

# شناسایی جایگاه‌های چند شکلی مهم بر روی ژن MSH2 در نمونه‌های سرطان کلورکتال با استفاده از آنالیز نقطه نوب با وضوح بالا

محسن نعمتی<sup>۱</sup>، عبدالحمید انجلی<sup>۱</sup>، سعید آریان<sup>۱</sup>، عباس بهاری<sup>۲\*</sup>

گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۶/۴/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۲۶

## چکیده

**زمینه و هدف:** سرطان کلورکتال (CRC) دومین سرطان شایع در کشورهای توسعه یافته است. بیشتر از ۱۰ درصد CRC به صورت ارثی می‌باشد و شامل سندرم لینچ HNPCC و FAP می‌باشد. ژن MSH2 بر روی کروموزوم ۲ (p21) قرار دارد و از ۱۶ اگزون تشکیل شده است. MSH2 پروتئینی است که در فرایند ترمیمی MMR بعد از همانندسازی DNA نقش دارد. پروتئین MSH2 به MSH3 یا MSH6 متصل شده و کمپلکس‌های MutSα و MutSβ را تشکیل می‌دهد که به ترتیب ناچورجفت‌های deletion/insertion کوچک و بزرگ را شناسایی می‌کنند. هدف اصلی این تحقیق بررسی کارایی و توانایی HRMA در تشخیص جهش‌های حذفی سه نوکلئوتیدی و تعیین فراوانی این جهش‌ها در حالت هموزیگوس و هتروزیگوس در نمونه‌های سرطان روده بزرگ نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

**روش بررسی:** در پژوهش مورد-شاهدی که در سال ۱۳۹۶-۱۳۹۵ انجام شد، به منظور ردیابی جهش حذفی سه نوکلئوتیدی GTG در موقعیت اگزون ۱۲ ژن MSH2 از تکنیک HRMA استفاده شد. بدین منظور ۵۰ نمونه سرطان کلورکتال به همراه ۵۰ نمونه سالم مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا DNA ژنومی از نمونه‌های بافت پارانینه سرطانی استخراج شد و سپس با تکنیک HRMA و تعیین توالی یابی مستقیم جهش حذفی سه نوکلئوتیدی GTG مورد بررسی قرار گرفت. کنترل‌های به کار گرفته شده شامل توالی ۹۶ جفت بازی در حالت تیپ وحشی و ۹۳ جفت‌بازی در حالت موتانت بود. نسبت مساوی از این دو برای حالت هتروزیگوس این جایگاه به کار گرفته شد. در نهایت تعداد نمونه‌های به دست آمده در هر گروه در آزمون تجزیه واریانس یکطرفه و مقایسه میانگین LSD مورد مقایسه آماری قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** تعداد نمونه‌های هتروزیگوس برای این جایگاه در نمونه‌های سرطان روده بزرگ به طور معنی‌داری نسبت به دو گروه هموزیگوس حاوی توالی و هموزیگوس حذف کامل بیشتر بود. در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که تکنیک HRMA قابلیت تفکیک حذف و الحاق جفت بازها به صورت هموزیگوس و هتروزیگوت را با توجه به اختلاف دمای نوب (Tm) آنها را دارد

**نتیجه‌گیری:** در مطالعه حاضر با توجه به نتایج به دست آمده فراوانی حذف سه نوکلئوتیدی GTG در نمونه‌های سرطانی نسبت به افراد سالم به صورت معنی‌داری بیشتر بود.

واژه‌های کلیدی: سرطان کلورکتال، HNPCC، تکنیک HRMA، ژن MSH2

\* نویسنده مسئول: عباس بهاری، زنجان، دانشگاه زنجان، پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی، گروه بیوتکنولوژی



جهش در سلول‌های توموری با نقص MMR، در مقایسه با سلول‌های نرمال تا هزار برابر می‌باشد (۱۰).

MSH2 پروتئینی است که در فرآیند ترمیمی MMR بعد از همانندسازی DNA نقش دارد. MSH2 به MSH6 یا MSH3 متصل شده و کمپلکس‌های MutSα و MutSβ را تشکیل می‌دهد که به ترتیب ناجور جفت‌های deletion/insertion کوچک و بزرگ را شناسایی می‌کنند. کمپلکس MutSα با کمپلکس MutSβ همکاری می‌کند و پروتئین‌های لازم برای شکاف و ترمیم DNA را به کار می‌گیرد (۱۳-۱۱). در HNPCC ۲۷ درصد جهش‌های پاتوژنیک به جهش‌های حذفی بزرگ در MSH2 و MLH1 نسبت داده می‌شود (۱۴-۱۱).

جهش‌ها در طول اگزون MSH2 پراکنده‌اند و اگزون ۹ و ۱۲ نقاط داغ جهش ژن MSH2 می‌باشند. به غیر از اگزون‌ها و مناطق اگزون-اینترون، تعداد کمی جهش نقطه‌ای در بخش پروموتور MSH2 شناسایی شده است (۱۰ و ۵).

آنالیز HRMA<sup>(۷)</sup> یک تکنیک قدرتمند در زیست‌شناسی مولکولی برای ردیابی جهش‌ها، پلی‌مورفیسم و تفاوت‌های اپی‌ژنتیکی در نمونه‌های دو رشته‌ای DNA می‌باشد. تکنیک HRMA نمونه‌های نوکلئیک اسید را بر پایه رفتارهای واسرشت شدن

سرطان کلورکتال (CRC)<sup>(۱)</sup> بیماری هتروژنتیکی است که دومین سرطان شایع در کشورهای توسعه یافته بوده و سومین سرطان رایج در مردان بعد از سرطان ریه و پروستات و دومین سرطان بعد از سرطان پستان در زنان می‌باشد (۱). CRC بیماری چندعاملی است و هر دو عامل محیطی (دخیل در اکثر CRCها) و ژنتیکی (در ۳۵ درصد موارد ابتلا) در ایجاد آن نقش دارند (۲-۴).

سرطان کلورکتال معمولاً به صورت تک‌گیر، خانوادگی و ارثی رخ می‌دهد. سرطان‌های تک‌گیر از ایجاد جهش در سلول‌های سوماتیک و به وسیله گسترش مجموعه‌ای از تغییرات ژنتیکی در انکوژن‌ها و ژن‌های سرکوبگر تومور به وجود می‌آیند (۵). سرطان‌های ارثی از ایجاد جهش در سلول‌های رده زاینده به وجود می‌آیند و حدود ۱۰ درصد موارد CRC را تشکیل می‌دهد و دو سندرم معروف آن شامل HNPCC<sup>(۲)</sup> و FAP<sup>(۳)</sup> می‌باشد (۶). سرطان‌های کلورکتال ارثی به دو گروه همراه با پولیپ و بدون پولیپ تقسیم می‌شوند (۷) و شامل سندرم‌های ژنتیکی رایج MAP<sup>(۴)</sup>، AFAP<sup>(۵)</sup>، FAP و HNPCC و سندرم‌های کمیاب هامارتوماتوس و هیپرپلاستیک می‌باشد (۸).

MMR<sup>(۱)</sup> یکی از سیستم‌های ترمیم DNA می‌باشد و اشتباهات همانندسازی DNA را شناسایی می‌کند (۶). MMR شامل چهار ژن MLH1، MSH2، MSH6 و PMS2 می‌باشد. سندرم‌های ژنتیکی از جهش رده زاینده در ژن‌های (MMR) ایجاد می‌شوند (۹). میزان

1-Colorectal Cancer  
2-Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer  
3-Familial Adenomatous Polyposis  
4-Attenuated Familial Adenomatous Polyposis  
5-MYH-Associated Polyposis  
6-Mismatch Repair  
7-High resolution melting analysis

معنی‌دار راهگشای انتخاب و غربالگری در ژنوم جهت تعیین ریسک ابتلا به این نوع از سرطان باشد.

### روش بررسی

این پژوهش مورد شاهدهی از تیر ماه سال ۱۳۹۵ لغایت اردیبهشت ماه ۱۳۹۶ در آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی و آزمایشگاه ژنتیک و کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان انجام شد. ابتدا DNA ژنومی از نمونه‌های بافت پارافینه سرطانی طبق دستور کیت استخراج DNA از بافت‌های پارافینه (شرکت QIAgene) که از کشور آلمان تهیه شده بود استخراج شد. سپس کیفیت و کمیت DNA آن مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین کمیت یا غلظت DNA از دستگاه نانودراپ (Nanodrop spectrophotometer) مدل ND-1000 ساخت کشور آمریکا و شرکت Thermo-Scientific و ژل آگارز یک درصد در دستگاه الکتروفورز افقی استفاده شد. پرایمرها بر اساس توالی اگزون ۱۲ ژن MSH2 با استفاده از نرم‌افزار Beacon designer ver 8 و گزینهِ HRMA آن طراحی شد. جدول ۱ ویژگی‌های پرایمرهای تهیه شده را نشان می‌دهد.

نمونه‌های کنترل وحشی و موتانت (به ترتیب به طول‌های ۶۴ و ۶۱ جفت باز) و پرایمرهای مربوطه از طریق شرکت ماکروژن کره جنوبی تهیه گردید.

رشته‌های DNA انجام می‌دهد و تفاوت‌های کوچک توالی در نتایج محصولات PCR را به وسیله دمای ذوب (Tm) تشخیص می‌دهد. هم‌چنین نمونه‌ها بر اساس طول توالی‌های آنها، محتوی CG و رشته‌های مکمل شان نیز جداسازی می‌شوند (۱۶).

با عنایت به مطالب ذکر شده در رابطه با اهمیت سیستم تعمیر DNA و ژن‌های MSH2 و MSH6 در تحقیق حاضر شرایط جهش سه نوکلئوتیدی بسیار مهم GTG در اگزون شماره ۱۲ ژن MSH2 از طریق روش HRMA بهینه شد. جهش حذفی مذکور را می‌توان با سایر روش‌های مبتنی بر PCR مانند RFLP<sup>(۱)</sup> نیز شناسایی کرد. با این حال سرعت، دقت و حجم بالای نمونه که به صورت هم‌زمان در کوتاه‌ترین زمان جهت تعیین ژنوتایپینگ این جهش به کار می‌رود نسبت به سایر روش‌های مرسوم مزیت دارد. هم‌چنین در این تحقیق علاوه بر تهیه استانداردها برای هر سه حالت تیپ وحشی (wild type)، تیپ جهش یافته (mutant) و حالت هتروزیگوت به صورت سنتزی، تعداد ۵۰ نمونه سرطان روده بزرگ به همراه ۵۰ نمونه کنترل از افراد سالم جهت ارزیابی این جهش در این دو جمعیت مورد بررسی قرار گرفت. در پژوهش حاضر برای اولین بار فراوانی این متغیر (Variation) در دو گروه بیمار و سالم با استفاده از روش آنالیز منحنی ذوب با وضوح بالا بررسی می‌شود که می‌تواند در صورت داشتن اثر

1-Restriction Fragment Length Polymorphism

منحنی به وسیله مقایسه واریانت‌های نمونه‌های مورد آزمایش با نمونه وحشی تولید می‌شود. ویژگی‌هایی مثل محتوی CG، طول، توالی و هتروزیگوسیتی در هر امپلیکون به مشخصه‌های منحنی ذوب اضافه خواهند شد. نتایج پروفایل‌ها اطلاعات ژنوتایپینگ، متیلاسیون و دیگر موارد جستجو را فراهم می‌کند. در اغلب موارد تفاوت‌ها در منحنی ذوب کوچک هستند. تفاوت‌های کوچک به بهترین وجه ممکن با استفاده از منحنی‌های متفاوت دیده می‌شوند. منحنی‌های نمونه‌ها از یک منبع (معمولاً یک نمونه کنترل نوع وحشی) و در یک شرایط یکسان بارگذاری تعریف می‌شوند.

در آنالیز نرم افزارهای HRMA برای محاسبه ضریب اطمینان از ۱۰۰ درصد فلوتورسنت نمونه‌ها (تمام DNAها دو رشته‌ای) جهت حد بالا و از ۰ درصد فلوتورسنت نمونه‌ها (تمام DNAها تک رشته‌ای) به عنوان حد پایین ( $-\Delta F/\Delta t$ ) استفاده کرده و نتایج آنها را با میزان فلوتورسنت الگوها مقایسه کرده و ضریب اطمینان تک تک نمونه‌ها را محاسبه می‌کند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس (آنوا) یک‌طرفه و مقایسه میانگین LSD تجزیه و تحلیل شدند.

سپس برای به دست آوردن نمونه هتروزیگوت به نسبت ۵۰ به ۵۰ از هر کدام از نمونه‌های وحشی و موتانت مخلوط شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و برنامه ذوب با وضوح بالا در دستگاه Rotorgene6000 شرکت QIAgene در جدول ۲ نشان داده شده است.

همچنین با عنایت به اهمیت بهینه‌سازی میزان هریک از واکنش‌گرها در تکنیک HRMA، پس از چندین نوبت بهینه‌سازی مقادیر نهایی به شکل جدول ۳ برای واکنش در نظر گرفته شد.

برای به دست آوردن غلظت مناسب و ایده‌آل برای شروع فرایند HRMA از نمودار تکثیر (Amplification curve) نمونه استفاده می‌شود. در نمودار تکثیر معمولاً نقطه بحرانی Threshold با ترسیم یک خط تعیین می‌شود. بهترین غلظت برای انجام HRMA شروع نقطه بحرانی Threshold بین چرخه ۱۰ تا ۱۵ از PCR می‌باشد. در آنالیز HRMA قطعه مورد نظر بوسیله PCR در حضور رنگ‌هایی که به دو رشته‌ای‌های DNA اتصال می‌یابند، تکثیر می‌شود. پس از PCR محصول به تدریج ذوب می‌شود و فلوتورسنت تشعشع یافته به وسیله یک دستگاه مخصوص دریافت و برای تولید یک منحنی مشخص (Melting curve) اندازه‌گیری می‌شود. هر خط

جدول ۱: ویژگی‌های پرایمرهای استفاده شده در واکنش‌های PCR

نام پرایمر	توالی پرایمر	دمای ذوب (°C)	طول پرایمر
MSH2 FWD	5'- GAT GTG TTA GCT CAG CTA GA-3'	56.4	(20mer)
MSH2 REV	5'- GAA CAG GTG CTC CAT TTG-3'	53.9	(18 mer)

جدول ۲: برنامه مورد استفاده در واکنش PCR و HRMA

تعداد چرخه	مدت زمان	دما (°C)	مراحل
۱	۱۵'	۹۵	واسرشته سازی اولیه
	۱۵''	۹۵	واسرشته سازی
۴۵	۲۰''	۵۴	اتصال پرایمرها
	۲۰''	۷۲	طولیل شدن
	۷۵-۹۵ °C		RAMP
	-۰/۴°C		Rising
	۵ sec		Waiting in each step

جدول ۳: غلظت مواد مورد استفاده در آزمایش

واکنشگرها	غلظت واکنشگرها در ۲۰ میکرو لیتر
Evagreen Master Mix 5x	1X (4µl)
پرایمر رفت	10 pmol (1 µl)
پرایمر برگشت	10 pmol (1 µl)
نمونه DNA	50 ng (1 µl)
آب مقطر	13 µl

## یافته‌ها

در تحقیق حاضر تعداد ۱۰۰ نمونه (۵۰ نمونه سالم و ۵۰ نمونه سرطان روده بزرگ) بایوپسی روده بزرگ پس از تأییدات پاتوبیولوژیکی مورد استخراج DNA ژنومی قرار گرفت. در آنالیز HRMA منحنی‌های چهار گانه موجود در شکل ۱ در یک نمونه از ران‌های دستگاه Rotorgene6000 نشان داده شده است. جهت اطمینان از نتایج به دست آمده از نتایج HRMA، از هر ژنوتیپ یک نمونه جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شد و نتایج به دست آمده مؤید دقت صددرصدی تکنیک HRMA بود.

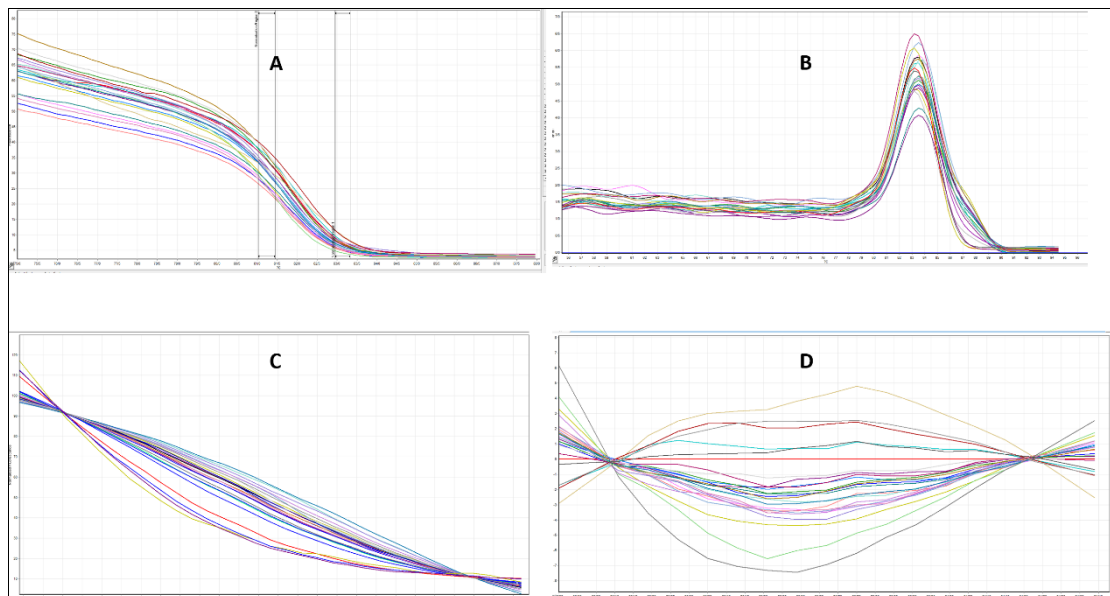
از آن جایی که سرطان کلورکتال پنهان و بدون علامت است، غربالگری کلید شناسایی زود هنگام آن است. در شناسایی افراد مبتلا و مشکوک بررسی پیشینه خانوادگی، روش زندگی و نحوه تغذیه نقش بسیار مهمی دارد. با ادغام یافته‌های پژوهشی می‌توانیم ماژولی را طراحی کنیم که بدون نیاز به شجره‌نامه ژنتیکی افراد و تنها با بررسی ژن‌های افراد، خطر ریسک ابتلا به این بیماری را پیشگویی کرده و بهترین استراتژی‌های درمانی را پیشنهاد دهد.

شناسایی کنترل‌ها مثل نمونه‌های سرطانی به‌عنوان نمونه ناشناخته در نظر گرفته شدند و مورد بررسی قرار گرفتند و با ضریب اطمینان بالا هم به طور صحیح شناسایی شدند و همچنین نمونه سرطانی ۹ که قبلاً با توالی‌یابی مورد بررسی قرار گرفته بود و به عنوان نمونه wild شناخته شده بود، در این آنالیز با ضریب اطمینان (confidence) بالا به عنوان نمونه wild شناسایی شد و تأیید شد.

شناسایی صحیح این سه نمونه که قبلاً نوع ژنوتیپ آنها مشخص بود تأییدی بر شناسایی درست و دقیق نمونه‌های سرطانی دیگر می‌باشد. همچنین هر ۱۰ نمونه سالم (h1-h10) به کار رفته در پژوهش با ژنوتیپ نوع وحشی شناسایی و مشخص شدند.

نتایج جدول بالا با ضریب اطمینان (confidence) بالای ۹۵ درصد برای تک تک نمونه‌ها بیانگر این موضوع است که از نتایج HRMA می‌توان در بررسی جهش‌ها و بررسی SNPها و مطالعه‌های سرطان با اطمینان استفاده کرد.

جدول ۴ اطلاعات ضریب اطمینان (confidence) و ژنوتیپ نمونه‌های کنترلی و سرطانی به کار رفته در دیفرنس (difference) گراف‌های بالا را نشان می‌دهد. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود، ۱۰ نمونه کنترلی (h10 - h1)، ۲۳ نمونه سرطانی (C1-C23) و سه نمونه wild و heterozygote و mutant در این مرحله مورد آنالیز و آزمایش قرار گرفته است. سه نمونه wild و heterozygote و mutant برای اطمینان از صحت



شکل ۱: منحنی‌های مربوط به آنالیز نقطه ذوب با وضوح بالا. A: منحنی ذوب نمونه‌های سرطان و گروه کنترل به دست آمده پس از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران، محدوده مشخص گردیده به وسیله خطوط عمودی بر روی گراف، منطقه آنالیز HRMA می‌باشد. B: منحنی نقطه ذوب برای نمونه‌ها پس از مشتق گرفتن میزان فلورسانس در واحد زمان. هر پیک نمایانگر تکثیر اختصاصی در هر نمونه می‌باشد. C: منحنی نقطه ذوب نرمال شده در محدوده تعیین شده در گراف A می‌باشد. D: منحنی تفریق (Differentiation curve) برای جداسازی نمونه‌های سرطانی و سالم برای سه ژنوتیپ نوع وحشی، موتانت و هتروزیگوت. فلورسانس برای نمونه هتروزیگوت در هر دما صفر در نظر گرفته شده و میزان فلورسانس بقیه نمونه‌ها بر مبنای آن قرار گرفته است.

جدول ۴: اطلاعات ضریب اطمینان (confidence) و ژنوتیپ نمونه‌های کنترلی و سرطانی به کار رفته در دیفرنس (difference) گراف‌های بالا را نشان می‌دهد.

ردیف	رنگ	نام	ژنوتیپ	ضریب اطمینان	ردیف	رنگ	نام	ژنوتیپ	ضریب اطمینان
۱	قرمز	Wt	Wt	۱۰۰.۰۰	۱۸	زرد	H4	wt	۹۱.۳۱
۲	زرد	He	He	۱۰۰.۰۰	۱۹	قرمز	h5	wt	۹۹.۴۵
۳	آبی	Mu	Mu	۱۰۰.۰۰	۲۰	قهوه‌ای	h6	wt	۹۸.۹۷
۴	بنفش	Mu	c1	۹۷.۷۳	۲۱	سبز	h7	wt	۹۸.۵۵
۵	صورتی	Wt	c2	۹۷.۷۹	۲۲	سبز تیره	h8	wt	۹۸.۷۲
۶	آبی	Wt	c3	۹۷.۶۵	۲۳	آبی تیره	h9	wt	۹۸.۳۶
۷	سبز تیره	Wt	C4	۹۶.۸۲	۲۴	آبی	h10	wt	۹۵.۳۲
۸	صورتی	Mu	c5	۹۹.۴۷	۲۵	بنفش	c13	mu	۹۸.۴۹
۹	سبز	Mu	c6	۹۷.۶۹	۲۶	بنفش تیره	C14	mu	۹۸.۰۰
۱۰	صورتی	Mu	c7	۹۹.۰۴	۲۷	خاکستری	c15	he	۹۸.۲۵
۱۱	سیاه	Mu	c8	۹۸.۵۹	۲۸	خاکستری	c16	mu	۹۸.۵۸
۱۲	آبی	Mu	c9	۹۸.۴۲	۲۹	خاکستری	c17	mu	۹۸.۷۹
۱۳	زرد	Mu	c10	۹۸.۷۹	۳۰	خاکستری	c19	mu	۹۹.۲۰
۱۴	سبز	Wt	c12	۹۷.۵۴	۳۱	قرمز	c20	he	۹۴.۰۹
۱۵	آبی	Wt	h1	۹۷.۶۷	۳۲	زرد	c21	he	۹۱.۳۱
۱۶	بنفش	Wt	h2	۹۸.۵۷	۳۳	آبی	c22	wt	۹۳.۴۵
۱۷	سبز	wt	H3	۹۸.۵۵	۳۴	بنفش	c23	wt	۹۴.۴۶

## بحث

تشخیص جهش‌های حذفی سه نوکلئوتیدی در ژن

MSH2 از جمله ژن‌های مؤثر در تعمیر DNA و تعیین فراوانی این جهش‌ها در حالت هموزیگوس و هتروزیگوس در نمونه‌های سرطان روده بزرگ نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

سادگی، هزینه اندک مواد مورد نیاز، حساسیت بالا، اختصاصیت و دقت بالا ویژگی‌های هستند که تکنیک HRMA را به عنوان ابزاری قدرتمند و جدید برای ژنوتایپینگ و کاربرد در آزمایشگاه‌های ژنتیکی،

غربالگری و شناسایی هوشمند نارسایی‌های

ژنتیکی یا عوامل ژنتیکی مستعد کننده فرد به بیماری در سنین پایین از اهمیت بالایی در مباحث اپیدمی شناسی برخوردار است. از جمله این نارسایی‌ها تفاوت‌های یک یا چند نوکلئوتیدی در انکوژن‌ها، ژن‌های سرکوب کننده سرطان و ژن‌های دخیل در مکانیسم تعمیر اسیدهای نوکلئیک می‌باشد. هدف اصلی این تحقیق بررسی کارایی و توانایی HRMA در



غربالگری تشخیص حذف و تک جهش‌ها در ژن‌های MMR کاربرد دارد. هرچند تأیید نتایج HRMA همیشه استفاده از تکنیک‌های کمکی مانند توالی یابی یا دیگر arrayها مفید می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر به وضوح نشان داد که تکنیک HRMA قادر به تفکیک سه ژنوتیپ در نمونه‌های سرطان روده بزرگ حداقل در جهش‌های حذفی سه نوکلئوتیدی است. نکته کلیدی در انجام این واکنش استفاده از استانداردهای طراحی شده برای هموزیگوس غالب مغلوب و بالطبع تهیه هتروزیگوس از آنها است. جهت جلوگیری از هرگونه خطای حاصل از تکثیر قطعه‌های غیراختصاصی درخواست تخلیص الکتروفورس عمودی (PAGE purification) برای استانداردها و پرایمرها در شرکت ماکروژن داده شد. هرچند تکنیک HRMA به نسبت RFLP و توالی یابی پس از کلونینگ از نظر بهینه‌سازی شرایط و کار آزمایشگاهی زمان بر می‌باشد، ولی در صورتی که برای یک موقعیت خاص (مانند هدف پژوهشی حاضر) شرایط بهینه انجام شود، می‌توان برای همیشه از این روش با حداقل هزینه (حداکثر ۵۰ درصد روش RFLP و ۳۰ درصد روش توالی یابی) با سرعت بسیار بیشتر استفاده کرد. در پروژه پژوهشی که به صورت موازی در پژوهش‌کده فناوری‌های نوین زیستی دانشگاه زنجان در حال انجام است با استفاده از HRMA در هر روز ۲۵۰ نمونه DNA گوسفند به جهت حضور یک ژن خاص غربالگری می‌شود.

بالینی و تشخیصی تبدیل کرده است. تکنیک HRMA قدرت پویش و ژنوتایپینگ جهش‌های شناخته شده و جهش‌های ناشناخته را داراست و روشی است که اساس آن بر مبنای PCR می‌باشد و در غربالگری جهش‌های سرطانی کاربرد دارد (۱۷ و ۴).

HRMA می‌تواند برای آنالیز واقعی هرگونه تغییر در توالی DNA از جمله تغییرات تک نوکلئوتیدی، الحاق، حذف و جایگزینی جفت بازها استفاده شود. نمایان کردن کوچکترین تغییرات ژنتیکی، حذف و ژنوتایپ کردن SNPها حساسیت آنالیزهای HRMA را نشان می‌دهد.

باعنایت به توانایی، سرعت و دقت بسیار بالای HRMA در ژنوتایپینگ و تشخیص متیلاسیون پروموتورژن‌ها، مطالعه‌های بسیار وسیعی با استفاده از این تکنیک در آزمایش‌های مربوط به سرطان روده بزرگ انجام گرفته است (۱۸-۲۲ و ۱۶). به همین دلیل تحقیق‌های غربالگری، اخیراً به سمت استفاده از این تکنیک سوق پیدا نموده است. به عنوان مثال در مطالعه مازوراک و همکاران جهت شناسایی تغییرات بر روی ژن‌های MMR که ژن‌های اصلی در نوع وراثت‌پذیر سرطان روده بزرگ (HNPCC) می‌باشند، از تکنیک HRMA استفاده شده است. جمعیت هدف آن‌ها بیماران سرطان روده بزرگ ساکن لهستان بود. نتایج آن تحقیق باعث شناسایی ۳ موتاسیون جدید در ژن MSH2 بر روی اگزون‌های ۵، ۶ و ۸ بود (۲۳).

در مجموع به نظر می‌رسد HRMA تکنیکی سریع، به نسبت آسان و با کارایی بالاست که جهت

## نتیجه‌گیری

در مجموع با عنایت به وجود دستگاههای پیشرفته Real-time PCR در آزمایشگاهها و مراکز آموزشی - پزشکی سراسر کشور و هزینه بسیار کم تعیین انواع نارسایی‌های و نقایص ژنتیکی مرتبط با ابتلا به سرطان، به نظر می‌رسد این امکان وجود دارد که با تهیه کیت‌های تشخیصی اختصاصی برای ژن‌های کلیدی در هر تایپ سرطان، تعداد بسیار زیادی نمونه در زمان بسیار کم (حداکثر دو ساعت) برای غربالگری افراد مستعد با استفاده از تکنیک HRM صورت پذیرد.

## تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه خوارزمی می‌باشد، که از حمایت‌های رئیس دانشگاه خوارزمی و رئیس دانشکده علوم زیستی نهایت تشکر و قدردانی را دارم. هم‌چنین از مساعدت‌های رئیس دانشگاه زنجان و رئیس دانشکده فناوری‌های نوین زیستی زنجان که ما را در انجام کارهای عملی این پروژه یاری نمودند تشکر می‌کنم.

## REFERENCES

1. Abdelsattar ZM, Wong SL, Regenbogen SE, Jomaa DM, Hardiman KM, Hendren S. Colorectal cancer outcomes and treatment patterns in patients too young for average-risk screening. *Cancer* 2016; 122(6): 929-34.
2. Mitchell RJ, Farrington SM, Dunlop MG, Campbell H. Mismatch Repair Genes HMLH1 and hMSH2 and Colorectal Cancer: A HuGE Review. *Am J Epidemiol* 2002; 156(10): 885–902.
3. Al Bandar MH, Kim NK. Current status and future perspectives on treatment of liver metastasis in colorectal cancer (Review). *Oncol Rep* 2017; 37(5): 2553-2564.
4. Vossen RH, Aten E, Roos A, Dunnen JT. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum Mutat* 2009; 30: 860 –6.
5. Kheiriseid EAH, Miller N, Kerin MJ. Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature. *American Journal of Molecular Biology* 2013; 3: 72-80.
6. Roper J, Hung KE. Molecular pathogenesis of colorectal cancer. chapter 2 molecular mechanisms of colorectal carcinogenesis. Springer Science 2013; 138(6):2059–2072
7. Ellis CN. Inherited Colorectal Cancer Syndromes. *Clinics in Colon and Rectal Surgery* 2005; 18(3): 150-62.
8. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppede F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011; 2011: 1- 19.
9. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Brouquet A, Cervantes A. Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2010; 21 (5): 70-7.
10. Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Human Molecular Genetics* 2001; 10(7): 735-40.
11. Morak M, Kasbauer S, Kerschner M, Laner A, Nissen AM, Benet-Pages A, et al. Loss of MSH2 and MSH6 due to heterozygous germline defects in MSH3 and MSH6. *Fam Cancer* 2017; 16(4):491-500
12. Mork ME, Rodriguez A, Taggart MW, Rodriguez-Bigas MA, Lynch PM, Bannon SA, et al. Identification of MSH2 inversion of exons 1-7 in clinical evaluation of families with suspected Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2016;16(3): 357-61.
13. Pensabene M, Condello C, Carlomagno C, De Placido S, Liccardo R, Duraturo F. Two novel sequence variants in MSH2 gene in a patient who underwent cancer genetic counseling for a very early-onset epithelial ovarian cancer. *Hered Cancer Clin Pract* 2016; 14(1): 18.
14. Vargas-Parra GM, Gonzalez-Acosta M, Thompson BA, Gomez C, Fernandez A, Damaso E, et al. Elucidating the molecular basis of msh2-deficient tumors by combined germline and somatic analysis. *Int J Cancer* 2017; 141(7): 1365-80.
15. Alves MG, Carta CF, de Barros PP, Issa JS, Nunes FD, Almeida JD. Repair genes expression profile of MLH1, MSH2 and ATM in the normal oral mucosa of chronic smokers. *Arch Oral Biol* 2017; 73: 60-5.
16. Li BS, Wang XY, Xu AG, Ma FL, Ma QY, Li Z, et al. High-Resolution melting assay (hrma) is a simple and sensitive stool-based DNA test for the detection of mutations in colorectal neoplasms. *Clinical Colorectal Cancer* 2012; 11(4): 280-90.
17. Henry OE, M Ilyas M. Cancer mutation screening: Comparison of high-resolution melt analysis between two platforms. *Ecancer* 2015; 9: 522.
18. Balic M, Pichler M, Strutz J, Heitzer E, Ausch C, Samonigg H, et al. High quality assessment of dna methylation in archival tissues from colorectal cancer patients using quantitative high-resolution melting analysis. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2009; 11(2), 102-108.
19. Mancini I, Santucci C, Sestini R, Simi L, Pratesi N, Cianchi F, et al. The use of COLD-PCR and high-resolution melting analysis improves the limit of detection of kras and braf mutations in colorectal cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2010; 12(5): 705-711.

20. Pichler M, Balic M, Stadelmeyer E, Ausch C, Wild M, Guelly C, et al. Evaluation of High-Resolution melting analysis as a diagnostic tool to Detect the BRAF V600E mutation in colorectal tumors. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2009; 11(2): 140-7.
21. Xiao Z, Li B, Wang G, Zhu W, Wang Z, Lin J, et al. Validation of methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM) for the detection of stool DNA methylation in colorectal neoplasms. *Clinica Chimica Acta* 2014; 431: 154-63.
22. Zhang C, Shao Y, Zhang W, Wu Q, Yang H, Zhong Q, et al. High-resolution melting analysis of ADAMTS9 methylation levels in gastric, colorectal, and pancreatic cancers. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2010; 196(1): 38-44.
23. Mazurek A, Fiszer-Kierzkowska A, Budryk M. Identification of new genetic alterations in MLH1, MSH2 and MSH6 using IHC and HRM analysis in Lynch syndrome-suspected patients. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 2012; 10(3): A11.

# Identification of Important Polymorphic Sites on *MSH2* Gene in Colorectal Cancer Samples Using High Resolution Melting Point Analysis

Nemati M<sup>1</sup>, Angji AH<sup>1</sup>, Aryan S<sup>1</sup>, Bahari A<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemical and molecular Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran, <sup>2</sup>Department of Biotechnology, New Biotechnology Research Center, Zanjan University, Zanjan, Iran

Received: 27 Aug 2017 Accepted: 17 Aug 2018

## Abstract

**Background and Aim:** Colorectal cancer (CRC) is the second most common cancer in developed countries. More than 10% of CRCs are inherited and include HNPCC and FAP ligation syndrome. The *MSH2* gene is located on chromosome 2 (p21) and consists of 16 exons. MSH2 is a protein that plays a role in restorative MMR after DNA replication. The MSH2 protein is attached to MSH6 or MSH3 and forms MutS $\alpha$  and MutS $\beta$  complexes that identify small and large deletion / insertion abnormalities, respectively. The main objective of the present research was to evaluate HRMA's ability and effectiveness in detecting tri-nucleotide deletion mutations and determine the frequency of these mutations in homozygous and heterozygous states in colon cancer samples compared to control group.

**Methods:** In the present study, a case control was carried out in 2016-2017 to detect the mutations of the three nucleotide deletions of GTG in the position of exon 12 of *MSH2* gene. For this purpose, 50 samples of colorectal cancer with 50 healthy samples were studied. At first, genomic DNA was extracted from paraffin tissue samples and then examined by HRMA technique and direct sequencing of the triple nucleotide deletion mutant GTG. The controls used included a sequence of 96 bp in wild type and 93 bp in the mutant mode. Equal portions of these two were used for the heterozygous state of this site. Finally, the number of samples in each group was compared in one way ANOVA and LSD mean comparison.

**Results:** The number of heterozygous samples for the site in colon cancer samples was significantly higher than that of homozygous consecutive homozygotes. In general, the results of the present study indicated that the HRMA technique had the ability to separate and remove the pairs of homozygotes and heterozygotes according to their melting temperature ( $T_m$ )

**Conclusion:** According to the results of this study, the frequency of removal of the three nucleotide GTGs in cancerous samples was significantly higher than healthy ones.

**Key words:** Colorectal Cancer, HNPCC, HRMA, *MSH2* Gene

---

\*Corresponding author: Bahari A, Department of Biotechnology, New Biotechnology Research Center, Zanjan University, Zanjan, Iran

## Please cite this article as follows:

Nemati M, Angji AH, Aryan S, Bahari A. Identification of Important Polymorphic Sites on *MSH2* Gene in Colorectal Cancer Samples Using High Resolution Melting Point Analysis. Armaghane-danesh 2018; 23(4): 516-527