DOI: 10.22055/ivj.2026.560799.2869

ژنوتایپینگ مجتمع عمده پذیرش بافتی طیور با روش تحلیل دقیق دمای شکافت

عمار رمضانی[۱]، غلامرضا نیکبخت‌بروجنی[۲*]، نریمان شیخی[۳] و کاوه پروندار اسدالهی[۳]

[۱] دانشجوی دکترای تخصصی ایمنی‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] استاد گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

[۳] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۳

چکیده

مجتمع عمده پذیرش بافتی (MHC) در طیور با عنوان جایگاه ژنی B یا گروه خونی سرولوژیکی مسئول کنترل مقاومت به بیماری‌ها از جمله بیماری‌های خود ایمن، ویروسی، باکتریائی و انگلی است. ریزماهواره LEI0258 به عنوان یک شاخص معتبر برای تایپینگ MHC بافتی طیور می‌تواند برای تعیین هویت جمعیت‌های مختلف و ویژگی‌های فردی یا نژادی در مطالعات آکادمیک و کاربردی استفاده شود. در این تحقیق از روش تحلیل دقیق دمای شکافت (HRM) برای تعیین ژنوتیپ‌های MHC مبتنی بر ریزماهواره LEI0258 طیورگوشتی نژاد Ross 308 استفاده شد. بدین منظور ابتدا ژنوتیپ‌ها با روش‌های معمول PCR و الکتروفورز و همچنین تحلیل قطعه‌ای مشخص شدند و سپس نتایج روش معمول با نتایج آزمون HRM مورد مقایسه و بررسی قرار گرفتند. از تعداد ۱۰۰ نمونه ۵ ژنوتیپ در آزمون‌های معمول PCR و الکتروفورز و همچنین تحلیل قطعه‌ای مشخص شدند. این ژنوتیپ‌ها شامل آلل‌های با وزن ملکولی ۴۴۸، ۳۸۵، ۳۰۰ و ۲۰۷ جفت باز بودند. در تحلیل HRM ، تغییرات فلورسانس نرمال‌شده نسبت به دما (درجه سانتی‌گراد) برای پنج ژنوتیپ مختلف بررسی شد. نتایج نشان داد که روش HRM قادر است ژنوتیپ‌های مختلف و موارد هوموزیگوت و هتروزیگوت را تفکیک کند. در مجموع به نظر می‌رسد روش تحلیل دقیق دمای شکافت را بتوان برای بررسی تنوع ژن‌های MHC طیور به کار برد. اگرچه با این روش نمی‌توان دقیقا آلل‌های هر کرومزوم را تشخیص داد ولی با توجه به ماهیت هم‌بارز ژن‌های MHC نتایج برای بررسی ترکیب ژنتیکی و تعیین ژنوتیپ‌ها قابل قبول خواهند بود.

کلمات کلیدی: طیور، ژنوتایپینگ، مجتمع عمده پذیرش بافتی، تحلیل دقیق دمای شکافت، تحلیل دمای شکافت

مقدمه

مجتمع عمده پذیرش بافتی (MHC) در طیور در ابتدا با عنوان جایگاه ژنی B یا گروه خونی سرولوژیکی شناسایی شد. با توجه به مطالعات متعدد ژن‌های MHC مسئول کنترل مقاومت به بیماری‌ها از جمله بیماری‌های خودایمن، ویروسی، باکتریائی و انگلی هستند. البته بسیاری از خصوصیات دیگر غیر وابسته به سیستم ایمنی از جمله میزان تولید در برخی حیوانات نیز با خوشه ژنی MHC مرتبط هستند (Mehrzad and Houshmand, 2025). به دلیل نقش مهم در مقاومت به بیماری‌ها و رشد و تولید، MHC به عنوان شاخصی ارزشمند برای تحقیقات در زمینه

* نویسنده مسئول: غلامرضا نیکبخت‌بروجنی، استاد گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
E-mail: nikbakht@ut.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

[1]Major Histocompatibility Complex

سلامت و بهره‌وری طیور مطرح شده است (Moussa et al, 2023; Oladejo et al, 2023). به طور معمول آلل‌های MHC با استفاده از روش‌های سرم‌شناسی و با پادتن‌های اختصاصی شناسایی می‌شوند، اما این روش‌ها محدودیت‌های زیادی دارند. در روش‌های سرمی بروز واکنش‌های متقاطع، عدم توان تشخیص هاپلوتیپ‌های جدید، حضور پادگن‌های پلی‌مرفیک و نیاز به افراد متخصص برای تولید پادتن‌های جدید موانعی برای تشخیص تنوع آلل‌ها هستند. یکی از روش‌های پیشنهادی، استفاده از ریزماهواره LEI0258 است که در ناحیه خوشه ژنی MHC قرار دارد و از آن به عنوان یک نشان‌گر ژنتیکی برای تعیین هاپلوتیپ‌های MHC طیور استفاده می‌شود (Fulton, 2020).

ژن‌های MHC طیور از دو مجموعه مستقل به اسامی B و RFP-Y تشکیل شده است که بر روی کروموزوم ۱۶ قرار گرفته‌اند. هر یک از این دو مجموعه دارای ژن‌های کلاس I و II هستند ولی از نظر ساختاری تفاوت‌هایی با هم دارند. مجموعه B دارای دو منطقه کلاس I و II است که آن‌ها را با B-F و B-L نشان می‌دهند. به علاوه در این مجموعه منطقه سومی موسوم به B-G وجود دارد که می‌توان آن را کلاس IV نامید. LEI0258 یک ریزماهواره تترانوکلئوتیدی با یک هسته چهار جفت بازی $(TTTC)_n$ است که از نظر فیزیکی در جایگاه B خوشه ژنی MHC و بین ژن‌های BF و BG درمیکروکروموزوم ۱۶ طیور قرار دارد. این ریزماهواره در عدم تعادل پیوستگی[1] با آلل‌های MHC قرار دارد، به این معنی که آلل‌هایی که در جایگاه‌های ژنی متفاوتی قرار دارند، با شیوعی به مراتب بیش‌تر از آنچه از جور شدن تصادفی ژن‌ها قابل پیش‌بینی است، به ارث می‌رسند (Fulton, 2020). برای این نشان‌گر تاکنون حدود ۸۰ آلل مختلف با طیف وزنی ۱۸۲ تا ۵۵۲ جفت باز شناسایی شده است که تنوع بسیار بیش‌تری را از آنچه از یک ریزماهواره معمول انتظار می‌رود، نشان می‌دهد. تعداد قابل توجه آلل‌های LEI0258 و به ویژه همراهی هر یک با هاپلوتیپ‌های مشخص MHC طیور، آن را به عنوان یک شاخص معتبر ایمونوژنتیکس (Immunogenetics) مطرح کرده است که می‌تواند برای تعیین هویت جمعیت‌های مختلف و ویژگی‌های فردی یا نژادی در مطالعات آکادمیک و کاربردی استفاده شود (Ramezani et al, 2024).

برای تشخیص ملکولی آلل‌های ریزماهواره LEI0258 از روش‌های معمول واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) و به دنبال آن الکتروفورز ژل آگاروز یا آکریلامید می‌توان استفاده کرد. البته الکتروفورز برای تشخیص برخی از آلل‌ها که حاصل تغییر در ۵ نوکلئوتید یا کم‌تر هستند، از توانایی کافی برخوردار نیست. تعیین توالی مستقیم نیز با وجود اطلاعات دقیقی که از توالی آلل‌ها به دست می‌دهد، برای تفکیک آللی کافی نیست و مشکلاتی برای تحلیل عدم قطعیت[2] دارد. برای تشخیص و تفکیک آلل‌ها باید روش‌های بنیان سازی (کلونیگ) و تعیین توالی پلاسمیدهای متعدد را به روش‌های فوق افزود. از سویی دیگر، برای انجام این روش‌ها باید هزینه‌های بالا و زمان زیادی صرف نمود. از روش کم هزینه تنوع ساختارهای تک رشته‌ای DNA (SSCP[3]) نیز می‌توان برای بررسی تنوع ژن‌های MHC استفاده کرد. این روش قادر است تفاوت در حد یک نوکلئوتید را نیز تشخیص دهد، اما قابلیت تشخیص و تکرارپذیری را به شکلی ندارد که بتوان الگوی مشخصی برای هر آلل تعریف کرد (Fulton et al, 2016; Goto et al, 2002). یک روش پیشنهادی برای تعیین تنوع ژنتیکی "تحلیل دقیق دمای شکافت" (HRM[4]) است. در این روش پس از افزوده سازی رشته نوکلئوتید هدف، افزایش تدریجی دما صورت می‌گیرد و دستگاه تغییرات شدت یا

1- Linkage disequilibrium
2- Ambiguity
3- Single stranded conformational polymorphisms (SSCP)
4- High Resolution Melting Curve

سیگنال فلورسانس ناشی از جدا شدن رشته‌های DNA را ثبت می‌کند. هر تغییر ژنتیکی مانند جایگزینی یک نوکلئوتید، حذف یا اضافه شدن بازها، شکل و دمای شکافت DNA را تغییر می‌دهد و در نتیجه منحنی شکافت متفاوتی ایجاد می‌شود. با مقایسه این منحنی‌ها می‌توان نمونه‌های هوموزیگوت و هتروزیگوت را از هم تشخیص داد و به طور سریع و دقیق تنوع‌های ژنتیکی را شناسایی کرد. در خصوص تایپینگ MHC این روش تاکنون تنها برای انسان به کار رفته است (Ben Salah et al, 2021). اما به دلیل تشابه ساختار و تنوع این ژن‌ها با سایر گونه‌های مهره‌داران به نظر می‌رسد بتوان آن را برای طیور نیز به کار برد. از مزایای این روش به صرفه بودن آن است، چرا که آنالیز شکافت DNA با وضوح بالا نسبت به سایر فن-آوری‌های ژنوتیپی مقرون به صرفه‌تر بوده و برای پروژه‌های ژنوتایپینگ در مقیاس بالا مناسب و ایده‌آل است (Yu et al, 2025; Zhou et al, 2025).

در این تحقیق از روش تحلیل دقیق دمای شکافت برای تعیین ژنوتیپ‌های MHC مبتنی بر ریزماهواره LEI0258 طیورگوشتی نژاد Ross 308 استفاده شد. بدین منظور ابتدا ژنوتیپ‌ها با روش‌های معمول PCR و الکتروفورز و همچنین تحلیل قطعه‌ای[1] مشخص شدند و سپس نتایج روش معمول با نتایج آزمون HRM مورد مقایسه و بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش کار

اخذ نمونه و استخراج DNA

در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه خون کامل از طیور گوشتی Ross 308 اخذ شد. خون‌گیری با لوله‌های حاوی EDTA انجام و جهت اخذ بافی‌کوت نمونه‌ها با سرعت ۶۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس بافی‌کوت‌ها جدا شده و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از بافی‌کوت با استفاده از کیت استخراج DNA (Genomic DNA Extraction kit, BIONEER , Korea) بر طبق دستورالعمل سازنده صورت گرفت.

افزوده‌سازی آلل ریزماهواره LEI0258

بررسی آلل‌های ریزماهواره LEI0258 بر اساس روش که Fulton و همکاران (۲۰۰۶) صورت گرفت (Fulton et al, 2006). بر این اساس، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرهای LEI0258، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ و یک واحد آنزیم تک پلیمراز (SinaClon, Tehran, Iran) انجام شد. چرخه‌های دمایی شامل یک مرحله واسرشتگی اولیه ۹۴ ^{o}C به مدت ۱ دقیقه، ۳۵ چرخه سه مرحله‌ای، شامل مرحله واسرشت ۹۲ ^{o}C به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال ۵۷ ^{o}C به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله بسط ۷۲ ^{o}C به مدت ۴۵ ثانیه و در انتها یک مرحله بسط انتهایی در دمای ۷۲ ^{o}C به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه بود. پرایمرهای LEI0258 باتوالی زیر براساس روش فوق مورد استفاده قرار گرفتند :

5'-CACGCAGCAGAACTTGGTAAGG-3' برای پرایمر رفت و 5'-AGCTGTGCTCAGTCCTCAGTGC-3' برای پرایمر برگشت (به شماره دسترسی Z83781 بانک ژن).

در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگاروز ۴ درصد (در بافر 1X TBE) با اختلاف پتانسیل ۶۰ ولت و ۴۵ میلی‌آمپر به مدت ۳ ساعت الکتروفورز و رنگ‌آمیزی شد. تصاویر ژل‌ها با دستگاه UV ترانس لومیناتور ثبت شدند و سرانجام اندازه هر کدام از محصولات PCR توسط نرم‌افزار Photocapture نسخه ۹۹/۰۳ تعیین گردید. پروفایل‌های گوناگون مشخص و نام‌گذاری شدند.

1- Fragment analysis

تحلیل قطعه‌ای

برای تفکیک دقیق‌تر آلل‌ها از یکدیگر، از روش تحلیل قطعه‌ای استفاده شد. تحلیل قطعه‌ای یک روش دقیق برای بررسی نشان‌گرهای ژنتیکی است که اساس آن تفکیک قطعات DNA بر اساس اندازه و یا طول قطعات (و نه بر اساس توالی آن‌ها) است. حساسیت این روش بسیار بالا بوده و حتی تفاوت‌های آللی در حد یک جفت باز را نیز از یکدیگر تمیز می‌دهد. جهت آماده‌سازی نمونه‌ها ابتدا پرایمر رفت ریزماهواره LEI0258 با رنگ فلورسنت 6-FAM نشان‌دار شده (رنگ به قسمت '۵ پرایمر متصل شده است) و سپس واکنش PCR با شرایط مشابه مرحله قبل تکرار شد. رنگ ۶-کربوکسی فلورسئین[1] یا 6-FAM رایج‌ترین رنگ فلورسنت برای نشان‌دار کردن الیگونوکلئوتیدها بوده که با بسیاری از دستگاه‌های تشخیص فلورسنت نیز سازگار است.

پس از این که آلل‌های ریزماهواره LEI0258 با پرایمر نشان‌دار افزوده‌سازی شدند، ۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگاروز ۴ درصد الکتروفورز شد و پس از مشاهده باند قوی و مناسب، نمونه‌ها برای انجام تحلیل قطعه‌ای به آزمایشگاه تعیین توالی DNA انستیتو پاستور ایران منتقل شدند. به منظور انجام تحلیل قطعه‌ای، ۰/۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۰/۵ میکرولیتر از نشان‌گر وزنی GS500LIZ[2] (Applied Biosystems) و ۹ میکرولیتر فرامید[3] ترکیب شده و ۳ دقیقه در ºC ۹۵ قرار گرفتند. قطعات DNA تک رشته‌ای بلافاصله بر روی یخ انتقال داده شده و سپس قطعات با استفاده از دستگاه ABI 3130 genetic analyzer تفکیک شدند (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار Peack scanner نسخه ۱/۰ تحلیل شدند. تمامی مراحل فوق بر اساس روش پیشنهادی در مطالعات پیشین انجام شدند (Fulton et al, 2006).

آزمون تحلیل دقیق دمای شکافت (HRM) و منحنی دمای شکافت (Melt Curve)

تعداد ۵ نمونه از محصولات افزوده سازی برای هر پروفایل متمایز جهت روش تحلیل دقیق دمای شکافت استفاده شدند. به محصولات افزوده‌سازی به ازای هر ۲۰ میکرولیتر یک میکرولیتر از رنگ Syto 9 اضافه شد. غلظت نهایی رنگ ۲/۵ میلی‌مولار محاسبه شد. تحلیل HRM و دمای شکافت در دستگاه Real-time Rotor-Gene Q شرکت Qiagen مدل ۶۰۰۰ صورت گرفت. محدوده دمایی مناسب برای تحلیل HRM ۷۵/۵۹ تا ۸۷/۴۱ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. تحلیل دمای شکافت نیز در محدوده دمایی ۷۳ تا ۸۸/۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. بر اساس حضور یک پیک یا دو پیک مشاهده شده در منحنی‌های دمای شکافت، هوموزیگوتی و یا هتروزیگوتی نمونه‌ها تشخیص داده شد و پس از آن با مقایسه نمودارهای به دست آمده از تحلیل HRM تایید گردید. نمونه‌هایی که در تحلیل دمای شکافت دارای پیک دمایی مشابه بودند بر روی نمودار HRM مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه‌های مشابه در یک تیپ قرار داده شدند.

نتایج

افزوده‌سازی آلل ریزماهواره LEI0258

همان گونه که در Figure 1 مشاهده می‌شود پس از الکتروفورز، پنج ژنوتیپ شامل چهار ژنوتیپ هتروزیگوت (A-D) و یک ژنوتیپ هوموزیگوت (E) مشاهده شد. همچنین آلل‌های مشاهده شده شامل آلل‌های با وزن ۴۴۸، ۳۸۵، ۳۰۰ و ۲۰۷ جفت باز بودند. این اعداد یا وزن دقیق باندها با روش تحلیل قطعه به دست آمده‌اند. فراوانی ژنوتیپ‌ها در Table 1 نشان داده شده‌است. نمونه‌ای از نتایج تحلیل قطعه‌ای در Figure 2 نشان داده شده است.

1- 6-Carboxyfluorescein
2- Gene Scan 500 LIZ Size standadrd
3- HiDi Formamide

Table 1: Observed LEI0258 genotypes frequencies in Ross 308 samples. Genotypes were determined by PCR followed by electrophoresis

Frequency	LEI0258 genotypes (bp)	HRM profiles
11	300/448	A
13	385/448	B
38	207/385	C
15	300/385	D
22	385/385	E
100	Total	

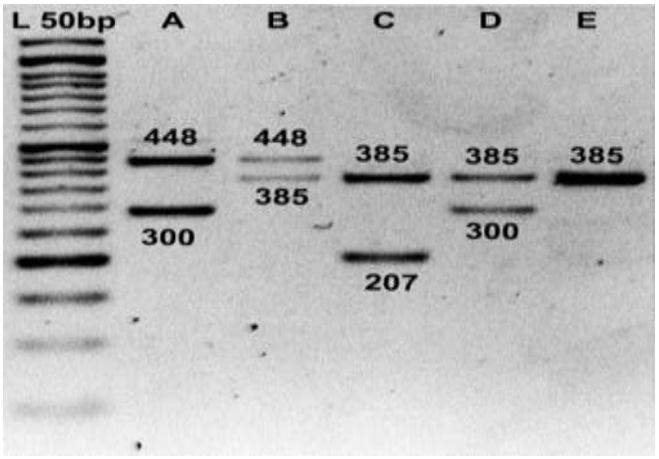

Figure 1: Electrophoresis results image. LEI0258 gene amplification products were separated on a 4% agarose gel. Wells A to D are heterozygous, and well E is a homozygous sample.

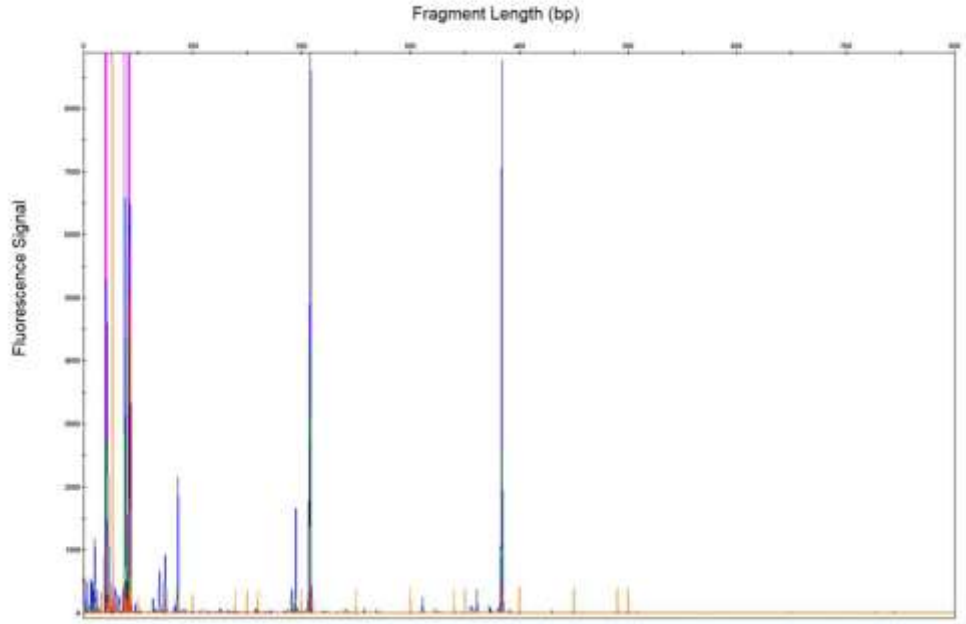

Figure 2: An example of fragment analysis. The results indicate LEI0258 gene amplification products with sizes of 207 and 385 base pairs. Fragments were separated using an ABI 3130 genetic analyzer, and data were acquired based on fluorescence signal. The weight of each band with a distinct peak was determined in comparison to a ladder, and the results were analyzed using Peak Scanner software version 1.0.

پس از به دست آوردن نتایج افزوده‌سازی، الکتروفورز و تحلیل قطعه‌ای براساس دسته‌بندی‌هایی که صورت گرفت ژنوتیپ‌ها مشخص شدند (A-E) و از هر ژنوتیپ تعداد ۳ تا ۵ نمونه برای تحلیل دقیق دمای شکافت مورد بررسی قرار گرفتند. محدوده دمایی ۷۴ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان شرایط بهینه برای تحلیل دقیق دمای شکافت (HRM) تعیین شد. تحلیل منحنی دمای شکافت (Tm) نیز در محدوده دمایی ۷۴ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

در تحلیل Melt Curve و HRM، تغییرات فلورسانس نرمال شده نسبت به دما (درجه سانتی‌گراد) برای پنج ژنوتیپ مختلف بررسی شد. نتایج به صورت نمودار خطی ارائه گردید که در آن روند کاهش فلورسانس با افزایش دما برای تمامی نمونه‌ها مشاهده شد (Figures 3 & 4). این کاهش بیان‌گر تفاوت در دمای شکافت قطعات DNA هدف در هر نمونه است. منحنی E بیش‌ترین شیب را به شکلی پیوسته دارد و کاهش فلورسانس به صورت ناگهانی رخ داده، که می‌تواند نشان‌دهنده توالی یکسان یا هوموزیگوتی باشد. روند کاهش در ژنوتیپ D مشابه نمونه B است اما با شدت کم‌تر که بیان‌گر تفاوت‌های جزیی در توالی دوژنوتیپ باشد. نتایج نشان داد که روش HRM قادر است ژنوتیپ‌های مختلف را تفکیک کند. چنان که در Figures 5 & 6 قابل مشاهده است این روش قادر به تمایز ژنوتیپ هوموزیگوت از هتروزیگوت نیز بوده است.

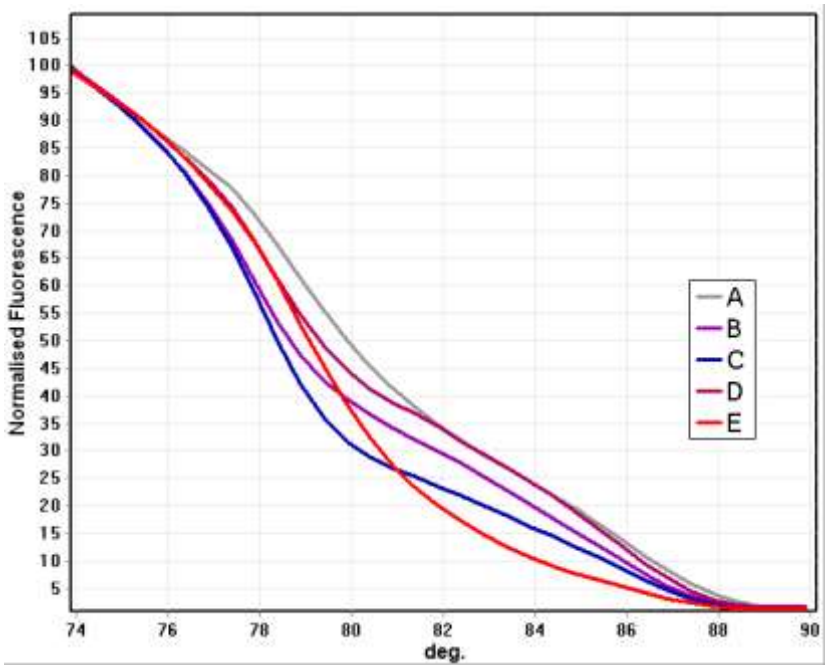

Figure 3: HRM diagram. The precise melting curve is shown as a normalized plot, in which the trend of decreasing fluorescence is observed with increasing temperature for all samples. Five profiles, A to E, are distinguishable in the image.

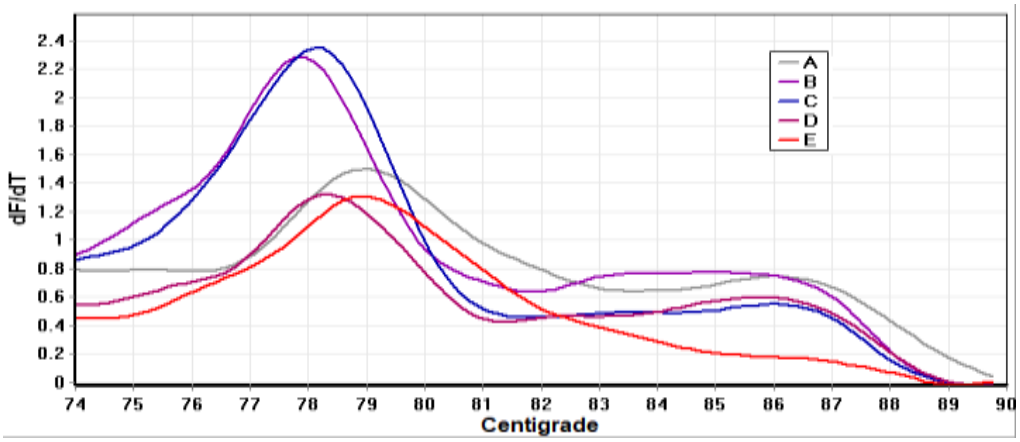

Figure 4: Melt Curve. The results of the melt curve analysis are shown as a graph, where the peak of the curve indicates the melting temperature or Tm of the double-stranded DNA. Five profiles for samples A to E are distinguishable, with temperature peaks between 78 and 79.

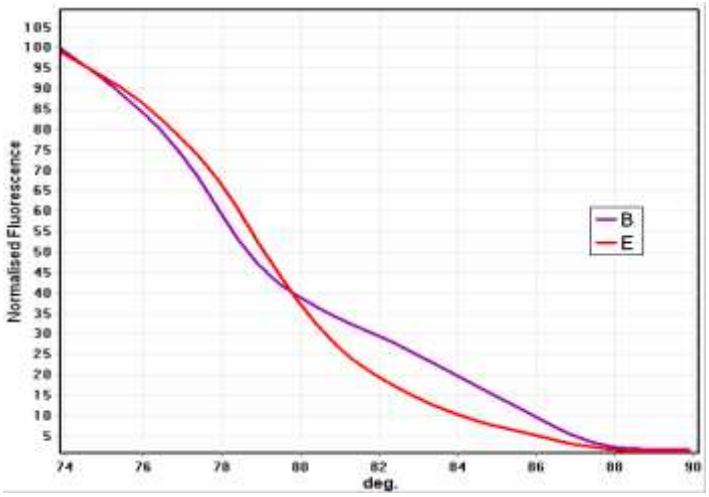

Figure 5: Comparison of homozygous and heterozygous samples using the HRM method. In this image, HRM results are shown as normalized graphs only for homozygous (E) and heterozygous (B) samples. This graph shows the ability to distinguish homozygous genotypes from heterozygous samples.

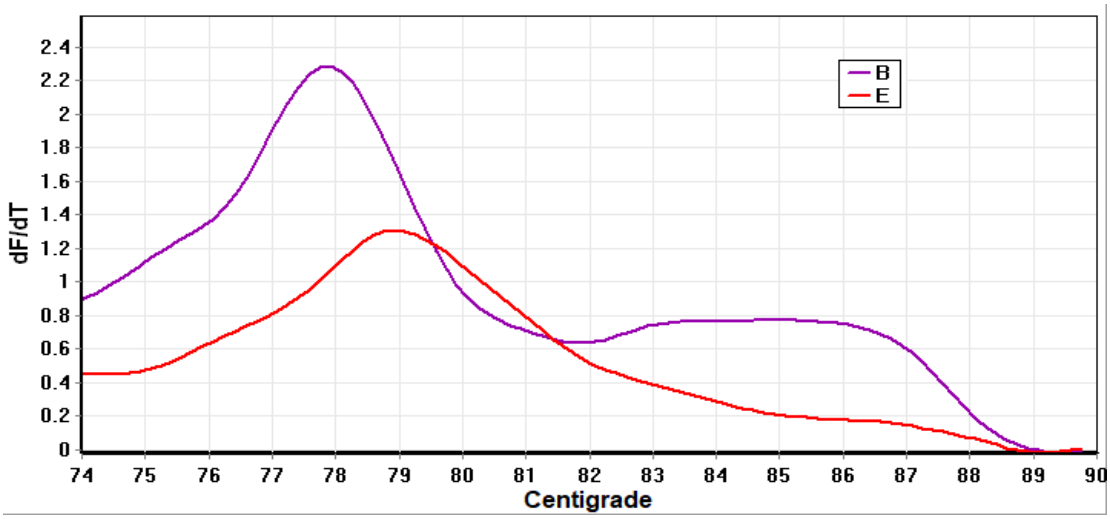

Figure 6: Comparison of homozygous and heterozygous samples using simple Melt Curve analysis. This image shows the melt temperature results for differentiating and identifying homozygous (E) and heterozygous (B) samples. Here, the peak temperature for the homozygous sample is 79, and the heterozygous sample shows two peaks at temperatures of 78 and 84.

بحث

در بین ژن‌های مؤثر در پاسخ ایمنی، خوشه ژنی MHC بسیار حائز اهمیت است زیرا در این ناحیه ژن‌های رمز کننده ملکول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن‌ها قرار دارند (Fulton et al, 2016). از آن جا که ژن‌های MHC کلاس یک و دو متعدد و بسیار پلی‌مرفیک هستند، وجود یک نشان‌گر ریزماهواره در نواحی غیر کد شونده برای تشخیص هاپلوتیپ‌ها بسیار کمک کننده خواهد بود. ریزماهواره تترانوکلئوتیدی LEI0258 با آلل‌های نواحی کلاس یک و دو MHC طیور در عدم تعادل پیوستگی (Linkage Disequilibrium) قرار دارد. به عبارتی این ریزماهواره از توانایی کافی برای تشخیص هاپلوتیپ‌های آلل‌های MHC برخوردار است و به تفکیک ژنوتیپ‌ها کمک می‌کند (Fulton et al, 2016).

در این تحقیق از روش‌های HRM و Melt Curve برای تعیین ژنوتیپ‌های طیور استفاده شد. نتایج منحنی شکافت مطابق با روش‌های معمول PCR، الکتروفورز و تحلیل قطعات (Fragment analysis) بود. تفکیک پروفایل‌های HRM با تفاوت نقاط اوج[1] نمودار (Tm) و دمای شکافت در فواصل دمایی بسیار نزدیک با فاصله ۰/۲ درجه مشخص می‌شود. اما در مورد منحنی ساده دمای شکافت تفاوت‌های کم‌تر از نیم درجه سانتی‌گراد برای تفکیک و تمایز ژنوتیپ‌ها از ویژگی و دقت بالایی برخوردار نیستند. البته در هر دو مورد تفاوت‌ها در نتایج و قدرت تفکیک پروفایل‌ها تا حد زیادی به ساختار و طول توالی نوکلئوتیدی ریزماهواره مربوط است. یکی از مزایای روش HRM، به صرفه بودن آن است زیرا نسبت به سایر فن‌آوری های ژنوتایپینگ، مانند توالی‌یابی و تایپینگ SNP Taqman، به هزینه و زمان کم‌تری نیاز دارد. این روش برای پروژه‌های ژنوتایپینگ جمعیت‌ها در مقیاس بالا مناسب و ایده‌آل است. از دیگر مزایای این روش ساده بودن و سریع بودن آن است، زیرا بعد از انجام فرآیند PCR نیاز به تجهیزات اضافی برای انجام HRM نیست و دستگاه قادر است تعداد بسیار زیادی از نمونه‌ها را در مدت زمان کوتاه و با دقت بالا ژنوتایپ کند (Boonyuen et al, 2025; Yu et al, 2025; Zhou et al, 2025).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با روش HRM می‌توان ۵ ژنوتیپ LEI0258 را در قالب پروفایل‌های A تا E تفکیک کرد. دستگاه‌های معمولی PCR در زمان واقعی (Real Time PCR)، وضوح لازم برای تشخیص تفاوت‌های جزئی در دمای شکافت را ندارند. با این حال، در برخی دستگاه‌ها امکان HRM و تحلیل دقیق دما یا نمودار شکافت با وضوح بالا امکان‌پذیر شده است. این روش قادر به شناسایی هتروزیگوت‌های هترودوپلکس‌ها بوده و می‌تواند یک جفت باز شناسایی منفرد را در افزوده‌هایی به بزرگی ۵۴۴ جفت باز شناسایی کند (Słomka et al, 2017). تا کنون روش HRM برای تفکیک ژنوتیپ‌های حیوانات اهلی مثل گاومیش به کار رفته است و تطابق نمودارها با آلل‌ها مشخص شده است (Alkafajy et al, 2020). در فرایند شکافت و پیوست قطعات DNA معمولا محصولات هترودوپلکس ناشی از رشته‌های دو کرومزوم ایجاد می‌شوند. این هترودوپلکس‌ها در دماهای پایین‌تری نسبت به هوموودوپلکس‌های کاملاً منطبق، از هم جدا می‌شوند و باعث جابه‌جایی منحنی به سمت دماهای پایین‌تر می‌گردند. با این که در یک نمونه هتروزیگوت انتظار می‌رود مقادیر مساوی از هترودوپلکس و هوموودوپلکس تولید شود، تغییر سیگنال فلورسانس مشاهده‌شده در گذار هترودوپلکس معمولاً کم‌تر است (Ben Salah et al, 2021). این پدیده احتمالاً به دلیل بازتوزیع هترودوپلکس‌ها به هوموودوپلکس‌ها در طول فرآیند شکافت است. در مجموع با روش حاضر هتروزیگوت‌های مختلف را می‌توان از یکدیگر متمایز کرد، عمدتاً به این دلیل که محصولات هترودوپلکس آن‌ها متفاوت است و در نتیجه، سهم متفاوتی در منحنی کلی شکافت دارند.

1- Peak

بر اساس مطالعه حاضر، طول آلل‌ها یا محصولات حاصل از PCR در تحلیل قطعه‌ها بین ۲۰۷ تا ۴۴۸ جفت باز بود. در مورد آلل‌های کلاس‌های مختلف MHC و نه ریزماهواره، معمولاً تفاوت بین چندین نوکلئوتید وجود دارد و افراد غیرهمسان بر اساس تفاوت در نوکلئوتیدها قابل شناسایی هستند. در مورد LEI0258 تفاوت اندازه افزوده‌ها نیز به تفکیک و قدرت تشخیص کمک می‌کند. در این تحقیق نشان داده شد که تحلیل HRM برای نواحی با چندشکلی بالا مثل ریزماهواره LEI0258 می‌تواند هویت ژنوتیپی را تعیین کند. منحنی‌های شکافت یکسان، ژنوتیپ‌های یکسان را نشان داده‌اند و منحنی‌های متفاوت، ژنوتیپ‌های متفاوت. همچنین بررسی نتایج نشان داد که این روش قادر است ژنوتیپ‌های هوموزیگوت را از هتروزیگوت تفکیک کند (Figures 5 & 6). پیش از این، روش HRM برای تایپینگ MHC در سگ به کار رفته و امکان تفکیک ژنوتیپ هتروزیگوت از هوموزیگوت گزارش شده است (Vahedi et al, 2018). در اشکال به دست آمده ژنوتیپ هوموزیگوت با یک انحنا در نمودار HRM و یک پیک دمایی در نمودار منحنی مشخص می‌شوند. در مقایسه ژنوتیپ‌های هتروزیگوت دارای دو انحنا یا به عبارتی پیک شانه‌ای (Shoulder Peak) در نمودار HRM و با دو پیک دمایی، در منحنی قابل تفکیک هستند. در مجموع به نظر می‌رسد استفاده از روش تحلیل دقیق دمای شکافت کاربرد زیادی در بررسی تنوع ژن‌های MHC پیدا کند (Abdel karim and Noori, 2025; Costamilan et al, 2025; Manjula et al, 2025).

در آینده برای تعیین هویت ژنوتیپی MHC می‌توان از تحلیل منحنی‌های ساده یا دقیق و با وضوح بالای شکافت استفاده کرد. تعیین هویت ژنوتیپی MHC به ویژه برای جفت‌های غیرخویشاوند اهداکننده و گیرنده پیوند بافت یا سلول‌های بنیادی خون‌ساز لازم است. در دامپزشکی نیز تعیین هویت ژن‌های ایمنی به برنامه‌های پرورش و اصلاح نژاد و همچنین کشف ارتباط این ژن‌ها با مقاومت و حساسیت به بیماری‌ها کمک می‌کند. با استفاده از این روش، به رفع ابهام‌های آللی که حتی در تایپینگ مبتنی بر توالی نیز رایجند، نیازی نخواهد بود زیرا تطابق منحنی‌های شکافت در هر لوکوس نشان‌دهنده تطابق توالی است. از سوی دیگر سرعت بالای کار امکان بررسی تعداد زیادی از اهداکنندگان بالقوه برای یک بیمار را در یک روز فراهم می‌کند، آن هم با هزینه‌ای بسیار کم‌تر از تایپینگ مبتنی بر کلونیگ و تعیین توالی نوکلئوتیدی.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد، واحد علوم و تحقیقات و آزمایشگاه دامپزشکی پاستور تهران برای فراهم نمودن شرایط و تسهیلات آزمایشگاه و همکاری فنی تشکر و قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تعارض منافعی با تحقیق حاضر ندارند.

منابع مالی

این تحقیق با هزینه شخصی دانشجو انجام شده است.

منابع

Abdel karim, H. D., & Noori, A. A. (2025). Relationship of Lei0234 marker with some productive traits of local chickens. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, *56*(4), 1273–1285.

Alkafajy, A., Al-Karagoly, H., & Brujeni, G. N. (2020). Comparison of cattle BoLA-DRB3 typing by PCR-RFLP, direct sequencing, and high-resolution DNA melting curve analysis. *Veterinary Research Forum*, *11*(1), 21–26.

Ben Salah, H., Jelassi, R., Zidi, I., Ben Amor, A., Bizid, S., Ammi, R., Guizani, L., Bouratbine, A., Aoun, K., & Chelbi, H. (2021). Rapid high-resolution melting method to identify human leukocyte antigen-G (HLA-G) 3′ untranslated region polymorphism +3142C/G (rs1063320). *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, *9*(11), e1817.

Boonyuen, U., Jacob, B. A. C., Chamchoy, K., Pengsuk, N., Talukam, S., Petcharat, C., Adams, E. R., Edwards, T., Boonnak, K., Amran, S. I., Ab Latif, N., & Louis, N. E. (2025). Improved genetic screening with zygosity detection through multiplex high-resolution melting curve analysis and biochemical characterisation for G6PD deficiency. *Tropical Medicine and International Health*, *30*(5), 437–457.

Costamilan, C. A. da V. L. R., Paludo, E., Herkenhoff, M. E., Pértille, F., de Souza, A. L. S., Mendes, C. R., & Dilarri, G. (2025). Immunogenetic diversity of MHC class II B-Lβ genes in Brazilian Caipiras (free-range) chickens laying blue eggs. *Frontiers in Immunology*, *16* (10), e.1644110.

Fulton, J. E. (2020). Advances in methodologies for detecting MHC-B variability in chickens. In *Poultry Science*. *99*(3): 1267–1274.

Fulton, J. E., Juul-Madsen, H. R., Ashwell, C. M., McCarron, A. M., Arthur, J. A., O'Sullivan, N. P., & Taylor, R. L. (2006). Molecular genotype identification of the Gallus gallus major histocompatibility complex. *Immunogenetics*, *58*(5–6), 407–421.

Fulton, J. E., Lund, A. R., Mccarron, A. M., Pinegar, K. N., Korver, D. R., Classen, H. L., Aggrey, S., Utterbach, C., Anthony, N. B., & Berres, M. E. (2016). MHC variability in heritage breeds of chickens. *Poultry Science*, *95*(2), 393–399.

Goto, R. M., Afanassieff, M., Ha, J., Iglesias, G. M., Ewald, S. J., Briles, W. E., & Miller, M. M. (2002). Single-strand conformation polymorphism (SSCP) assays for major histocompatibility complex B genotyping in chickens. *Poultry Science*, *81*(12), 1832–1841.

Manjula, P., Perera, D., Fernando, R., Kim, M., Cho, E., & Lee, J. H. (2025). Investigation of MHC-B Linked LEI0258 Marker Diversity in Various Chicken Populations. *Journal of Animal Science and Technology*. *10* (5), e2500118.

Mehrzad, J., & Houshmand, P. (2025). Immunogenetics Properties of Avian MHC Polymorphism and its Association with Diseases and Production Traits. *Journal of Poultry Sciences and Avian Diseases*, *3*(3), 40–46.

Moussa Hassan, O., Machuka, E., Martina, K., Keambou Tiambo, C., Domelevo Entfellner, J.-B., & Pelle, R. (2023). Major Histocompatibility Complex Region and Diversity of the Local Chicken Populations In Niger. *Journal of World's Poultry Science*, *2*(4), 47–54.

Oladejo, O. A., Oseni, S. O., Kyallo, M., Entfellner, J. B. D., Tor, N. E., Tiambo, C. K., & Pelle, R. (2023). Evaluation of Genetic Variability in Four Nigerian Locally-Adapted Chicken Populations Using Major Histocompatibility Complex-Linked LEI0258 Microsatellite Marker. *Poultry Science Journal*, *11*(2), 189–201.

Ramezani, A., Brujeni, N. G., Sheikhi, N., & Asadollahi, P. K. (2024). MHC-linked microsatellite LEI0258 variability and population structure of chicken ecotypes in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, *25*(4), 312–318.

Słomka, M., Sobalska-Kwapis, M., Wachulec, M., Bartosz, G., & Strapagiel, D. (2017). High resolution melting (HRM) for high-throughput genotyping-limitations and caveats in practical case studies. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11), 2316.

Vahedi, S. M., Jamshidi, S., Lankarani Mohajer, L., & Nikbakht Brujeni, G. (2018). Allelic descrimination of canine MHC (DLA-DRB1) by high resolution melt analysis. *Journal of Veterinary Research*, *73*(1), 93–100.

Yu, S., Cheng, Y., Tang, C. C., & Liu, Y. P. (2025). Diagnostic accuracy of high-resolution melting curve analysis for discrimination of oncology-associated EGFR mutations: a systematic review and meta-analysis. *Journal of International Medical Research*, *53*(2), 1–15.

Zhou, Y., Ha, S., Xu, Y., Qin, X., Ma, Y., Lu, J., Wang, B., Cai, J., Duan, Z., Cong, B., Chen, J., & Deng, J. (2025). Establishment of a simple prediction method for DNA melting temperature: high-resolution melting curve analysis of PCR products. *PLoS One*, *20*(4):e0321885.

Received: 19.11.2025

Accepted: 02.02.2026

Vol. 21, No. 4, Winter, 2026 **Original Article**
DOI: 10.22055/ivj.2026.560799.2869

Chicken Major Histocompatibility Complex Genotyping by High Resolution Melting Analysis

Ammar Ramezani[1], Gholamreza Nikbakht Brujeni[2*], Nariman Sheikhi[3] and Kaveh Parvandar Asadollahi[3]

[1] PhD Student in Immunology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
[3] Associate Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 19.11.2025 Accepted: 02.02.2026

Abstract

The chicken major histocompatibility complex (MHC), known as the B-locus or serological blood group, is responsible for controlling autoimmune and resistance to viral, bacterial, and parasitic diseases. The microsatellite LEI0258, as a reliable marker for avian MHC typing, can be used to determine the identity of different populations and individual or breed characteristics in academic and applied studies. In this study, High Resolution Melting (HRM) analysis was used to determine MHC genotypes based on the LEI0258 microsatellite in Ross 308 broiler chickens. To this end, genotypes were first determined by conventional PCR and electrophoresis methods, as well as fragment analysis, and then the findings were compared and analyzed with the results of the HRM assay. From 100 samples, 5 genotypes were identified in conventional PCR and electrophoresis assays, as well as fragment analysis. These genotypes included alleles with molecular weights of 448, 385, 300, and 207 base pairs. In HRM analysis, normalized fluorescence changes versus temperature (degrees Celsius) were evaluated for five different genotypes. The results showed that the HRM method is capable of discriminating different genotypes as well as homozygous and heterozygous cases. Overall, it seems that the high-resolution melting analysis method can be applied to study the diversity of avian MHC genes. Although this technique cannot precisely identify the alleles of each chromosome, due to the co-dominant nature of MHC genes, the results are acceptable for assessing genetic composition and determining genotypes.

Key words: Chicken, Genotyping, Major Histocompatibility Complex, High Resolution Melting Analysis, Melting Temperature Analysis

* **Corresponding Author**: Gholamreza Nikbakht Brujeni, Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
E-mail: nikbakht@ut.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).