Quarterly of the Horizon of Medical Sciences
Volume 22, Issue 1, Winter 2016
Pages: 77-88
Type: Analytic Review

High Resolution Melt Analysis (HRM) and its Strategic Applications Especially in Molecular Genetics

Noori-Daloii M.R.* ***PhD*****, Faraji K.[1]** ***BSc***

*Medical Genetics Department, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[1]Medical Genetics Department, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: In wide and developing worlds of cellular and particularly molecular sciences, the most important issue that leads to paying more attention to and use a technique, is its critical features; high sensivity, specificity, velocity and also being available and cheap. High Resolution Melting (HRM), may be one of these techniques. Its usage is growing among others significantly in investigations, for its special advantages. HRM is based on the pattern and characteristic of DNA when melting. DNA melting temperature (Tm), is the temperature that 50% of DNA molecules have become single stranded and 50% are double stranded. The pattern of getting single stranded is specific and unique for every DNA strand; and differences are shown as a graph called "melting curve". These are effective on DNA Tm: the value of bases G and C in both DNA strands (CG%), the length of fragment, the static effects of bases on each strand and the hetrozygocity. In fact, the differences among melting curves results in recognition the special fragment. The way of being single stranded can be followed by fleurcence colors which attached to double stranded DNAs.

Conclusion: High-resolution melting is powerful, fast, comprehensive and useful technique for using in molecular laboratory that can be considered as simple and fast approach for genotyping, mutation detection, matching sequence and methylation study.

Keywords
High Resolution Melting [Not in MeSH];
Molecular Biology [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68008967];
Molecular Diagnostic Techniques [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68025202]

*Corresponding Author
Tel: +98218853005
Fax: +98218853005
Address: Medical Genetics Department, Medicine Faculty, Tehran University of Medical sciences, Poursian Street, Keshavarz Boulevard, Tehran, Iran
nooridaloii@sina.tums.ac.ir
Received: January 14, 2015 Accepted: July 7, 2015 ePublished: December 15, 2015

فن ذوب DNA با تفکیک بالا و کاربردهای راهبردی آن به‌ویژه در ژنتیک مولکولی

محمدرضا نوری دلویی* PhD
گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
کریم فرجی BSc
گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: در دنیای گسترده و در حال رشد علوم سلولی و به‌ویژه مولکولی، مهم‌ترین مساله‌ای که موجب می‌شود یک فن بیشتر مورد توجه و استفاده قرار گیرد، آن است که از دقت، سرعت و ویژگی کافی برخوردار بوده و به‌ویژه دردسترس و کم‌هزینه باشد. میزان به‌کارگیری "ذوب‌شدگی با تفکیک بالا" در کارهای پژوهشی، در مقایسه با سایر فنون به‌نحو چشمگیری رشد کرده و دلایل این رشد را می‌توان در شایستگی‌ها و مزیت‌های این روش دانست. اساس ذوب‌شدگی با تفکیک بالا، توجه به الگو و رفتار ذوب رشته‌های DNA در دمای خاص است. منظور از دمای ذوب DNA، دمایی است که در آن ۵۰٪ رشته‌های DNA به‌صورت تک‌رشته و ۵۰٪ به‌صورت دورشته هستند. الگوی تک‌رشته‌ای‌شدن رشته‌های DNA با هم متفاوت بوده و برای قطعه‌های متفاوت DNA کاملاً اختصاصی است. تفاوت این رفتار به‌صورت یک منحنی با عنوان "منحنی ذوب" نشان داده می‌شود و عامل‌هایی مانند غلظت بازهای C و G در قطعه دورشته‌ای، طول قطعه، نحوه توزیع بازها، اثر استاتیکی بازها روی یکدیگر و وجود هتروزیگوسیتی بر آن اثر می‌گذارند. در واقع تفاوت الگوی منحنی، موجب شناسایی قطعه مورد نظر می‌شود. نحوه دورشته‌ای‌شدن DNA را می‌توان با رنگ‌های فلوئورسنس که تنها به DNAی دورشته‌ای متصل می‌شوند، دنبال نمود.

نتیجه‌گیری: ذوب‌شدگی با تفکیک بالا روشی بسیار قدرتمند، سریع، جامع و مفید برای به‌کارگیری در آزمایشگاه‌های مولکولی به‌حساب می‌آید که می‌توان آن را راه حلی ساده و سریع برای تعیین ژنوتیپ، ردیابی جهش، تطابق توالی و بررسی الگوی متیلاسیون دانست.

کلیدواژه‌ها: ذوب‌شدگی با تفکیک بالا، زیست‌شناسی مولکولی، فنون تشخیصی مولکولی

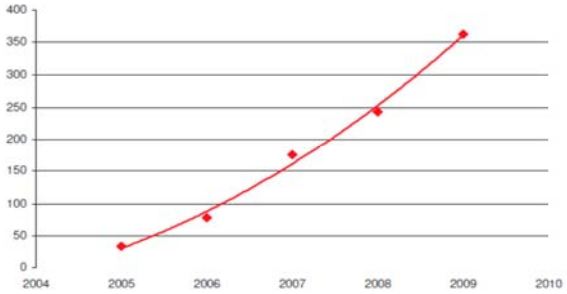
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۱۶
*نویسنده مسئول: nooridaloii@sina.tums.ac.ir

مقدمه

در دنیای گسترده و در حال رشد علوم سلولی و به‌ویژه مولکولی، مهم‌ترین مساله‌ای که موجب می‌شود یک فن بیشتر مورد توجه و استفاده قرار گیرد، آن است که فن مورد نظر از دقت، سرعت و ویژگی کافی برخوردار بوده و به‌ویژه دردسترس و کم‌هزینه باشد.

فن HRM (ذوب‌شدگی با تفکیک بالا) را می‌توان یکی از این روش‌ها در نظر گرفت که برای نخستین بار در سال ۲۰۰۳ به‌صورت مشترک توسط دانشگاه *یوتا* و یک مرکز پژوهشی به‌نام *ایداهو* در ایالات متحده معرفی شد و اساس آن، توجه به الگو و رفتار ذوب DNAی دورشته‌ای است[1, 2].

میزان به‌کارگیری این فن در کارهای پژوهشی، در مقایسه با سایر فنون به‌نحو چشمگیری رشد کرده و دلایل این رشد انفجارآمیز را می‌توان در شایستگی‌ها و مزیت‌هایی دانست که این روش به خود اختصاص داده است (شکل ۱).



شکل ۱) روند استفاده از فن HRM از سال ۲۰۰۵ تا سال ۲۰۱۰

شماری از مزیت‌های این فن به‌شرح زیر است: دقت و حساسیت بالا در ردیابی تغییرات و واریانت‌های ژنتیکی، سرعت بالا در آنالیز نمونه‌ها، دردسترس‌بودن نمونه‌ها به‌خاطر سالم‌ماندن پس از پایان آنالیز، امکان استفاده دوباره یا استفاده از سایر فنون روی نمونه‌ها، قابلیت به‌کارگیری متعدد (استفاده در مطالعات همراهی، بررسی بلاک‌های هاپلوتیپی، تعیین ژنوتیپ چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNP)، نقشه‌کشی DNA، ردیابی جهش‌ها، HLAتایپینگ و بررسی الگوی متیله‌شدن) و آشکاربودن نتایج[1-7]. بر همین اساس پیش‌بینی می‌شود که در آینده‌ای نه‌چندان دور، این فن به‌عنوان یک روش مرسوم و پرکاربرد در آزمایشگاه‌های علوم مولکولی و به‌ویژه ژنتیک مولکولی مورد استفاده قرار گیرد.

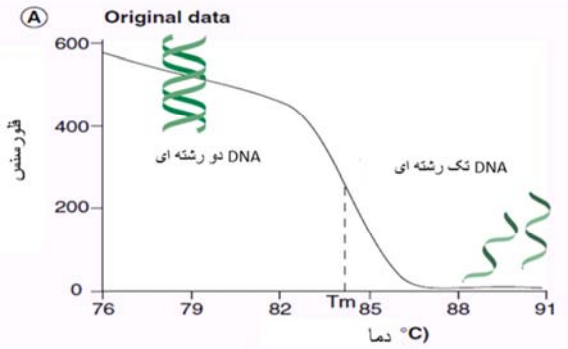
مواجهه با عفونت‌های میکروبی مقاوم به دارو، نمونه‌ای از اهمیت قابل توجه این فن است. در چنین شرایطی است که تشخیص سریع نوع واریانت مقاوم و تجویز داروی مناسب بسیار ضروری خواهد بود. همچنین در شرایط اورژانس که نیاز است بیمار برای تجویز دوز مناسب دارو، سریع تعیین ژنوتیپ شود، فن HRM به‌خوبی جوابگوی آنها است[8, 9].

ویژگی‌های اصلی فن HRM

فن HRM برای اولین بار در سال ۲۰۰۳ به‌صورت مشترک توسط دانشگاه *یوتا* و یک مرکز پژوهشی به‌نام *ایداهو* در ایالات متحده، معرفی شد و داری سه ویژگی اصلی به‌شرح زیر است:

۱- استفاده از رنگ فلوئورسنس با غلظت نسبتاً بالا.
۲- استفاده از یک ابزار دقیق جمع‌آوری تغییرات شدت نور فلوئورسنس بر حسب تغییرات دما.
۳- استفاده از نرم‌افزاری پیچیده که با استفاده از الگوریتم، داده‌های فلوئورسنس را به‌صورت پیوسته درآورده و آنالیز می‌نماید[3].

اساس فن HRM را می‌توان توجه به الگو و رفتار ذوب رشته‌های DNA در یک دمای خاص معرفی کرد. منظور از دمای ذوب DNA (Tm)، دمایی است که در آن ۵۰٪ رشته‌های DNA به‌صورت تک‌رشته و ۵۰٪ به‌صورت دورشته حضور دارند. الگوی تک‌رشته‌ای‌شدن رشته‌های DNA با هم متفاوت بوده و برای قطعه‌های متفاوت DNA کاملاً اختصاصی است. تفاوت این رفتار به‌صورت یک منحنی با عنوان "منحنی ذوب" نشان داده می‌شود و عامل‌هایی مانند غلظت بازهای C و G در قطعه دورشته‌ای مورد نظر، طول قطعه، نحوه توزیع بازها، اثر استاتیک بازها بر یکدیگر و وجود هتروزیگوسیتی بر آن اثر می‌گذارند. در واقع تفاوت الگوی منحنی، موجب شناسایی قطعه مورد نظر می‌شود[10]. نحوه دورشته‌ای‌شدن DNA را می‌توان با کمک رنگ‌های فلوئورسنس که تنها به DNAی دورشته‌ای متصل می‌شوند، دنبال نمود که شکل ۲ نشان‌دهنده این روند است.



شکل ۲) روند تک‌رشته‌ای‌شدن DNA دورشته‌ای حین افزایش دما. همزمان با تک‌رشته‌ای‌شدن، رنگ فلورسنس شروع به جداشدن از قطعه‌های دورشته‌ای نموده و شدت آن کم می‌شود.

هنگامی که DNA شروع به تک‌رشته‌ای‌شدن می‌نماید، این رنگ‌ها نیز از DNA جدا می‌شود و شدت نور آن نیز همزمان با روند تک‌رشته‌ای‌شدن تقریباً ۱۰۰۰برابر کاهش می‌یابد. کاهش شدت نور، اندازه‌گیری شده و یک نمودار براساس شدت نور- تغییرات دما ترسیم می‌شود. در مرحله بعد، این نمودارها نرمالیزه شده و الگوی آنها با الگوی منحنی‌های مربوط به نمونه استاندارد مقایسه شده و نتیجه گزارش می‌شود[1, 2, 8, 10, 11].

کاربردهای اصلی و مهم HRM

۱) کاربرد HRM در تعیین ژنوتیپ چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNP)

چندشکلی‌ها به‌عنوان یک تغییر ژنتیکی طبیعی در نظر گرفته می‌شوند و در واقع واریانت‌های ژنتیکی در جمعیت‌های متفاوت هستند که موجب به‌وجودآمدن تفاوت‌های ژنتیک می‌شوند. چندشکلی‌ها می‌توانند در نواحی گوناگون ژنوم از جمله ناحیه کدکننده، ناحیه غیرکدکننده و نیز نواحی بین‌ژنی قرار گیرند. بر حسب اینکه چندشکلی‌ها در چه ناحیه‌ای قرار گیرند، آثار متفاوتی را می‌توان انتظار داشت. برای نمونه، اگر یک چندشکلی در ناحیه پروموتر یک ژن قرار گیرد، می‌تواند میان‌کنش عامل‌های رونویسی با این ناحیه ژنی را تحت تاثیر قرار دهد که در نتیجه آن، بیان ژن نیز دست‌خوش تغییر قرار می‌گیرد.

تا به امروز مطالعات زیادی از جمله مطالعه "همراهی" و "پیوستگی" روی چندشکلی‌ها و ارتباط آنها با بیماری‌های متفاوت انجام گرفته است و نتایج معنی‌داری از نقش‌داشتن این چندشکلی‌ها در ابتلا و افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های متفاوت حاصل شده است. پژوهش‌های انجام‌شده در زمینه فارماکوژنتیک حاکی از نقش‌داشتن چندشکلی‌ها در ایجاد پاسخ دارویی گوناگون در افراد متفاوت است. شایان ذکر است که یکی از دلایل مطرح‌شدن موضوع "پزشکی انفرادی" نیز حضور چندشکلی‌ها و اهمیت آنها در ایجاد پاسخ درمانی متفاوت در افراد است[6, 12].

فارماکوژنتیک برای اولین بار توسط *وگل* در سال ۱۹۵۹، برای مطالعه گوناگونی تعیین‌شده توسط ژنتیک که منحصراً توسط اثرات داروها نشان داده می‌شد، به‌کار رفت. امروزه فارماکوژنتیک، برای تشریح تاثیر ژن‌ها روی اثربخشی آثار جانبی داروها به‌کار می‌رود.

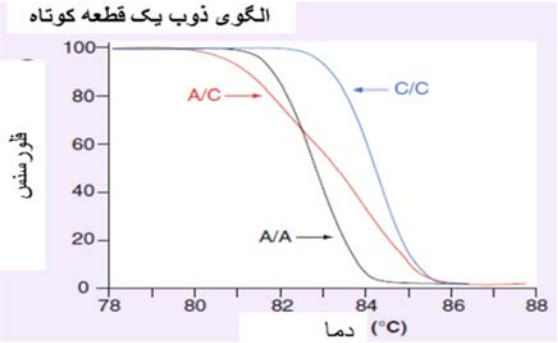
در کنار فارماکوژنتیک، واژه دیگری به‌نام فارماکوژنومیک وجود دارد که به بررسی میان‌کنش ژنوم (یعنی ژن‌های چندگانه) و داروها می‌پردازد. فارماکوژنتیک/فارماکوژنومیک، به‌دلیل آنکه میان‌کنش‌های دارویی نامطلوب، یک مسبب عمده بیماری و مرگ‌ومیر هستند، اهمیت دارند[12, 13]. وجود این چندشکلی‌ها در انسان می‌تواند بر نحوه پاسخ بدن به بیماری‌زاها، مواد شیمیایی، داروها، واکسن‌ها و دیگر عوامل تاثیر گذارد. چنانچه نوع این چندشکلی‌ها در جمعیت‌ها یا در هر فرد شناسایی شود، می‌تواند در زمینه‌های متفاوت از جمله محاسبه میزان استعداد ابتلا به بیماری‌های پیچیده و انواع سرطان‌ها، تجویز نوع و دوز داروها سودمند واقع شود[12, 14-18]. چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی در چهار گروه رده‌بندی می‌شوند (جدول ۱).

جدول ۱) طبقه‌بندی انواع رده‌های SNP

رده SNP	تغییر بازی	تغییر معمول Tm	فراوانی در انسان
یک	C/T و G/A		٪۶۴
دو	G/T و C/A	بیشتر از ۰/۵ درجه	٪۲۰
سه	C/G		٪۹
چهار	A/T	کمتر از ۰/۲ درجه	٪۷

لازم به ذکر است که توانایی HRM در تمایز این چندشکلی‌ها از یکدیگر متفاوت است[11, 19]. تشخیص چندشکلی‌های رده ۴ توسط HRM اندکی دشوار است. برای تشخیص این گروه، دستگاه باید این قابلیت را داشته باشد که افزایش دما را به‌صورت ۰/۱درجه ۰/۱درجه اعمال نماید تا بتوان نوکلئوتیدهای A و T را تشخیص داد، علت این را می‌توان در تفاوت الکترواستاتیک بازها دانست [8, 20].

در روش HRM، برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها، مستقیماً از فرآورده‌های PCR استفاده می‌شود و بنابراین نیازی به پروب نیست. برای نمونه، اگر تغییر A>C را در یک توالی در نظر بگیریم، در حالت کلی ژنوتیپ‌هایی که با آن مواجه هستیم به‌صورت A/C، A/A و C/C خواهد بود. الگوی منحنی برای حالت‌های A/A و C/C یکسان خواهد بود و شکل C/C یک‌درجه بالاتر از شکل A/A قرار می‌گیرد. الگوی فرم‌های هتروزیگوت نیز با هم متفاوت خواهد بود (شکل ۳).

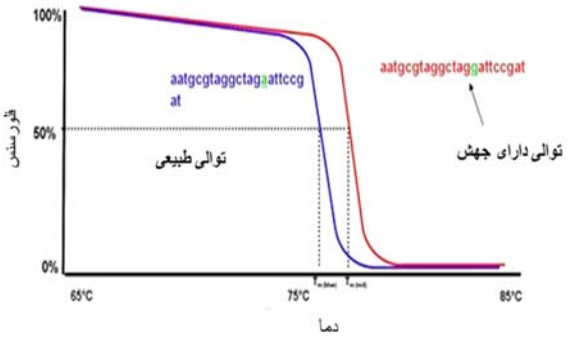


شکل ۳) تفاوت الگو و رفتار تک‌رشته‌ای‌شدن DNAهای دورشته‌ای که در یک جایگاه بازی از هم متمایز هستند؛ این تمایز موجب تغییر الگوی منحنی‌های ذوب می‌شود.

حال اگر بازه تغییرات دمایی را وسیع‌تر انتخاب نماییم (برای نمونه اگر افزایش دما به‌صورت یک‌درجه باشد این بار ۰/۱ تنظیم شود)، می‌توان حالت‌های هترودوپلکس (A/C و C/A) و همودوپلکس (A/A و C/C) را نیز شناسایی کرد. لازم به ذکر است که الگوی منحنی‌های مربوط به یک ژنوتیپ مجهول با الگوی منحنی مربوط به یک ژنوتیپ استاندارد و مشخص (برای نمونه A/A) سنجیده شده و ژنوتیپ مجهول تشخیص داده می‌شود. نحوه آنالیز داده‌های حاصل از HRM در ادامه مورد بحث قرار گرفته است[21, 22].

۲) کاربرد HRM در ردیابی جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی

در روش HRM، برای تعیین و شناسایی جهش، همانند تعیین ژنوتایپ، مستقیماً از محصولات PCR استفاده می‌شود. در این روش نیز به یک منحنی مرجع و استاندارد نیاز است تا منحنی حاصل از نمونه‌های بیمار یا مجهول با آن سنجیده شود. در صورت وجود هر نوع تغییر در رشته مورد نظر، منحنی حاصل از آن با منحنی مرجع متفاوت خواهد بود (شکل ۴). اخیراً از روش HRM برای ردیابی جهش‌های نقطه در ژن‌هایی همچون BRAF، PIK3CA و KRAS استفاده شده است که از حساسیت و دقت قابل قبولی برخوردار بوده است[23-27].



شکل ٤) تغییر الگوی ذوب رشته سالم و رشته دارنده جهش. وقوع جهش در یک جایگاه بر روی DNA موجب تغییر الگو و رفتار ذوب DNAی دورشته‌ای می‌شود.

در فن HRM به‌دلیل سالم‌ماندن نمونه‌ها پس از پایان آنالیز، امکان استفاده دوباره یا استفاده از سایر فنون دیگر روی آنها وجود دارد. برای نمونه، چنانچه نتایج به‌دست‌آمده در HRM مشکوک باشد می‌توان برای تایید، نمونه‌ها را برای توالی‌یابی ارسال نمود تا از درستی نتایج HRM مطمئن شد[1-3, 23].

استفاده از فن HRM برای ردیابی جهش‌ها در مقایسه با دیگر روش‌های مرسوم از سرعت و دقت بالایی برخوردار است. روش‌های سریع و ارزانی (مانند SSCP، DGGE و DHPLC) وجود دارند که به‌صورت گسترده برای ردیابی و غربالگری انواع جهش‌ها روی فرآورده‌های PCR انجام می‌گیرند. در این روش‌ها از ماتریکس و یک ماده واسرشت‌کننده DNA استفاده می‌شود که در فن HRM نیازی به این مراحل نیست[6, 28, 29].

در روش SSCP (چندشکلی ساختاری تک‌رشته‌ای)، قطعه‌های DNA با کمک PCR تکثیر می‌یابند. سپس DNAی دورشته‌ای روی ژل الکتروفورز حرکت داده می‌شود. حرکت DNA به اندازه قطعه بستگی دارد، به‌نحوی که مولکول‌های کوچک از منافذ ژل به‌آسانی عبور می‌کنند. در الکتروفورز SSCP ابتدا از یک ماده واسرشت‌کننده مانند اوره برای تبدیل DNAی دورشته‌ای به تک‌رشته‌ای استفاده می‌شود. حال اگر جهشی در قطعه مورد نظر وجود داشته باشد، الگوی حرکت آنها بر الکتروفورز متفاوت خواهد بود و به این ترتیب می‌توان قطعه‌های دارای جهش را از قطعه‌های طبیعی تمایز داد. این روش ساده بوده و در سطح گسترده‌ای به‌کار گرفته می‌شود. اگر چه مشکل عمده این روش آن است که بسیاری از جهش‌ها شناسایی نمی‌شوند، زیرا بسیاری از آنها تاثیری بر رشته دارای جهش ندارند، در نتیجه تفاوتی در الگوی مهاجرت قطعه‌ها روی ژل مشاهده نمی‌شود. بر همین اساس سطح ردیابی و

تشخیص این فن برای جهش‌ها، در حدود ۷۰٪ گزارش شده است[4, 6, 22].

روش DGGE (الکتروفورز روی ژل با شیب واسرشت‌کننده) در مقایسه با فن SSCP با قدرت تشخیص بالای ۹۵٪، به‌مراتب موثرتر و کارآمدتر عمل می‌نماید، اما در مقابل، انجام آن پیچیده‌تر بوده و نیاز به تجهیزات نسبتاً پیچیده دارد. این روش روی فرآورده‌های PCR انجام می‌گیرد. در صورتی که قطعه‌های DNA در یک نوکلئوتید با هم متفاوت باشند، واسرشت‌شدن آنها در سطح متفاوتی رخ می‌دهد. در این روش دو نمونه DNA در دو ستون جداگانه از یک ژل پلی‌آکریل‌آمید که دارای نسبتی از غلظت ماده واسرشت‌کننده (معمولاً فرمامید) است قرار می‌گیرند، در ژل شروع به حرکت می‌کنند و زمانی که به نقطه مناسبی از غلظت ماده واسرشت‌کننده می‌رسند شروع به جداشدن می‌نمایند. این نقطه به‌عنوان یک نقطه ذوب عمل کرده و در این حالت به‌صورت چشمگیری از سرعت حرکت قطعه‌ها کم می‌شود و برای قطعه‌های سالم و قطعه‌های دارای جهش متفاوت است. به این ترتیب قطعه دارای جهش ردیابی می‌شود[12].

روش DHPLC (کروماتوگرافی مایع DNA با کارآیی بالا)، بیشتر برای شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی استفاده شده و دارای قدرت تشخیص بالای ۹۶٪ است و روی فرآورده‌های PCR انجام می‌شود. اساس این روش تقریباً مشابه روش DGGE است که پژوهشگران را قادر به تشخیص مولکول‌های هترودوپلکس تولیدشده در PCR می‌کند[12].

فن HRM در مقایسه با روش‌های مورد اشاره در بالا، مزایایی مشتمل بر موارد زیر دارد[1-3, 12]:

- الف) عدم نیاز به ماتریکس.
- ب) عدم نیاز به ماده واسرشت‌کننده.
- پ) انجام همه واکنش در HRM در درون لوله‌ها (روش لوله دربسته) و عدم نیاز به خارج‌سازی فرآورده‌های PCR.
- ت) به‌حداقل‌رسیدن احتمال ورود آلودگی به واکنش به‌دلیل عدم خروج فرآورده‌ها از لوله.

لازم به ذکر است که ویژگی و حساسیت فن HRM در ردیابی تغییرات تک‌نوکلئوتیدی در فرآوردهای PCR با طول ۴۰۰جفت‌باز برابر با ۱۰۰٪، در فرآوردهای PCR با طول ۱۰۰۰–۴۰۰جفت‌باز حساسیت آن برابر با ۹۶/۱٪ و ویژگی آن برابر با ۹۹/۴٪ است [1, 2, 26, 30-34].

۳) کاربرد HRM در بررسی تطابق توالی

تغییرات الگوی متیله‌شدن در DNA، یکی از سازوکارهای اصلی اپی‌ژنتیکی برای کنترل بیان ژن است. فن MS-HRM (HRM حساس به متیلاسیون) یک روش بسیار ساده است که می‌تواند با دقت و سرعت کافی به بررسی الگوی متیله‌شدن در ژنوم بپردازد[21]. در این روش ابتدا DNAی ژنومی بی‌سولفیته می‌شود تا سیتوزین‌های غیرمتیله به یوراسیل تبدیل شوند. سپس از DNA استفاده می‌شود. شایان تاکید است که طراحی پرایمر در فن MS-HRM حساس‌ترین و مهم‌ترین مرحله به‌شمار می‌آید. بر همین اساس پیشنهاد شده است که برای طراحی پرایمر از نرم‌افزار Methyl Primer Express® v1.0 که به‌طور ویژه برای طراحی پرایمر متیله برنامه‌ریزی شده است، استفاده شود[11].

طول آمپلیکون، تعداد سایت‌هایی که قابلیت متیله‌شدن را دارند و قرارگیری CpGها در درون توالی پرایمر، از جمله نکاتی هستند که در طراحی پرایمر باید مورد توجه قرار گیرند. طبیعتاً، هر چه تعداد سایت‌هایی که قابلیت متیله‌شدن را دارند در قطعه مورد نظر بیشتر باشد، میزان اختلاف Tm آن با نمونه‌های مرجع غیرمتیله و کاملاً متیله بیشتر می‌شود. این امر موجب تمایز بهتر منحنی‌های ذوب نمونه‌های مجهول می‌شود. در معتبرترین مقالات چاپ‌شده که از فن MS-HRM استفاده شده است، طول آمپلیکون‌ها بین ۱۰۰ تا ۲۰۰جفت‌باز و تعداد سایت‌های متیله‌شونده بالای ۱۶ سایت بوده است[21, 35, 36].

هنگامی که حداکثر حساسیت تشخیص متیله‌شدن مورد نیاز است می‌توان پرایمرها را طوری طراحی کرد که دربردارنده گروه‌های CpG باشند. به‌عبارتی، پس از بی‌سولفیته‌نمودن نمونه‌ها، بازهای سیتوزین غیرمتیله به یوراسیل تبدیل می‌شوند و به‌دنبال آن هنگام اتصال پرایمر دارای گروه‌های CpG به DNAی غیرمتیله، "جفت‌شدن ناجور بازها" وجود خواهد داشت که همین امر میزان بازدهی پرایمر را کاهش می‌دهد. در نتیجه قطعه‌های متیله، به‌شکل کامل به پرایمر اتصال یافته و به‌سهولت تکثیر خواهند شد. همچنین چنانچه CpG در نزدیکی ناحیه '3 پرایمر قرار داده شود، ویژگی آن برای اتصال به DNAی متیله افزایش خواهد یافت[21, 35-38].

سرانجام، منحنی‌های ذوب حاصل از نمونه‌های مجهول با منحنی‌های ذوب استاندارد (منحنی ذوب مربوط به نمونه‌های مرجع که دارای درصد متفاوت و مشخص متیل هستند) مقایسه شده و سپس نتیجه گزارش می‌شود.

نحوه انتخاب طول قطعه و اصول طراحی پرایمر در فن HRM

براساس منابع علمی معتبر و جدید در انتخاب طول قطعه مورد نظر برای تکثیر، موارد زیر باید رعایت شود[2-4, 20, 39]:

الف) طول قطعه بین ۷۰ تا ۳۰۰ نوکلئوتید باشد:

اگر طول قطعه بیشتر از ۳۰۰ باز باشد، احتمال حضور SNPهای ناخواسته در ناحیه مورد نظر افزایش یافته و در نتیجه منحنی‌های حاصل پیچیده می‌شود. همچنین، با افزایش طول قطعه احتمال تشکیل ساختارهای ثانویه برای DNAی دورشته‌ای افزایش می‌یابد که به‌واسطه ساختار متفاوت، الگوی ذوب متفاوتی خواهند داشت.

توصیه می‌شود پس از انتخاب ناحیه مورد نظر، از لحاظ تشکیل ساختارهای ثانویه نیز بررسی شود. برای این منظور باید از سایت DINAMELT استفاده شود، به این نحو که توالی مورد نظر را در ناحیه تعیین‌شده وارد نموده و گزینه Submit انتخاب شود. در نهایت شکل ساختارهای ثانویه به‌همراه میزان ΔG تشکیل هر کدام نمایش داده می‌شود.

لازم به ذکر است که میزان قابل قبول ΔG برای تشکیل ساختارهای ثانویه تا ۱- است.

چنانچه طول قطعه کمتر از ۷۰ نوکلئوتید باشد، میزان اتصال رنگ فلوئورسنس کم بوده و در نهایت ردیابی و ثبت تغییرات رنگ فلوئورسنس مشکل خواهد بود.

ب) در طراحی پرایمر باید موارد زیر در نظر گرفته شود[2-4, 20, 39]:

۱- ناحیه‌ای که پرایمر برای آن طراحی می‌شود نباید داری SNP باشد، زیرا موجب ایجاد منحنی‌های پیچیده می‌شود.

۲- طول پرایمر بین ۲۲ تا ۲۵ نوکلئوتید باشد.

۳- از نرم‌افزارهایی مانند Primer3 و Primer Express® 3.0 برای طراحی پرایمر استفاده شود.

۴- دمای اتصال پرایمرهاباید (T_m) بین ۵۸°C تا ۶۲°C باشد.

۵- اختلاف دمای(T_m) پرایمرهای معکوس و پیشرو بیشتر از ۲°C نباشد.

۶- میزان بازهای GC در پرایمرها بین ۳۰ تا۸۰٪ باشد.

۷- ΔG انتهای '3 پرایمرها بین ۵- تا ۹- باشد. مقادیر بیشتر از ۵- احتمال اتصال انتهای '3 پرایمر را کاهش داده و در نهایت فرآورده‌ای تولید نخواهد شد. مقادیر کمتر از ۹- نیز احتمال تولید فرآورده‌های غیراختصاصی را افزایش می‌دهد.

۸- ΔG تشکیل پرایمر دایمر حداکثر تا ۴- باشد.

۹- تعداد بازهای CG در انتهای '5 بیشتر از سه نباشد.

ΔG، همان انرژی آزاد گیپس است که به هر اندازه‌ای که منفی‌تر باشد نشان‌دهنده خودبه‌خودبودن انجام واکنش (اتصال پرایمر) است.

نحوه کار با نرم‌افزار HRM

مرحله اول: اجرای برنامه با انتخاب گزینه New Run و گزینش High Resolution Melting.

مرحله دوم: انتخاب نوع پلیت با توجه به نوع دستگاه PCR.

مرحله سوم: بازشدن صفحه‌ای جدید پس از تایید مرحله دو، برای واردکردن نام طرح، اطلاعات مربوط به طرح و حجم نهایی نمونه واکنش و کلیک‌کردن گزینه Next.

مرحله چهارم: انتخاب اطلاعات مربوط به شرایط انجام PCR و نوع رنگ فلوئورسنس (رنگ مورد نظر Green و نوع فرآیند HRM انتخاب می‌شود).

در پی انجام این بخش مرحله چهارم با انتخاب گزینه Edit Profile، وارد قسمت مربوط به شرایط انجام PCR می‌شویم که در اینجا گزینه Hold نشانگر مدت‌زمان لازم برای فعال‌شدن آنزیم پلی‌مراز است که اکثراً برای ۲ دقیقه و ۹۵°C تنظیم می‌شود. سپس در گزینه Cycling، دمای واسرشت‌شدن، تعداد چرخه‌ها و دمای اتصال پرایمر تنظیم می‌شود.

در پی آن با استفاده ازگزینه Hi-Res Melt، بازه دمایی (برای نمونه ۹۰°C-۷۰) مورد نظر و میزان افزایش دما (۰/۱ درجه) انتخاب می‌شود و در قسمت Gain Optimization عدد ۷۰ انتخاب می‌شود؛ به این معنی که شدت نور فلوئورسنس از مقدار ۷۰، قابل شناسایی است.

مرحله پنجم: به‌نمایش‌درآمدن اطلاعات واردشده برای کنترل دوباره. در نهایت با انتخاب گزینه Start Run، فرآیند PCR و HRM شروع می‌شود (به jcu.edu.au/cgc/HRMTA_design.pdf مراجعه شود).

آنالیز HRM

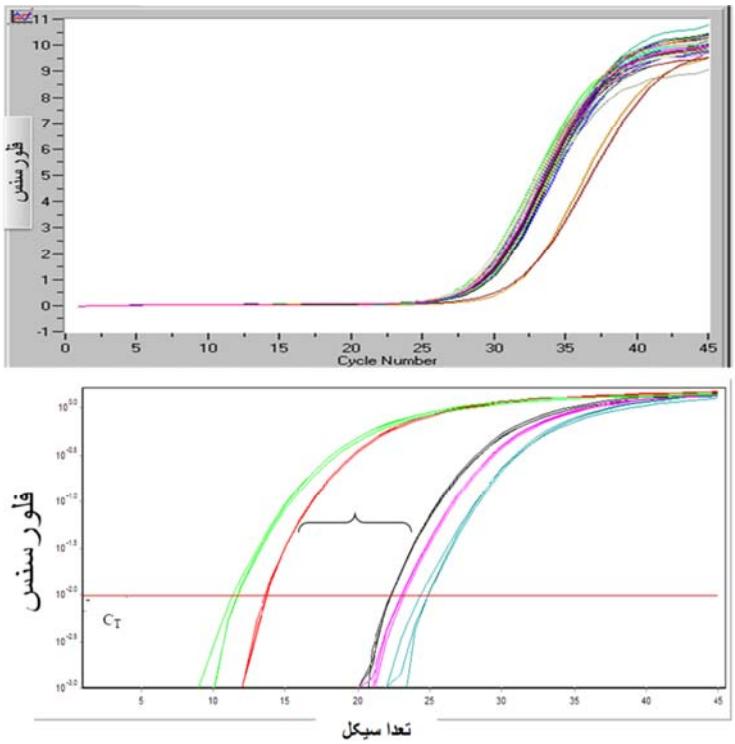
برای آنالیز HRM در حالت کلی ۵ مرحله به‌شرح زیر باید طی شود:

۱- مرحله تکثیر (شکل ۵): به‌منظور تعیین صحت و مناسب‌بودن تکثیر، منحنی تکثیر مورد بررسی قرار می‌گیرد. این منحنی به‌صورت صعودی است، به این صورت که در خلال روند تکثیر و ازدیاد فرآورده‌های PCR، میزان اتصال رنگ فلوئورسنس به فرآورده‌های دورشته‌ای افزایش یافته و جذب فلوئورسنس نیز افزایش می‌یابد. شایان ذکر است که برای آنالیز HRM نکات مهمی باید مورد توجه قرار گیرد؛ به‌ویژه آنکه "بازدهی" منحنی بالای ۱/۴ باشد، به "مرحله تراز" قابل قبولی رسیده باشد و فاصله C_T نمونه‌ها بیشتر از ۳ چرخه نباشد[1, 2, 11, 40]. اگر میزان C_T نمونه‌ها با هم متفاوت باشد بیانگر متفاوت‌بودن غلظت فرآورده‌های PCR است که همین امر موجب پیچیده‌شدن تفسیر خواهد شد

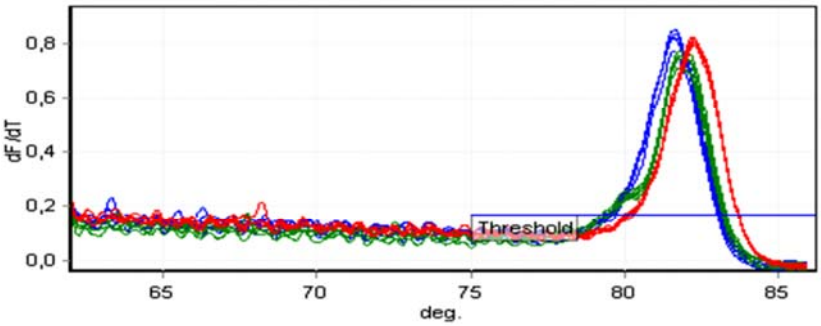
۲- بررسی منحنی ذوب (شکل ۶): این بررسی روی منحنی مشتقی انجام می‌گیرد و هدف آن کسب اطمینان از اختصاصی‌بودن فرآورده‌های مورد نظر است. چنانچه فرآورده‌های غیراختصاصی وجود داشته باشند، حضور منحنی‌های درهم‌رفته و آشفته را شاهد هستیم[1, 2, 11, 40]. منحنی مشتقی براساس منفی مشتق فلوئورسنس تقسیم بر مشتق دما (محور Y) به دما (محور X) رسم می‌شود و اساس آن فرمول (-dF/dT)/T است.

۳- مرحله نرمال‌کردن منحنی ذوب (شکل ۷): در این مرحله از منحنی استاندارد (نه مشتقی) استفاده می‌شود. پس از تعیین محدوده نواحی "پیش‌ذوب" و "پس‌ذوب"، نرم‌افزار ناحیه پیش‌ذوب را به مقدار ۱۰۰ و ناحیه پس‌ذوب را به صفر می‌رساند و یک منحنی نرمال‌شده به‌دست می‌آید. ناحیه پیش‌ذوب ناحیه‌ای است که همه فرآورده‌ها حالت دورشته‌ای دارند و شدت فلوئورسنس حداکثر است و ناحیه

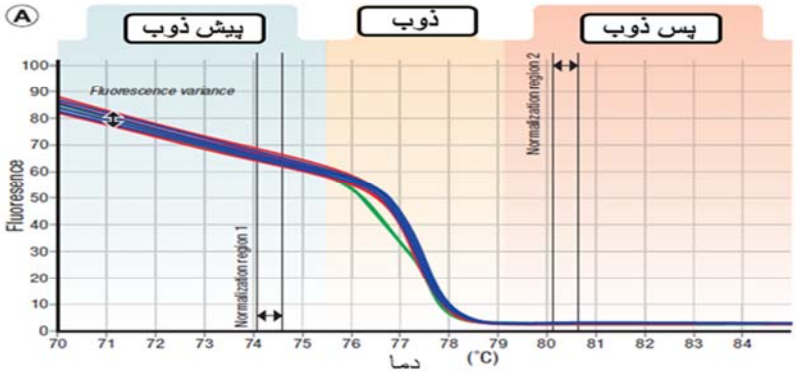
پس‌ذوب ناحیه‌ای است که همه فرآورده‌ها به حالت تک‌رشته درآمده‌اند و دیگر جذب فلوئورسنس وجود ندارد [۱، ۲، ۱۱، ۴۰].



شکل ۵) پیچیدگی و نادرست‌شدن تفسیر با وجود تفاوت بیش از حد استاندارد C_T نمونه‌های مورد بررسی (اختلاف C_T در این نمونه‌ها بیشتر از حد مجاز بوده و بیانگر تفاوت غلظت فرآورده‌ها در نمونه است)



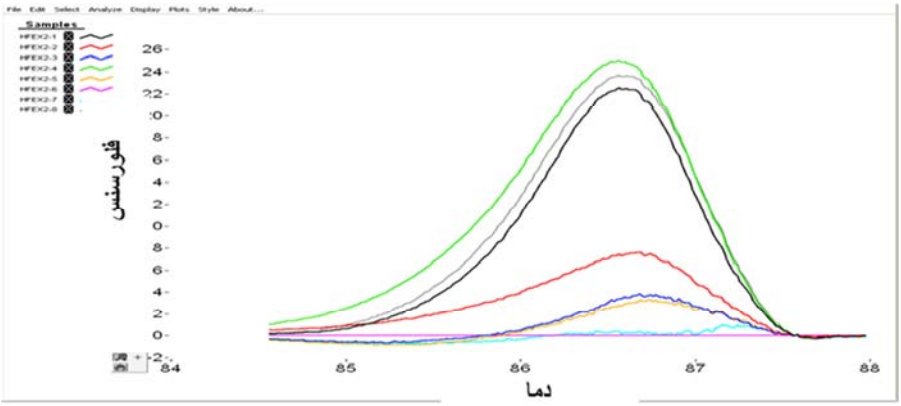
شکل ٦) منحنی ذوب منحنی مشتقی بوده و به‌منظور بررسی اختصاصی‌بودن فرآورده‌های مورد نظر به‌کار می‌رود.



شکل ۷) تعیین محدوده نواحی "پیش‌ذوب" و "پس‌ذوب" توسط نرم‌افزار و ایجاد ناحیه منحنی نرمال‌شده. ناحیه پیش‌ذوب ناحیه‌ای است که همه فرآورده‌ها حالت دورشته‌ای دارند و شدت فلوئورسنس حداکثر است و ناحیه پس‌ذوب ناحیه‌ای است که همه فرآورده‌ها به حالت تک‌رشته درآمده‌اند و دیگر جذب فلوئورسنس وجود ندارد.

۴- منحنی تمایز (شکل ۸): در این مرحله از یک منحنی استاندارد (برای نمونه، منحنی مربوط به A/A) استفاده می‌شود و سایر منحنی‌های به‌دست‌آمده با آن مقایسه می‌شود. به این صورت که نرم‌افزار، منحنی مربوط به نمونه استاندارد را صفر در نظر می‌گیرد و فاصله منحنی مربوط به نمونه‌های مجهول را نسبت به آن تعیین می‌کند. نمودار حاصله به‌شکل زنگوله‌ای بوده و نسبت تغییرات فلوئورسنس به تغییرات دما را نشان می‌دهد[1-3, 11, 40].

۵- خوانش اتوماتیک: در این مرحله دستگاه به‌صورت خودکار ژنوتیپ نمونه‌های مجهول را تعیین می‌نماید و اطلاعات مربوط به ژنوتیپ استاندارد را با ضریب تطابق ٪۹۰ با نمونه مجهول مرتبط می‌سازند. اگر میزان CI کمتر از ٪۹۰ باشد، آن نمونه را به‌عنوان واریانت معرفی می‌کند[1-3, 11, 40].



شکل ۸) مقایسه سایر منحنی‌های به‌دست‌آمده با یک منحنی استاندارد. منحنی مربوط به نمونه استاندارد صفر و فاصله منحنی مربوط به نمونه‌های مجهول نسبت به آن تعیین می‌شود. نمودار حاصله به شکل زنگوله‌ای بوده و نسبت تغییرات فلوئورسنس به تغییرات دما را نشان می‌دهد.

دستگاه‌های HRM

تا سال ۱۹۶۰ برای بررسی رفتار ذوب DNAی دورشته‌ای از پرتوی UV استفاده می‌شد. اساس این روش، اثر هایپرکرومیک است. به این نحو که با افزایش دما فرآورده‌های دورشته‌ای شروع به بازشدن از هم نموده و بازهای موجود در رشته‌ها بیشتر در دسترس قرار می‌گیرند. در نتیجه، میزان جذب UV نیز توسط این بازها بیشتر شده و این روند به‌صورت یک منحنی صعودی ثبت می‌شود. این روش دارای معایبی است. جدول ۲ مقایسه این دو روش را نشان می‌دهد.

جدول ۲) مقایسه فن HRM و روش مبتنی بر UV

تفاوت‌ها	HRM	UV
مقدار DNA مورد نیاز	نانوگرم/ng	میکروگرم/µg
زمان لازم برای ذوب	دقیقه	ساعت
سرعت	۰/۱-۱/۰°C در ثانیه	۰/۱-۱/۰°C در دقیقه

از سال ۱۹۹۷ برای بررسی الگوی ذوب DNAی دورشته‌ای، رنگ‌های فلوئورسنس جایگزین نور UV شدند و سرانجام در سال ۲۰۰۳ با توجه به این جایگزینی، اولین دستگاه HRM با نام High Resolution Melter-1 طراحی شد. به‌مرور زمان و افزایش میزان درخواست برای استفاده از این روش، دستگاه‌های آن از لحاظ دقت، سرعت و میزان گنجایش نمونه، پیشرفت کردند[1, 2]. از جمله این دستگاه‌ها می‌توان به 32LightScanner، Lightscanner 96/384، Light Cycler Roch و Rotor-Gene 6500 HRM اشاره کرد.

نکات قابل اهمیت و توجه خاص در استفاده از فن HRM

۱- طول قطعه‌ای که انتخاب می‌شود حداکثر می‌بایست حاوی ۳۰۰ باز باشد، زیرا آنالیز قطعه‌های بزرگتر از دقت کافی برخوردار نیست. برای نمونه، شناسایی یک چندشکلی در یک رشته ۱۰۰جفت‌باز به‌مراتب راحت‌تر از یک رشته ۵۰۰جفت‌باز است[1, 2, 11, 35].

۲- استفاده از فرآورده‌های خالص PCR. وجود هر گونه ناخالصی از جمله پرایمر دایمر یا فرآورده‌های غیراختصاصی موجب می‌شود که تفسیر نتایج حاصل‌شده با دشواری مواجه شود[1, 2, 11, 35].

۳- استفاده از میزان قابل قبول از فرآورده PCR. داده‌های به‌دست‌آمده اصولاً زمانی قابل قبول است که میزان C_T (چرخه آستانه) رعایت شود. اصولاً نمونه‌هایی که حداکثر تا چرخه ۳۰ ایجاد شده‌اند برای آنالیز مناسب هستند. فرآورده‌های به‌دست‌آمده از چرخه سی‌ام به‌بعد به‌خاطر فرآیندهای "اثرات تخریب الگو" و "مقدار کم الگوی شروع" اصولاً موجب تنوع در نتایج HRM می‌شوند.

۴- کنترل غلظت الگوی واردشونده به واکنش. مقدار الگوی اضافه‌شده به واکنش باید مناسب باشد. تنظیم محدوده C_T زیر ۳، تضمین‌کننده غلظت ورودی الگو در محدوده ۱۰برابر است. به‌عبارتی، باید اختلاف C_T نمونه‌ها بیشتر از ۳ چرخه نباشد.

۵- کنترل فرآورده از بابت حضور نابجای قطعه‌های تکثیرشده غیرهدف. پیش از شروع HRM، بررسی دقیق منحنی‌های مربوط به قطعه‌های تکثیرشده در Real-Time ضروری است. عامل‌هایی مانند کم‌بودن میزان رنگ، حضور مهارکننده و تنظیم نادرست واکنش، بر انجام واکنش تاثیرگذار بوده و نتایج حاصل از HRM را بی‌ارزش یا کم‌دقت می‌نماید[1, 2, 8, 11, 35].

۶- همه نمونه‌ها باید از نظر غلظت DNA و غلظت رنگ یکسان باشند. عامل‌هایی مانند غلظت نمکی محیط، غلظت بافر و غلظت Mg بر الگو و رفتار منحنی ذوب، تاثیر می‌گذارد. بسیار مهم است که برای استخراج DNA از یک روش یکسان و کیت مشخص استفاده شود تا شرایط انجام واکنش در همه نمونه‌ها یکسان باشد. حضور موادی مانند کلریدسدیم، EDTA، ETOH، ایزوپروپانول، سدیم‌سیترات و فنل موجب تغییر الگو و رفتار منحنی ذوب خواهد شد[1, 2, 11, 35].

۷- لوله‌هایی که واکنش در آنها انجام می‌یابد باید یکسان باشد، زیرا جنس و ضخامت لوله‌ها در نتایج HRM، تاثیر می‌گذارد [1, 2, 11, 35].

۸- نوع آنزیمی که به‌کار می‌رود بهتر است از نوع "هات‌استارت" باشد که پس از ۱۰ دقیقه حرارت‌دیدن فعال شود تا از تشکیل پرایمر دایمر جلوگیری شود. کاربرد این آنزیم‌ها موجب افزایش ویژگی و حساسیت واکنش نیز می‌شود[1, 2, 11, 35].

۹- از رنگ‌های فلوئورسنس نسل سوم که منحنی اختصاصی و دقیق ایجاد می‌نمایند استفاده شود. چنانچه پیش‌تر اشاره شد در فن HRM از رنگ‌های فلوئورسنس استفاده می‌شود. از رنگ‌های اولیه که در این تکنیک به‌کار می‌رود می‌توان رنگ SYB^{R}® Green I را نام برد. این رنگ تمایل به اتصال به نواحی غنی از بازهای C و G دارد. به همین خاطر نمی‌توان انتظار داشت که این رنگ به همه نواحی DNA به‌نحو یکسان متصل شود. در نتیجه هنگام جداشدن رنگ، الگوی مناسبی از محتوای بازی رشته هدف، در اختیار پژوهشگر قرار نمی‌گیرد. همچنین به‌کاربردن این رنگ در غلظت‌های بالا دارای اثر مهاری بر واکنش PCR است. ایراد دیگر این رنگ آن است که پس از جداشدن، احتمال دارد دوباره به قطعه دورشته‌ای DNA متصل شود[1, 2, 11, 28, 35, 40].

برای حل چالش‌های مورد اشاره در بالا، امروزه از نسل سوم رنگ‌های فلوئورسنس استفاده می‌شود که محدودیت‌های ذکرشده در بالا را ندارد. از جمله این رنگ‌ها می‌توان به SYTO® 9، GreenLC Green، Eva Green و غیره اشاره نمود [1, 2, 11, 35, 40].

عیب‌یابی واکنش HRM

رخداد خطا و ایجاد مشکل در روند انجام آزمون‌ها امری اجتناب‌ناپذیر است که موجب می‌شود نتایج به‌دست‌آمده از دقت و ارزش کافی برخوردار نباشد. خطاهای احتمالی که در HRM با آنها مواجه می‌شویم معمولاً به‌دلیل بالابودن میزان C_T، بیش از اندازه‌بودن فرآورده PCR یا مربوط به اطلاعات منحنی‌های مذاب مانند عدم انتخاب دقیق دامنه منحنی‌ها و وجود منحنی‌هایی با دامنه ذوب متعدد است.

شایان تاکید است که برای رفع شماری از این مشکلات راه‌کارهایی مطرح شده‌اند که مهم‌ترین آنها در زیر معرفی می‌شود [1, 2, 11, 35, 40]:

۱- تکثیر با تاخیر: برای اکثر نمونه‌ها مقدار C_T بیشتر از ۳۰

واکنش تکثیر احتمالاً به مرحله ثابت نرسیده است و دقت HRM ممکن است با افزایش کم در شدت فلوئورسنس تحت تاثیر قرار گیرد. این مشکل می‌تواند دلایل متعددی مشتمل بر موارد زیر داشته باشد:

الف) پایین‌بودن کیفیت DNA که راه حل آن تکرار استخراج DNA است.

ب) پایین‌بودن میزان DNAی واردشده به واکنش HRM که راه حل آن بهینه‌سازی PCR، افزایش ورودی نمونه به واکنش یا افزایش تعداد چرخه است.

۲- تکثیر با تاخیر برخی از نمونه‌ها: برای برخی از نمونه‌ها مقدار C_T بیشتر از ۳۰

در این حالت مواردی مانند نمونه "خارج از رده" (نمونه‌ای که میزان C_T آن از نمونه‌های دیگر بسیار متفاوت است) و نیز تغییر T_m در منحنی HRM مشاهده می‌شود. تغییر T_m نیز موجب "خوانش متنوع" می‌شود. دلیل این مشکل را می‌توان در موارد زیر جستجو کرد:

الف) حجم واکنش در مورد نمونه "خارج از رده" به‌طور کاملاً واضحی کمتر یا بیشتر از مقدار لازم برای تکثیر باشد که راه حل آن تکرار واکنش HRM، کنترل صحت (یکسان‌بودن) حجم نمونه‌ها در چاهک‌ها، انجام اسپین مختصر پیش از بستن پلیت است.

ب) ناکافی‌بودن میزان DNAی اضافه‌شده به واکنش HRM که راه حل آن تکرار HRM و البته با میزان بیشتر DNA در هر واکنش است.

۳- بازدارندگی PCR: کم‌بودن شیب منحنی تکثیر و بیشتربودن میزان C_T از حد مورد انتظار

در این حالت منحنی تکثیر دارای شیب کم بوده و واکنش تکثیر احتمالاً به مرحله ثابت یا تراز نرسیده است. دقت HRM ممکن است با افزایش کم در فلوئورسنس تحت تاثیر قرار گیرد. بالابودن میزان C_T از میزان قابل انتظار بدین معنی است که میزان تکثیر، کم بوده و در نتیجه میزان C_T بالاتر باشد. منظور از بالابودن C_T آن است که غلظت آمپلیکون‌ها پایین است که علت این مشکل را می‌توان موارد زیر در نظر گرفت:

الف) حضور مواد مهارکننده PCR در نمونه‌های DNA، که راه حل آن رقیق‌کردن نمونه‌ها با نسبت ۱:۱۰ یا ۱:۱۰۰، سپس تکرار HRM است.

ب) غلظت نمکی نادرست که برای رفع آن انجام تیتراسیون $MgCl_2$ برای پیداکردن غلظت نمکی مطلوب برای هر واکنش توصیه می‌شود.

پ) کافی‌نبودن میزان آنزیم در واکنش که می‌توان با اضافه‌کردن آنزیم به‌میزان ۰/۱۵ واحد در ماکولیتر برای هر واکنش آن را مرتفع کرد.

ت) کافی‌نبودن میزان پرایمر در واکنش که راه حل آن اضافه‌کردن مقادیر تا ۰/۵میکرومول از هر پرایمر برای هر واکنش است.

ث) بیشتربودن اندازه قطعه‌ها از ۲۰۰جفت‌باز که با افزایش زمان کشیدگی (اکستنشن) در طول مرحله تکثیر می‌توان با آن مقابله کرد.

ج) اتصال پرایمرها به چندین توالی هدف و تکثیر آنها که با انجام بلاست (BLAST) برای پرایمرها و تعیین ویژگی آنها و در صورت نیاز طراحی دوباره پرایمر، قابل رفع است.

۴- تکثیر غیراختصاصی: کاهش بازدهی و آمپلیکون‌های چندگانه PCR

در این حالت بازدهی PCR کاهش می‌یابد. افزون بر این، حضور همزمان چندین آمپلیکون موجب تغییر رفتار و الگوی منحنی ذوب می‌شود که علت این مشکل را می‌توان موارد زیر در نظر گرفت:

الف) غلظت نمکی نادرست که راه حل آن انجام تیتراسیون $MgCl_2$ برای پیداکردن غلظت مطلوب نمکی برای هر واکنش است.

ب) اتصال پرایمرها به چندین توالی هدف و تکثیر آنها. برای رفع این مشکل، انجام بلاست برای پرایمرها و تعیین ویژگی‌های آنها توصیه می‌شود. افزون بر این در صورت نیاز، پرایمرها باید دوباره طراحی شوند. همچنین می‌توان تعداد چرخه‌های تکثیر را کاهش داد.

۵- نواحی ذوب چندگانه: منحنی‌های ذوب پیچیده با نواحی ذوب چندگانه

شایان تاکید است که تفسیر منحنی‌های ذوب پیچیده با مناطق ذوب چندگانه بسیار دشوار است. این حالت زمانی رخ می‌دهد که طوله قطعه (آمپلیکون) بیشتر از حالت استاندارد باشد که علت این مشکل را می‌توان موارد زیر در نظر گرفت:

الف) حضور چندین چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی در قطعه (در فرآیند ژنوتیپ‌کردن) که راه حل آن مشکل، توالی‌یابی فرآورده PCR برای بررسی تعداد چندشکلی است. چنانچه حضور چندین چندشکلی ثابت شود می‌بایست پرایمرها به‌نحوی طراحی شود که ناحیه‌ای که تکثیر می‌شود تنها دارای یک چندشکلی باشد.

ب) طول آمپلیکون بیشتر از میزان استاندارد است که با طراحی دوباره پرایمر با هدف کاهش اندازه آمپلیکون می‌توان بر آن فایق آمد.

۶- حضور بیش از سه خوانش متنوع:

چنانچه ناحیه مورد بررسی دارای چندین چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی ناشناخته باشد، چندین آمپلیکون هتروزیگوت و هموزیگوت تولید خواهد شد. همچنین اگر طوله قطعه (آمپلیکون) بیشتر از حالت استاندارد باشد، احتمال برخورد با این حالت نیز وجود دارد. خواستگاه این دشواری را می‌توان به موارد زیر نسبت داد:

الف) حضور چندین چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی در قطعه (در تعیین ژنوتیپ)، که برای رفع آن توالی‌یابی فرآیند PCR برای بررسی تعداد چندشکلی‌ها توصیه می‌شود. چنانچه حضور چندین چندشکلی ثابت شود می‌بایست پرایمرها به‌نحوی طراحی شود که ناحیه‌ای که تکثیر می‌شود تنها دارای یک چندشکلی باشد.

ب) طول آمپلیکون بیشتر از میزان استاندارد است که می‌توان با طراحی دوباره پرایمر با هدف کاهش اندازه آمپلیکون، به رفع آن اقدام نمود.

نتیجه‌گیری

HRM روشی بسیار قدرتمند، سریع، جامع و مفید برای به‌کارگیری در آزمایشگاه‌های مولکولی به‌حساب می‌آید که می‌توان آن را راه حلی ساده و سریع برای تعیین ژنوتیپ، ردیابی جهش، تطابق توالی و بررسی الگوی متیلاسیون دانست. تنوع در به‌کارگیری HRM در رویکردهای مطالعاتی متفاوت، سرعت بالا در جواب‌دهی، ارزان‌بودن، برخورداربودن از دقت و اختصاصیت (۱۰۰٪) کافی در مقایسه با دیگر روش‌های مرسوم (مانند SSCP، DGGE و DHPLC) و به‌حداقل‌رسیدن احتمال آلودگی، این فن را در آینده‌ای نه‌چندان دور جایگزین سایر فنون مشابه می‌کند.

تشکر و قدردانی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

1- Erali M, Wittwer CT. High resolution melting analysis for gene scanning. Methods. 2010;50(4):250-61.

2- Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. Exp Mol Pathol. 2008;85(1):50-8.

3- Applied Biosystems. A guide to High Resolution Melting (HRM) analysis. 2012. Available from: http://www.gene-quantification.com/ab-hrm-guide.pdf.
4- Ye MH, Chen JL, Zhao GP, ZHeng MQ, Wen J. Sensitivity and specificity of high-resolution melting analysis in screening unknown SNPsand genotyping a known mutation. Animal Sci Papers Reports. 2010;28(2):161-70.
5- Cho MH, Ciulla D, Klanderman BJ, Raby BA, Silverman EK. High-resolution melting curve analysis of genomic and whole-genome amplified DNA. Clin Chem. 2008;54(12):2055-8.
6- Noori-Daloii MR. Medical molecular genetics in the third millennium. Tehran: Samber Publishing; 2009.
7- Castellanos E, Aranaz A, De Buck J. PCR amplification and high-resolution melting curve analysis as a rapid diagnostic method for genotyping members of the Mycobacterium avium–intracellulare complex. Clin Microbiol Infect. 2010;16(11):1658-62.
8- Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. Pharmacogenomics. 2007;8(6):597-608.
9- Watts AM. High resolution melt analysis: a novel method for studying the genetic relatedness of Pseudomonas aeruginosa isolates from clinical and environmental sources [Dissertation]. Brisbane, Australia: Queensland University of Technology; October 2013.
10- Noori-Daloii MR, Jalilian N. Applications of comparative genomic hybridization in cancer and genetic disorders: A review article. Tehran Uni Med J. 2011;68(1):1-11. [Persian]
11- QIAGEN. Principles of High Resolution Melting (HRM) technology [Cited 2015, 4 July]. Available from: https://www.qiagen.com/ir/resources/technologies/hrm/principle%20of%20hrm%20technology/.
12- Noori-Daloii MR. Emery's elements of medical genetics. 6th editon. Tehran: Jame'e Negar and Salami publishing; 2012.
13- Rubinstein WS. Hereditary breast cancer: pathobiology, clinical translation, and potential for targeted cancer therapeutics. Fam Cancer. 2008;7(1):83-9.
14- Noori-Daloii MR, Ebrahimzade Vesal E. Molecular genetics, diagnosis, prevention and gene therapy in prostate cancer: Review article. Tehran Uni Med J. 2009;67(1):1-14. [Persian]
15- Noori-Daloii MR, Maheronnaghsh R, Sayyah MK. Molecular genetics and gene therapy in esophageal cancer: A review article. Tehran Univ Med J. 2011:69(6):331-43. [Persian]
16- Wang F, Shen H, Guan M, Wang Y, Feng Y, Weng X, et al. High-resolution melting facilitates mutation screening of rpsL gene associated with streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. Microbiol Res. 2011;166(2):121-8.
17- Herrmann MG, Durtschi JD, Wittwer CT, Voelkerding KV. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. Clin Chem. 2007;53(8):1544-8.
18- Takano EA, Mitchell G, Fox SB, Dobrovic A. Rapid detection of carriers with BRCA1 and BRCA2 mutations using high resolution melting analysis. Bio Med cancer. 2008;8:59.
19- Batnyam N, Gantulga A, Oh S. An Efficient Classification for Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Dataset. In: Lee R, editor. Computer and Information Science. Switzerland: Springer International Publishing; 2013. pp. 171-85.
20- Mann T, Humbert R, Dorschner M, Stamatoyannopoulos J, Noble WS. A thermodynamic approach to PCR primer design. Nucleic Acids Res. 2009;37(13):e95.
21- Chen D, Wang YY, Chuai ZR, Huang JF, Wang YX, Liu K, et al. High-resolution melting analysis for accurate detection of BRAF mutations: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep. 2014;4:4168.
22- Guedes JG, Veiga I, Rocha P, Pinto P, Pinto C, Pinheiro M, et al. High resolution melting analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA in KRAS exon 2 wild-type metastatic colorectal cancer. BMC Cancer. 2013;13:169.
23- Gonzalez-Bosquet J, Calcei J, Wei JS, Garcia-Closas M, Sherman ME, Hewitt S, et al. Detection of somatic mutations by high-resolution DNA melting (HRM) analysis in multiple cancers. PloS one. 2011;6(1):e14522.
24- 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. J Mol Diagn. 2009;11(2):140-7.
25- Do H, Krypuy M, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. Bio Med Cancer. 2008;8:142.
26- Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A. 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. Bio Med Cancer. 2006;6:295.
27- Liu Y-P, Wu H-Y, Yang X, Xu H-Q, Chen D, Huang Q, et al. Diagnostic accuracy of high resolution melting analysis for detection of KRAS mutations: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep. 2014;4:7521.
28- Li J, Wang X, Dong R, Yang Y, Zhou J, Yu C, et al. Evaluation of High-Resolution Melting for Gene Mapping in Rice. Plant Mol Biol Rep. 2011;29(4):979-85.
29- Wittwer CT. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. Clin Chem. 2003;49(6 Pt 1):853-60.
30- Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. Clin Chem. 2004;50(10):1748-54.
31- Herrmann MG, Durtschi JD, Wittwer CT, Voelkerding KV. Expanded Instrument Comparison of Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping. Clin Chem. 2007;53(8):1544-8.
32- Martino A, Mancuso T, Rossi AM. Application of high-resolution melting to large-scale, high-throughput SNP genotyping: a comparison with the TaqMan method. J Biomol Screen. 2010;15(6):623-9.
33- Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. Expert Rev Mol Diagn. 2010;10(2):219-40.
34- Janne PA, Borras AM, Kuang Y, Rogers AM, Joshi VA, Liyanage H, et al. A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening. Clin Cancer Res. 2006;12(3 Pt 1):751-8.
35- Wojdacz TK. Methylation-sensitive high-resolution melting in the context of legislative requirements for validation of analytical procedures for diagnostic applications. Expert Rev Mol Diagn. 2012;12(1):39-47.

36- Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): A new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. Nucleic Acids Res. 2007;35(6):e41.
37- Tse MY, Ashbury JE, Zwingerman N, King WD, Taylor SAM, Pang SC. A refined, rapid and reproducible high resolution melt (HRM)-based method suitable for quantification of global LINE-1 repetitive element methylation. BMC Res Notes. 2011;4:565.
38- Zhou L, Wang L, Palais R, Pryor R, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution. Clin Chem. 2005;51(10):1770-7.
39- Abd-Elsalam KA. Bioinformatics tools and guideline for PCR primer design. Afr J Biotechnol. 2003;2(5):91-95.
40- Kapa Biosystems. Introduction to high resolution melt analysis. Cape Town, South Africa: Kapa Biosystems Company; 2015. Available from: https://www.kapabiosystems.com/assets/Introduction_to_High_Resolution_Melt_Analysis_Guide.pdf