosum* (s.l.) and their distribution throughout central Ghana using a versatile high-resolution speciation assay. *Parasit Vectors* 9(1): 536
8. Filipiak A, Hasio B (2016) The use of real-time polymerase chain reaction with high resolution melting (real-time PCR-HRM) analysis for the detection and discrimination of nematodes *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus*. *Mol Cell Probes* 30(2): 113-7
9. Manali KM (2016) Detection of microcystin producing cyanobacteria in Spirulina dietary supplements using multiplex HRM quantitative PCR. *Food Sci Biotechnol* 28(2): 609-614
10. Jin D, Luo Y, Zhang Z, Fang W, Ye J, Wu F, Ding G (2012) Rapid molecular identification of *Listeria* species by use of realtime PCR and highresolution melting analysis. *FEMS Microbiol Lett* 330(1):72-80
11. Koirala R, Taverniti V, Balzaretto S, Ricci G, Fortina MG, Guglielmetti S (2015) Melting curve analysis of a groEL PCR fragment for the rapid genotyping of strains belonging to the *Lactobacillus casei* group of species. *Microbiol Res* 173: 50-58
12. Winchell JM, Wolff BJ, Tiller R, Bowen MD, Hoffmaster AR (2010) Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol* 48: 6
13. Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT (2008) High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol* 85: 50-58
14. Wittwer CT (2009) High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat* 30: 857-859
15. Zhou L, Wang L, Palais R, Pryor R, Wittwer CT (2005) High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution. *Clinical Chemistry* 51: 1770-1777
16. Erali M, Wittwer CT (2010) High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods* 50: 250-261
17. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci* 270(1512): 313-21

Tabela 1. Zastosowanie modyfikacji reakcji HRM-PCR

Modyfikacje reakcji HRM-PCR	Zastosowanie
	Genotypowanie gatunków roślin [24-29]
SNP-HRM	Identyfikacja gatunkowa mikroorganizmów [30,31]
	Genotypowanie w obrębie gatunków drobnoustrojów [32]
Bar-HRM	Uwierzytelnianie żywności i produktów ziołowych [19,20]
	Kontrola jakości warzyw, rozróżnienie roślin jadalnych i trujących [21,33]
MS-HRM	Wykrywanie biomarkerów nowotworowych [34,35]
	Diagnozowanie chorób imprintowanych [35]
	Kliniczna weryfikacja wyników badań epigenomu [36]
	Ocena metylacji w zastosowaniach diagnostycznych i badawczych [22,37]
MFin-HRM	Identyfikacja i uwierzytelnianie gatunków [23,38]

18. Osathanunkul M, Madesis P, Ounjai S, Pumiputavon K, Somboonchai R, Lithanatudom P, Chaowasku T, Wipasa J, Suwannapoom C (2016) Identification of *Uvaria* sp by barcoding coupled with high-resolution melting analysis (Bar-HRM). *Gen Mol Res* 15(1). doi: 10.4238/gmr.15017405
19. Ganopoulos I, Madesis P, Darzentas N, Argiriou A, & Tsaftaris A (2012). Barcode High Resolution Melting (Bar-HRM) analysis for detection and quantification of PDO "fava Santorinis" (*Lathyrus clymenum*) adulterants. *Food Chemistry* 133(2): 505–512
20. Osathanunkul M, Ounjai S, Osathanunkul R, Madesis P (2017) Evaluation of a DNA-based method for spice/herb authentication, so you do not have to worry about what is in your curry, buon appetito! *PLoS ONE* 12 (10): e0186283
21. Thongkhao K, Tungphatthong C, Phadungcharoen T, Sukrong S (2020) The use of plant DNA barcoding coupled with HRM analysis to differentiate edible vegetables from poisonous plants for food safety. *Food Control* 109
22. Wojdacz TK, Dobrovic A (2007) Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucl Acids Res* 35: e41–e41
23. Buddhachat K, Changtor P, Ninket S (2019) An accurate and rapid method for species identification in plants: Melting fingerprint-high resolution melting (MFin-HRM) analysis. *Plant Gene* 20: 100203
24. Chagné D, Gasic K, Crowhurst RN, Han Y, Bassett HC, Bowatte DR, Lawrence TJ, Rikkerink EHA, Gardiner SE, Korban SS (2008) Development of a set of SNP markers present in expressed genes of the apple. *Genomics* 92: 353–358
25. Croxford AE, Rogers T, Caligari PDS, Wilkinson MJ (2008) High-resolution melt analysis to identify and map sequence-tagged site anchor points onto linkage maps: a white lupin (*Lupinus albus*) map as an exemplar. *New Phytol* 180: 594–607
26. Wu SB, Tavassolian I, Rabiei G, Hunt P, Wirthensohn M, Gibson J, Ford C, Sedgley M (2009) Mapping SNP-anchored genes using high-resolution melting analysis in almond. *Mol Genet Genomics* 282: 273–281
27. Koeyer D, Douglass K, Murphy A, Whitney S, Nolan L, Song Y, Jong W (2010) Application of high-resolution DNA melting for genotyping and variant scanning of diploid and autotetraploid potato. *Mol Breed* 25: 67–90
28. Studer B, Jensen L, Fiil A, Asp T (2009) "Blind" mapping of genic DNA sequence polymorphisms in *Lolium perenne* L. by high resolution melting curve analysis. *Mol Breed* 24: 191–199
29. Han Y, Khu D-M, and Monteros MJ (2012) High-resolution melting analysis for SNP genotyping and mapping in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Mol Breed* 29(2): 489–501
30. Steven SYC, and Giffard PM (2012) Microbiological applications of high-resolution melting analysis. *J Clin Microbiol* 50(11): 3418–21
31. Ashrafi R, Bruneaux M, Sundberg LR, et al. (2017) Application of high resolution melting assay (HRM) to study temperature-dependent intraspecific competition in a pathogenic bacterium. *Sci Rep* 7: 980
32. Gopaul, KK, Sells J, Lee R, et al. (2014) Development and assessment of multiplex high resolution melting assay as a tool for rapid single-tube identification of five *Brucella* species. *BMC Res Notes* 7: 903
33. Lagiotis, G, Stavridou E, Bosmali I, Osathanunkul M, Haider N, Madesis P (2020) Detection and quantification of cashew in commercial tea products using High Resolution Melting (HRM) analysis. *J Food Sci* 85(6): 1629–34
34. Draht MX, Smits KM, Jooste V, Tournier B, Vervoort M, Ramaekers C, Chapusot C, Weijenberg MP, van Engeland M, Melotte V (2016) Analysis of RET promoter CpG island methylation using methylation-specific PCR (MSP), pyrosequencing, and methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM): impact on stage II colon cancer patient outcome. *Clin Epigenetics* 26;8:44
35. Hussmann D, Hansen LL (2018) Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM). *Methods Mol Biol* 1708:551–571
36. Daugaard I, Dominguez D, Kjeldsen T, et al. (2016) Identification and validation of candidate epigenetic biomarkers in lung adenocarcinoma. *Sci Rep* 6: 35807
37. Ferreira IR, dos Santos Cunha WD, Ferreira Gomes LH, et al (2019) A rapid and accurate methylation sensitive high resolution melting analysis assay for the diagnosis of Prader Willi and Angelman patients. *Mol Genet Genomic Med.* 7:e637
38. Papaioannou C, Zeliou K, Trigas P, et al. (2020) High resolution melting (HRM) genotyping in the genus *origanum*: molecular identification and discrimination for authentication purposes. *Biochem Genet* 58: 725–737

High Resolution Melting Analysis (HRM-PCR) – method and its application

Damian Nikodem, Tomasz Cłapa✉, Dorota Narozna

Department of Biochemistry and Biotechnology, Poznan University of Life Sciences

✉corresponding author: tomasz.clapa@up.poznan.pl

Keywords: HRM-PCR, High Resolution Melting PCR, sequence identification, new technology

ABSTRACT

DNA denaturation with High Resolution Melting PCR-HRM is a method based on the identification of differences in the denaturation of PCR reaction products in the presence of fluorescent dyes. It is used to detect genetic variation in nucleic acid sequences in many branches of science, medicine and industry. This article is a review of the current literature of the methodology, applications and development of HRM analysis, which, thanks to its advantages such as speed, low cost, flexibility and simplicity, has found many applications, and its spectrum is still expanding.