

تمییز آل‌های MHC سگ (DLA-DRB1) با روش تحلیل دقیق دمای شکافت DNA

سید میلاد واحدی^۱ شهرام جمشیدی^۱ لیلا لنگرانی مهاجر^۱ غلامرضا نیکبخت بروجنی^{۲*}

۱) گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲) گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۸ آذر ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۳ اسفند ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: نقش مهم مولکول‌های مجتمع عمده پذیرش بافتی (MHC) اتصال به پپتیدهای پادگنی و عرضه آن‌ها به لنفوسیت‌های T است. از اینرو تنوع MHC با حساسیت و یا مقاومت در برابر بسیاری از بیماری‌های عفونی و بیماری‌های خودایمن مرتبط است. یک روش نوین بررسی تنوع ژنتیکی، تحلیل دقیق دمای شکافت DNA (HRM-High Resolution Melting) است که می‌توان آنرا برای بررسی تنوع MHC به کار برد. هدف: تمییز آل‌های MHC سگ (DLA-DRB1) با روش تحلیل دقیق دمای شکافت DNA. روش کار: تعداد ۴۰ نمونه خون از سگ‌های ارجاعی به بیمارستان دام‌های کوچک دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جمع‌آوری گردید. پس از استخراج DNA و افزودن سازی آگزون دوم ژن DLA-DRB1، تحلیل HRM و منحنی ذوب صورت گرفت. برای تطبیق الگوهای HRM با توالی نوکلئوتیدی آل‌ها، از روش تعیین توالی مستقیم استفاده شد. نتایج: بر اساس تنوع مشاهده شده در نتایج HRM و منحنی ذوب، ۴۰ نمونه به ۸ ژنوتیپ (A تا H) قابل تقسیم‌بندی بودند. بیشترین فراوانی مربوط به تیپ A (۲۵/۰۰٪) و سپس تیپ C و E (هر کدام ۱۵/۰۰٪) بود. در مجموع ۸۲/۵٪ نمونه‌ها هتروزایگوت و ۱۷/۵٪ نمونه‌ها هموزایگوت بودند. نتیجه‌گیری نهایی: مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که برای تایید آل‌های ژن DLA-DRB1 از تکنیک HRM استفاده شده است. تطبیق نتایج HRM با توالی آل‌ها نشان داد که این روش می‌تواند برای تفکیک آل‌های DLA-DRB1 به کار رود.

واژه‌های کلیدی: مجتمع عمده پذیرش بافتی، سگ، DLA-DRB1، تحلیل دقیق دمای شکافت

مقدمه

MHC در تمامی گونه‌های جانوری به دلیل فشار انتخابی عفونت‌های نوظهور و سازگار یافته و همچنین مکانیسم‌های پیشگیری از درون همسری (Inbreeding) از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است. نتیجه این انتخاب طبیعی به صورت فقدان نسبی هموزایگوتی در جمعیت‌های طبیعی ظاهر می‌یابد (۲،۴،۱۳). ارتباط هتروزایگوتی با مقاومت افراد در برابر عفونت‌ها، بیماری‌های انگلی، بیماری‌های با واسطه ایمنی و حتی سرطان‌ها به اثبات رسیده است (۱،۸،۱۵،۲۲). حفظ تنوع ژن‌های MHC امر بسیار مهمی است و این تنوع می‌تواند بر اثر کوچک کردن اندازه جمعیت، محدودیت جغرافیایی و انتخاب برای ویژگی‌های فنوتیپی خاص کاهش یابد. درون همسری در سگ‌ها امری شایع است تا به کمک آن ویژگی‌های فنوتیپی مثل اندازه و شکل بدن، رنگ پوشش خارجی و رفتار حیوان حفظ شود. با این وجود، درون همسری اثرات عمیقی بر عملکرد ایمنی داشته و سبب عدم کفایت لازم در برخورد با عفونت‌ها و افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های خودایمن و سرطان می‌شود (۱). وجود برخی از آل‌های ژن DLA-DRB1 با رخداد بیماری‌های مختلف مثل کراتیت سطحی مزمن، هیپوآدرنوکورتیسیسم و لیشمانیوز سگ‌ها مرتبط است. برخی آل‌های DRB1 نیز با مقاومت یا حساسیت در برابر بیماری‌های عفونی مرتبطند (۳،۹،۱۶). این یافته‌ها اهمیت بررسی تنوع آل‌های DLA و بویژه ژن DRB1 را دو چندان می‌سازد.

مجتمع عمده پذیرش بافتی (MHC) نقشی اساسی در پاسخ‌های ایمنی دارد (۱۹). مولکول‌های MHC گلیکوپروتئین‌هایی در سطح یاخته هستند که پپتیدهای پادگنی را به یاخته‌های T عرضه می‌کنند و از این طریق سرنوشت پاسخ‌های ایمنی (هومورال یا یاخته ای) را رقم می‌زنند. مولکول‌های MHC در سگ، DLA (Dog Leukocyte Antigen) نامیده می‌شوند و به سه کلاس تقسیم می‌شوند (۱). مولکول‌های کلاس یک در همه یاخته‌های پیکری و مولکول‌های کلاس دو تنها در یاخته‌های عرض کننده پادگن (APC) بیان می‌شوند. نقش مولکول‌های کلاس سه در عرضه پادگن مشخص نشده است (۲۰). ژن‌های رمز کننده مولکول‌های MHC در سگ، بر روی کروموزوم ۱۲ قرار دارند و ساختار آن‌ها شبیه انسان است (۱). ژن‌های کلاس دو در سگ یک ژن عملکردی DQA (DLA-DQA) دارد که با ژن DQA انسان ارتولوگ است. ژن عملکردی DQB به نام DLA-DQB نیز در سگ شناخته شده که با DQB انسان ارتولوگ است. ژن‌های عملکردی DRA، DRB (DLA-DRB) و ژن کاذب DRB2 در ناحیه DR قرار دارند. تا کنون حدود ۹۰ آل برای DLA-DRB1، ۲۲ آل برای DLA-DQA و ۵۴ آل برای DLA-DQB شناسایی شده است (۱،۲۲). ژن DRB1 سگ (ارتولوگ DRB1 انسان) متغیرترین بخش از MHC کلاس دو سگ است.



افزوده گردید. طول محصول نهایی ۱۳۸ باز بود.

برنامه PCR مرحله اول به صورت Touch down در دستگاه ترموسایکلر شرکت Eppendorf انجام شد: مرحله اول واسرشت اولیه، 95°C به مدت ۲ min. مرحله دوم شامل ۱۵ چرخه و هر چرخه شامل سه گام: گام اول واسرشت 95°C به مدت ۳۰ s. گام دوم اتصال آغازگرها $65/3^{\circ}\text{C}$ به مدت ۳۰ s که در هر چرخه $0/5^{\circ}\text{C}$ کاهش می‌یابد. گام سوم بسط 72°C به مدت ۳۰ s.

برنامه PCR مرحله دوم به صورت زیر در دستگاه Real time شرکت Qiagen انجام شد: مرحله اول واسرشت اولیه، 95°C به مدت ۲ min. مرحله دوم شامل ۳۰ چرخه و هر چرخه شامل سه گام: گام اول واسرشت 95°C به مدت ۳۰ s. گام دوم اتصال آغازگرها $59/8^{\circ}\text{C}$ به مدت ۳۰ s. گام سوم بسط 72°C به مدت ۲۰ s. مرحله سوم بسط نهایی 72°C به مدت ۵ min.

در نهایت به منظور رویت نتایج حاصل از واکنش PCR و ارزیابی کیفیت و طول قطعه تکثیر شده، $10\ \mu\text{l}$ محصول دور دوم به همراه $1\ \mu\text{l}$ بافر بارگزاری X6 به مدت ۴۵ min با ولتاژ $80\ \text{V}$ روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. پس از آن ژل با اتیدیوم بروماید ($1\ \mu\text{l}/\text{ml}$) رنگ آمیزی و قطعات ۱۳۸ جفت بازی به صورت باندهای فلورسنت در دستگاه UV ترانس ایلومیناتور مشاهده شد.

از محصول PCR مرحله دوم جهت تحلیل HRM و Melt Curve استفاده شد. تحلیل HRM و Melt Curve در دستگاه Real-time Rotor-Gene Q شرکت Qiagen صورت گرفت. محدوده دمایی داده شده جهت تحلیل HRM 50°C تا 95°C در نظر گرفته شد. پس از نرمالایز کردن نمودارهای حاصل از تحلیل HRM نمونه‌های مشابه با درصد اطمینان بالای ۹۰٪ در یک گروه قرار داده شد. تحلیل Melt Curve هم در محدوده دمایی 70°C تا 98°C صورت گرفت.

محصولات افزوده سازی هر یک از الگوهای HRM بدست آمده برای تطبیق با توالی نوکلئوتیدی جهت تعیین توالی ارسال شدند. تعیین توالی توسط موسسه الفاسکوئنس (کانادا) با دستگاه توالی یاب خودکار DNA (۳۷۳۰ XL) ABI و با روش خاتمه‌دهنده رنگی انجام شد. شناسایی توالی‌ها با استفاده از BLASTn وب سایت NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc>) صورت گرفت. توالی‌های DRB1 به دست آمده توسط نرم افزار Bio Edit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) با توالی‌های مرجع ثبت شده در سایت IPD (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/dla/index.html>) مقایسه شدند.

نتایج

افزوده‌سازی آگزون دوم ژن DLA-DRB1: پس از استخراج نمونه‌های خون، وجود محتوای DNA و کیفیت سه نمونه توسط دستگاه نانودراپ A&D مورد بررسی قرار گرفت. غلظت DNA و جذب نوری

تاکنون روش‌های گوناگونی برای بررسی تنوع و ژنوتایپینگ آل‌های MHC مورد استفاده قرار گرفته است که عبارتند از: روش‌های سرولوژیک، کشت مخلوط لنفوسیت‌ها، PCR-RFLP، ایزوالکتربیک فوکوسینگ، PCR-SSCP، توالی یابی مستقیم، نسل آتی تعیین توالی (Next Generation Sequencing)، تحلیل هتروdupلکس (Heteroduplex analysis)، استفاده از الیگونوکلئوتیدهای اختصاصی و استفاده از ریزماهوره‌ها. یکی از روش‌های نوین، تحلیل دقیق دمای شکافت (HRM-High Resolution Melting) DNA است. از آنجایی که بر خلاف روش‌های قدیمی بنای این روش بر مقایسه چشمی کاربر نیست، خطای انسانی در آن کمتر است و نتایج معتبری از لحاظ تکرار پذیری و تجدید پذیری ارائه می‌دهد (۱۷، ۱۲). هدف از مطالعه حاضر تمییز آل‌های ژن DLA-DRB1 با استفاده از روش HRM بوده است.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه و استخراج DNA: از تعداد ۴۰ سگ ماده ارجاعی به بیمارستان دام‌های کوچک دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که در معاینه بالینی سالم بودند، نمونه خون کامل جمع‌آوری و در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ذخیره گردید. نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA در 20°C نگهداری شدند و سپس جهت استخراج DNA به آزمایشگاه ایمنی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انتقال یافتند. اطلاعات مربوط به نمونه‌های جمع‌آوری شده در جدول ۱ نشان داده شده است. استخراج DNA از نمونه‌های خون با کیت تجاری i-genomic Blood DNA Extraction Mini Kit (شرکت Intron, Korea) و طبق دستورالعمل کیت انجام شد. نمونه‌ها تا زمان آزمایش در 20°C نگهداری شدند.

افزوده‌سازی آگزون دوم DLA-DRB1 (افزوده‌سازی آگزون دوم DLA-DRB1 جهت آزمون HRM): به منظور بررسی تنوع با روش HRM از آزمون Nested-PCR برای افزوده‌سازی آگزون دوم ژن DLA-DRB1 استفاده شد. واکنش در حجم نهایی $25\ \mu\text{l}$ شامل $20\ \text{ng}$ DNA ژنومی، $10\ \text{pM}$ از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی (در مرحله اول از پرایمرهای Kennedy و همکاران در سال ۲۰۰۸: GAT: DRBF: CCC CCG CTG: DRBR3 و CGC CCC GTC CCC ACA G و در مرحله دوم از پرایمرهای طراحی شده؛ CGC TCA DRBF: CCC و CGC TCC CCA CAG: DRBTR1) و $200\ \text{mM}$ dNTPs و یک واحد آنزیم Taq (سیناکلون، ایران) صورت گرفت. واکنش PCR مرحله دوم با تغییر غلظت کلرید منیزیم ($2/5\ \text{mM}$) و آغازگرهای با شرایط مشابه مرحله اول انجام شد. به منظور انجام آزمون HRM یک EvaGreen® Dye، $1\ \mu\text{l}$ (Biotium, Germany) با غلظت $2/5\ \text{Mm}$ ، نیز به واکنش مرحله دوم



تحلیل Melt curve، بر اساس تنوع مشاهده شده تعداد ۴۰ نمونه به ۸ ژنوتیپ (A تا H) تقسیم‌بندی شدند (تصویر ۱). بیشترین فراوانی در جمعیت مورد مطالعه مربوط به تیپ A (۲۵/۰۰٪) و سپس تیپ C و E (هر کدام ۱۵/۰۰٪) بود.

بر اساس تحلیل Melt curve و HRM، ۸۲/۵٪ نمونه‌ها هتروزیگوت و ۱۷/۵٪ نمونه‌ها هوموزیگوت بود. در تحلیل Melt curve نمونه‌های هتروزیگوت دارای دو پیک دمایی و نمونه‌های هوموزیگوت دارای یک پیک دمایی هستند (تصویر ۲). وجود دو پیک دمایی نشان دهنده ذوب هر یک از رشته‌های DNA با ترکیب نوکلئوتیدی متفاوت (هتروزیگوتی) است. در حالی که در نمونه هوموزیگوت به دلیل مشابه بودن دو رشته DNA تنها یک پیک دمایی دیده می‌شود. همینطور در تحلیل HRM نمونه‌های هوموزیگوت به صورت تک شیب دیده می‌شوند در حالیکه نمونه‌های هتروزیگوت دارای دوشیب و به صورت پلکانی هستند (تصویر ۳، ۴).

تعیین توالی: در نتایج تعیین توالی تمامی نمونه‌ها جز یک نمونه هتروزیگوتی را نشان دادند (تصویر ۵). جدول ۲ فراوانی ژنوتیپ و ارتباط آن‌ها با نتایج بررسی توالی‌ها از لحاظ هوموزیگوتی و هتروزیگوتی نشان می‌دهد. الگوی HRM برای تحلیل موارد هتروزیگوت و هوموزیگوت استفاده شد و نمونه هوموزیگوت شناسایی شده در HRM در تعیین توالی هوموزیگوتی و نمونه هتروزیگوت شناسایی شده در HRM در تعیین توالی هتروزیگوتی را نشان داد (تصویر ۶).

بحث

مولکول‌های MHC مسئول عرضه پپتیدهای پادگنی به لنفوسیت‌های T هستند و یاخته‌های T تنها پس از شناسایی پپتیدها در کنار MHC پاسخ ایمنی را آغاز می‌کنند. اگرچه ژن‌های MHC کلاس I در همه یاخته‌ها بیان می‌شوند اما پاسخ ایمنی مناسب نیازمند عرضه پپتیدهای آنتی‌ژنی توسط مولکول‌های MHC کلاس دو به یاخته‌های T است (۵). عملکرد این مولکول‌ها به میزان زیاد به ساختمان مولکولی آن‌ها وابسته است. در تمام گونه‌های جانوری ژن‌های MHC از متنوع‌ترین ژن‌ها محسوب می‌شوند و در هر فرد بصورت هم‌غالب بروز می‌یابند. بدین ترتیب بر تعداد مولکول‌های MHC در دسترس برای اتصال به آنتی‌ژن‌های پپتیدی و عرضه آن‌ها به یاخته‌های T افزوده می‌شود (۱۸). از سوی دیگر مولکول‌های MHC نقش مهمی در مبارزه با ویروس‌ها و دفاع در برابر تومورها دارند و تنوع بیشتر آن‌ها با مقاومت در برابر بسیاری از بیماری‌های عفونی و با واسطه ایمنی همچون برخی سرطان‌ها در ارتباط است (۱۱).

بررسی ژنتیک جمعیت نشان داد که بیش از ۸۰٪ از جمعیت مورد مطالعه هتروزیگوت هستند. طبق مطالعات صورت گرفته هتروزیگوتی می‌تواند سبب افزایش مقاومت در برابر برخی از بیماری‌ها شود. (۸، ۱۵، ۲۲). در این مطالعه بیشترین فراوانی مربوط به آلل تیپ A و سپس تیپ C و

جدول ۱. اطلاعات نمونه‌های جمع‌آوری شده جهت بررسی پلی مورفیسم ال‌های ژن DLA-DRB۱.

ژنوتیپ	تعداد نمونه	میانگین سنی گروه کنترل	نژاد
A (٪۲۱/۰۵)	۱۹	۸ سال و ۸ ماه	Terrier انواع C (٪۲۱/۰۵) F (٪۱۵/۷۹) B (٪۱۰/۵۳) E (٪۱۰/۵۳) G (٪۱۰/۵۳) D (٪۵/۲۶) H (٪۵/۲۶)
A (٪۳۰/۰۰)	۱۰	۸ سال و ۶ ماه	Shih Tzu E (٪۳۰/۰۰) G (٪۲۰/۰۰) C (٪۱۰/۰۰) F (٪۱۰/۰۰)
A (٪۵۰/۰۰)	۴	۱۱ سال و ۶ ماه	German Shepherd B (٪۲۵/۰۰) H (٪۲۵/۰۰)
A (٪۲۵/۰۰)	۴	۱۱ سال	Pekignese B (٪۲۵/۰۰) C (٪۲۵/۰۰) H (٪۲۵/۰۰)
D (٪۵۰/۰۰)	۲	۷ سال و ۹ ماه	Great Dane F (٪۵۰/۰۰)
E (٪۱۰۰/۰۰)	۱	۱۱ سال و ۶ ماه	Chihuahua

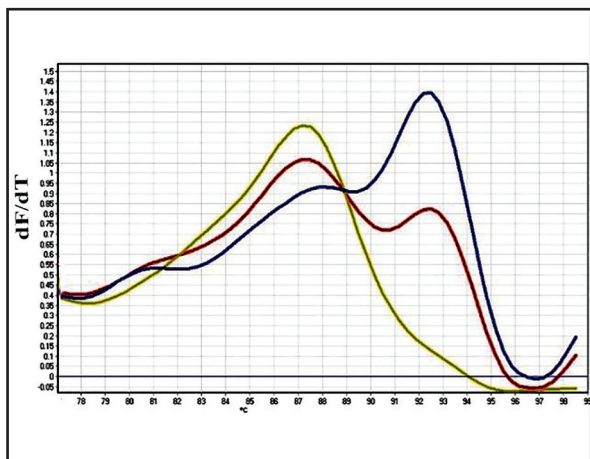
جدول ۲. ارتباط نتایج به دست آمده از تحلیل توالی‌های ژن DLA-DRB۱ و تیپ‌های HRM.

ژنوتیپ	هوموزیگوتی یا هتروزیگوتی در توالی یابی	فراوانی (٪)
A	هوموزیگوت	۲۵/۰۰
B	هتروزیگوت	۱۰/۰۰
C	هتروزیگوت	۱۵/۰۰
D	هتروزیگوت	۵/۰۰
E	هتروزیگوت	۱۵/۰۰
F	هتروزیگوت	۱۲/۵۰
G	هتروزیگوت	۱۰/۰۰
H	هتروزیگوت	۲/۵۰

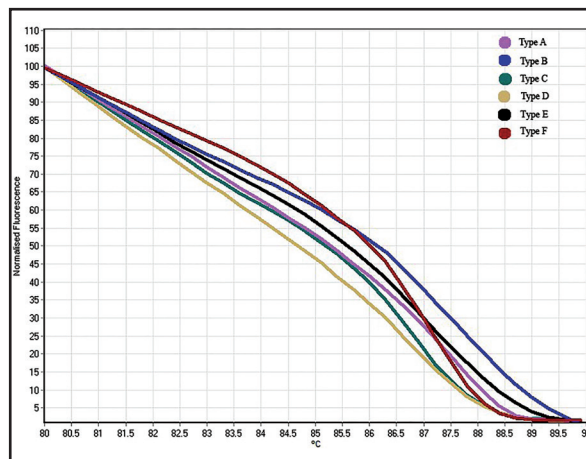
۲۶۰/۲۸۰ nm جهت بررسی خلوص DNA و آلودگی‌های فنولی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. غلظت DNA در تمامی نمونه‌ها بالای ۵۰ ng/μl و جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ nm نزدیک به ۱/۹ بود. افزوده‌سازی ژن DLA-DRB۱ جهت تحلیل HRM و تعیین توالی به صورت Nested-PCR و توسط پرایمرهای طراحی شده انجام شد.

تحلیل HRM و Melt curve: بر اساس نتایج تحلیل HRM و

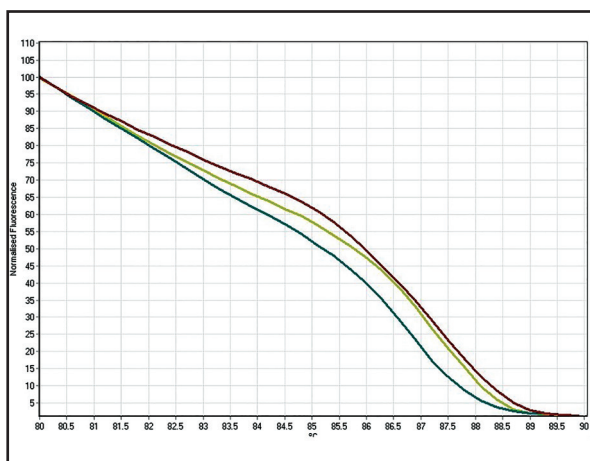




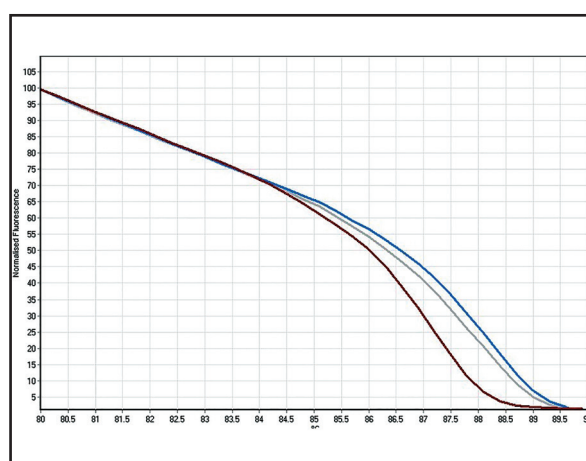
تصویر ۲. تحلیل Melt curve. نمونه‌های آبی و قرمز هتروزیگوتی و نمونه زرد هوموزیگوتی را نشان می‌دهد.



تصویر ۱. ژنوتیپ‌های مختلف به دست آمده از تحلیل HRM.



تصویر ۴. نمایشی از نمونه‌های هتروزیگوت شناسایی شده در تحلیل HRM.



تصویر ۳. نمایشی از نمونه‌های هوموزیگوت شناسایی شده در تحلیل HRM.

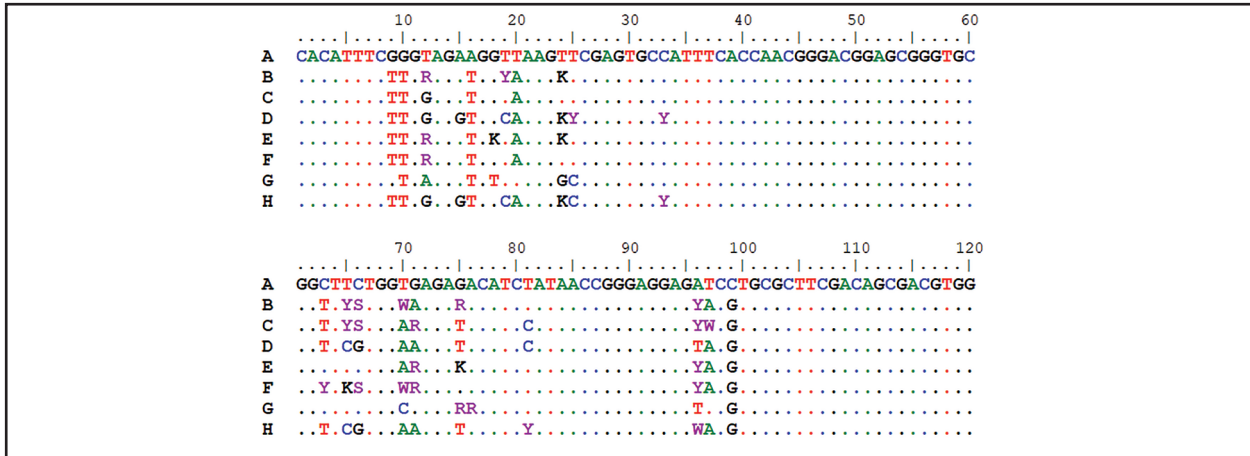
پاسخ‌های ایمنی حائز اهمیت است.

به منظور تعیین تنوع جایگاه ژنی مذکور، از روش‌های مختلف جهت ارزیابی چندشکلی استفاده می‌شود که پیش‌تر به آن‌ها اشاره شد (۲۱، ۱۴، ۷). یکی از این روش‌ها، روش HRM و تعیین توالی مستقیم DNA بر روی محصول PCR می‌باشد که نتایج قابل قبول‌تر و مطمئن‌تری ارائه می‌دهد (۱۷، ۱۲). در این مطالعه برای اولین بار از این روش به طور اختصاصی جهت ارزیابی تنوع آللی اگزون دوم این ژن در سگ استفاده شد. شایان ذکر است روش رایج در سایر مطالعات اغلب PCR-RFLP یا PCR-SSCP می‌باشند که چون براساس مقایسه چشمی کاربر صورت می‌گیرند، احتمال خطای انسانی در آن‌ها بالاست و به تجربه و دقت نظر بالا نیاز دارند. از سوی دیگر مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که جهت تایید آلل‌های ژن DLA-DRB1 از تکنیک HRM استفاده شده است. گرچه تا کنون مطالعاتی هر چند اندک در انسان جهت تایید آلل‌های آنتی‌ژن لکوسیتی صورت گرفته است (۱۲، ۶).

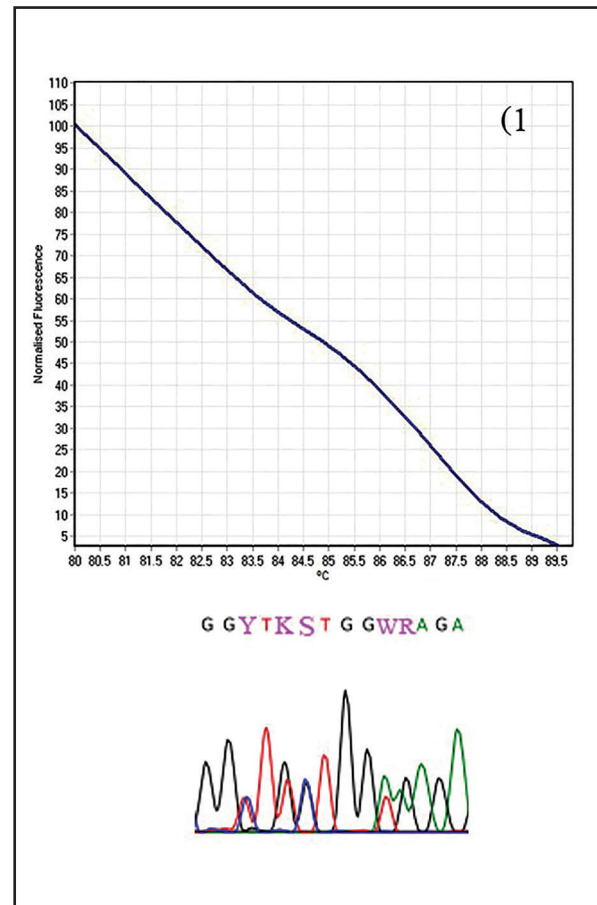
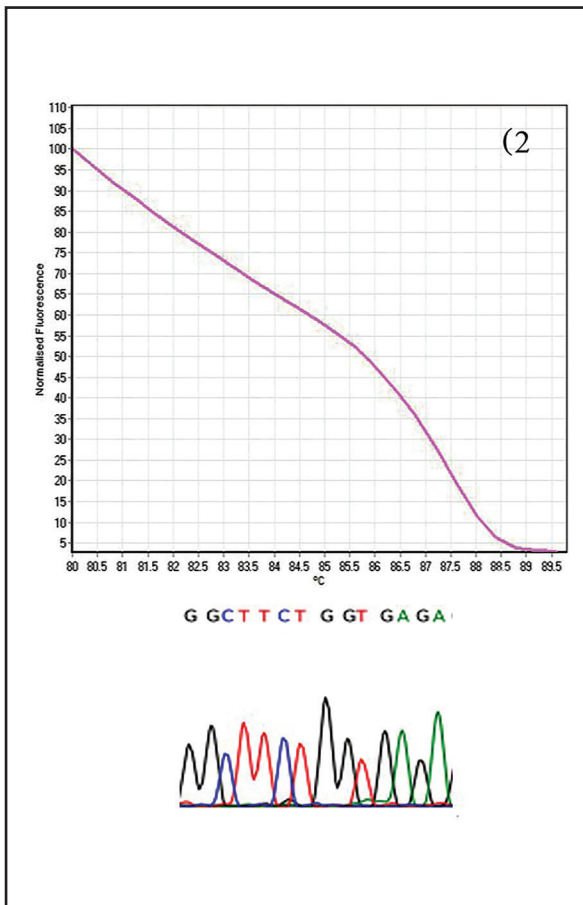
تحلیل توالی‌ها در تحلیل HRM و Melt curve می‌تواند نگاهی اجمالی از توالی اسیدهای آمینه بیان شده داشته باشد. تأیید نتایج HRM

E بود که حاکی از این موضوع است که به نظر می‌رسد چند آلل خاص، واجد بیشترین فراوانی (بیشتر از ۵۰٪) در جمعیت سگ‌های مورد مطالعه هستند. دو ژنوتیپ A و C بیشترین فراوانی را در نژاد تریر و دو ژنوتیپ A و E بیشترین فراوانی را در نژاد شیتزو داشتند و مجموع فراوانی دو ژنوتیپ A و C در نژاد تریر بیشتر از ۴۰٪ و مجموع دو ژنوتیپ A و E در نژاد شیتزو بیشتر از ۶۰٪ بوده است. با بررسی نژاد ژرمن شپرد می‌توان به غلبه ژنوتیپ A پی برد. در این تحقیق تنوع و خصوصیات ژنتیکی آلل‌های MHC مربوط به ناحیه کد کننده اگزون دوم ژن DLA-DRB1 در سگ‌های ایران نیز بررسی شد. بررسی تنوع آلل‌های MHC کلاس دو از جنبه‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است. این بخش از MHC تنوع قابل ملاحظه‌ای دارد تا عرضه آنتی‌ژن‌های مختلف امکان‌پذیر گردد و در همین حال ارتباط آلل‌های آن با حساسیت/مقاومت به بیماری‌های مختلف شناسایی شده است. هرچه تنوع مولکول‌های MHC بیشتر باشد، افراد می‌توانند با طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا مقابله نمایند. در مطالعه تنوع حساسیت به بیماری‌ها، مشخص نمودن تنوع MHC و تعیین ارتباط آن با واکنش‌ها و





تصویر ۵. هم‌ردیفی توالی‌های ژنوتیپ‌های ژن DLA-DRB1 مختلف که بر روی آن‌ها تحلیل HRM انجام شد.



تصویر ۶. تأیید نتایج HRM توسط سکانسینگ در دو نمونه هوموزیگوت و هتروزیگوت (نمونه ۱ هتروزیگوتی و نمونه ۲ هوموزیگوتی را نشان می‌دهد).

MHC کلاس I پیشنهاداتی است که می‌توان در مطالعات آتی از آن‌ها استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری صمیمانه و زحمات مهندس خرمالی سپاسگزاری می‌شود.

توسط سکانسینگ در این مطالعه نشان داد که این روش می‌تواند جهت شناسایی آل‌های MHC مورد استفاده قرار گیرد. چنانکه بتوان با توالی‌یابی و تشخیص آل‌ها برای هر یک الگوی مشخص HRM تعریف نمود تا در مطالعات بعد تنها با استفاده از تحلیل HRM بتوان نوع آل را به راحتی مشخص نمود. تحقیق بر روی سایر نژادها با توجه به تنوع نژادی بالا در سگ و همچنین مطالعه بر روی سایر ژن‌های MHC کلاس دو و ژن‌های



References

- Angles, J.M., Kennedy, L.J., Pedersen, N.C. (2005) Frequency and distribution of alleles of canine MHC-II DLA-DQB1, DLA-DQA1 and DLA-DRB1 in 25 representative American Kennel Club breeds. *Tissue Antigens*. 66: 173-184.
- Apanius, V., Penn, D., Slev, P.R., Ruff, L.R., Potts, W.K. (1997) The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Crit Rev Immunol*. 17: 179-224.
- Barrientos, L.S., Zapata, G., Crespi, J.A., Posik, D.M., Diaz, S., It, V., Peral-Garcia, P., Giovambattista, G. (2013) A study of the association between chronic superficial keratitis and polymorphisms in the upstream regulatory regions of the DLA-DRB1, DLA-DQB1 and DLA-DQA1. *Vet. Immunol Immunopathol*. 15(156): 3-4.
- Bernatchez, L., Landry, C. (2003) MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *J Evol Biol*. 16: 363-77.
- Chaudhuri, S., Cariappa, A., Tang, M., Bell, D., Haber, D.A., Isselbacher, K.J., Finkelstein, D., Forcione, D., Pillai, S. (2000) Genetic susceptibility to breast cancer: HLA DQB*03032 and HLA DRB1*11 may represent protective alleles. *PNAS*. 97(21): 11451-11454.
- Cui, G., Zhang, L., Xu, Y., Cianflone, K., Ding, H., Wang, D.W. (2013) Development of a high resolution melting method for genotyping of risk HLA-DQA1 and PLA2R1 alleles and ethnic distribution of these risk alleles. *Gene*. 514(2):125-130.
- De, S. Singh, R.K., Butchaiah, G. (2002) MHC-DRB exon 2 allele polymorphism in Indian River buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Genet*. 33(3):215-219.
- Dyggve, H., Kennedy, L.J., Meri, S., Spillman, T., Lohi, H., Speeti, M. (2011) Association of Doberman hepatitis to canine major histocompatibility complex II. *Tissue Antigens*. 77(1):30-35.
- Hughes, A.M., Jokinen, P., Bannasch, D.L., Lohi, H., Pberbauer, A.M. (2010) Association of a dog leukocyte antigen class II haplotype with hypoadrenocorticism in Nova Scotia Duck Tolling Retrievers. *Tissue Antigens*. 75(6):684-690.
- Kennedy, L.J., O'Neill, T., House, A., Barnes, A., Kyostila, K., Innes, J., Frestwell, N., Day, M.J., Catchpole, B., Lohi, H., Ollier, W.E. (2008) risk of anal furunculosis in German shepherd dogs is associated with the major histocompatibility complex. *Tissue Antigens*. 71(1):51-56.
- Lin, Z., Xin, Y., Dong, Q., Wang, Q., Jiang, X., Zhan, S., Sun, Y., Xuan, S. (2010) Association between HLA-DRB1 alleles polymorphism and hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *BMC Gastroenterol*. 10:145.
- Lundgren, A., Kim, S., Stadnisky, M.D., Brown, M.G. (2012) Rapid discrimination of MHC class I and killer cell lectin-like receptor allele variants by high-resolution melt analysis. *Immunogenetics*. 64:633-640.
- Paterson, S. (1998) Evidence for balancing selection at the major histocompatibility complex in a free living ruminant. *J Hered*. 89: 289-94.
- Pipalia, D.L., Joshi, C.G., Rank, D.N., Brahmshktri, B.P. and Solanki, J.V. (2004) PCR-SSCP typing of MHC in cattle and buffaloes. *Indian J Anim Sci*. 74(6): 637-639.
- Planelles, D., Nagore, E., Moret, A., Botella-Estrada, R., Vila, E., Guille'n, C., Montoro, J.A. (2006) HLA class II polymorphisms in Spanish melanoma patients: homozygosity for HLA DQA1 locus can be a potential melanoma risk factor. *Br J Dermatol*. 154:261-266.
- Quinnell, R.J., Kennedy, L.J., Barnes, A., Courtenay, O., Dye, C., Garcez, L.M., Shaw, M., Carter, S.D., Thomson, W., Ollier, W.E.R. (2003) Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*. 55: 23-8.
- Takeshima, S., Ikegami, M., Morita, M., Nakai Y., and Aida Y. (2001) Identification of New Cattle BoLA-DRB3 Alleles by Sequence-Based Typing. *J. Immunogenetics*, 53(1), 74-81.
- Tizard, I. R. (2009) *Veterinary Immunology*. (9th ed.) Saunders, Philadelphia, USA. p. 70-81.
- Wagner, J.L. (2003) Molecular Organization of the Canine Major Histocompatibility Complex. *J*



- Hered. 94(1):23-26.
20. Wagner, J.L., Burnett, R.C., Storb, R. (1999) Organization of the canine major histocompatibility complex current perspectives. The American genetic association. 90:35-38.
 21. Wenink, P.W., Groen, A.F., Roelke-Parker, M.E. and Prins, H.H. (1998) African buffalo maintain highgenetic diversity in the major histocompatibility complex in spite of historically known population bottlenecks. *Molecular Ecol.* 7: 1315-132.
 22. Wilbe, M., Jokinen, P., Hermanrud, C., Kennedy, L.J., Strandberg, E., Hansson-Hamlin, H., Lohi, H., Andersson, G. (2009) MHC class II polymorphism is associated with a canine SLE-related disease complex. *Immunogenetics.* 61:557-564.
 23. Zhou, L., Vandersteen, J., Wang, L., Fuller, T., Taylor, M., Palais, B., Wittwer, C.T. (2004) High-resolution DNA melting curve analysis to establish HLA genotypic identity. *Tissue Antigens.* 64(2):156-64.



Allelic Discrimination of Canine MHC (DLA-DRB1) by High Resolution Melt Analysis

Vahedi, S.M.¹, Jamshidi, Sh.¹, Lankarani Mohajer, L.¹, Nikbakht Brujeni, Gh.^{2*}

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

²Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

(Received 29 November 2017, Accepted 14 March 2018)

Abstract:

BACKGROUND: The function of molecules of major histocompatibility complex (MHC) is to bind antigenic peptides and display them on the cell surface for recognition by T cells. MHC polymorphism is related to susceptibility or resistance to immune-mediated and infectious diseases. High Resolution Melt (HRM) analysis is a novel and powerful technique in molecular biology for the detection of genetic polymorphisms and can be used for discrimination of MHC alleles and genotyping. **OBJECTIVES:** Discrimination of dog MHC alleles (DLA-DRB1) by high-resolution melt analysis. **METHODS:** Forty blood samples were collected from dogs referred to Small Animal Teaching Hospital of faculty of veterinary medicine, University of Tehran. After DNA extraction and amplification the exon 2 of DLA-DRB1, HRM and Melt Curve analysis was carried out. Direct sequencing was used for checking the HRM patterns. **RESULTS:** Following the HRM and Melt curve analysis, forty samples could be classified into 8 genotypes (A to H). Most frequent was A (25.00%) and then C and E (each one 15.00%). In total, 82.5% and 17.5% of samples were heterozygote and homozygote, respectively. **CONCLUSIONS:** In this study, the HRM technique was used for DLA-DRB1 gene alleles typing for the first time. Confirmation HRM results through sequencing results revealed that HRM can be used for discrimination of DLA-DRB1 alleles.

Keyword: MHC, dog, DLA-DRB1, HRM

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Samples information collected for determination of DLA-DRB1 alleles.

Table 2. Relationship between results of DLA-DRB1 sequences and HRM types.

Figure 1. Different types of HRM achieved following high resolution melting analysis.

Figure 2. Melt curve analysis, blue and red samples show heterozygote and the yellow ones indicates homozygote.

Figure 3. The homozygote samples which were identified in HRM analysis.

Figure 4. The heterozygote samples which were identified in HRM analysis.

Figure 5. Alignment of genotypes sequences.

Figure 6. The confirmation of HRM by sequencing in two homozygote and heterozygote samples (the sample 1 and sample 2 shows heterozygote and homozygote respectively).

*Corresponding author's email: nikbakht@ut.ac.ir, Tel: 021-61117057, Fax: 021-66427517

