تعیین ژنوتیپ‌های DRB3 از مجتمع عمده‌ی پذیرش بافتی گاومیش با روش تحلیل دقیق دمای شکافت

غلامرضا نیکبخت‌بروجنی[۱*]، آلا الخفاجی[۲] و سالار گلابدار[۳]

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲

چکیده

مجتمع عمده‌ی پذیرش بافتی (MHC) نقشی مهم در پاسخ‌های ایمنی دارد و تنوع مولکول‌های آن با توانایی شناخت و پاسخ به پپتیدهای بیگانه مرتبط است. در میان ژن‌های MHC گاوسانان، ژنوتایپینگ DRB3 برای بررسی‌های ژنتیک جمعیت و ارتباط MHC با صفات ایمنی و صفات تولیدی کاربرد بیش‌تری دارد. در این تحقیق اگزون دوم ژن Bubu-DRB3 با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز افزوده شد و سه روش تحلیل دقیق دمای شکافت (HRM)، تحلیل الگوهای برش آنزیمی (RFLP) و تعیین توالی مستقیم برای تعیین ژنوتیپ DRB3 گاومیش مورد استفاده قرار گرفتند تا امکان استفاده از روش HRM و یا جایگزینی آن با سایر روش‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج نشان داد که روش HRM با نتایج تعیین توالی و RFLP تطابق دارد و می‌توان از آن برای ژنوتایپینگ ژن DRB3 گاومیش بهره برد. به نظر میرسد استفاده از روش تحلیل دقیق دمای شکافت کاربرد زیادی در بررسی تنوع ژن‌های MHC پیدا کند. اگر چه با این روش نمی‌توان آلل‌های هر کروموزوم را تشخیص داد ولی با توجه به ماهیت هم‌بارز ژن‌های MHC، نتایج آن برای بررسی تنوع و ارتباط ژنوتیپ با فنوتیپ ایمنی قابل قبول خواهد بود.

کلمات کلیدی: مجتمع عمده پذیرش بافتی، گاومیش، ژنوتایپینگ، دمای شکافت

مقدمه

ناحیه‌ی ژنتیکی که امروزه به نام مجتمع عمده‌ی پذیرش بافتی[۱] (MHC) شناخته می‌شود، ابتدا در ارتباط با واکنش‌های پذیرش بافتی شناسایی شد. تا حدود ۲۰ سال پس از کشف MHC تنها نقش اثبات شده برای آن رد پیوند بافت بود، اما برای دانشمندان همواره این سوال مطرح بوده که چرا ناحیه‌ی بزرگی از ژنوم به فرایندی اختصاص داده شده است که معمولاً در طبیعت اتفاق نمی‌افتد. در دهه‌های ۱۹۷۰ و ۱۹۸۰ پیشرفت در زیست-شناسی و ایمنی‌شناسی سلولی به اوج خود رسید و مشخص شد که ژن‌های MHC در پاسخ دستگاه ایمنی به پادگن‌های پروتئینی نقشی اساسی دارند. عملکرد خاص و کلیدی MHC، رمز کردن ملکول‌های عرضه کننده‌ی پادگن است. در واقع ژن‌های MHC تعیین می‌کنند که کدام پادگن‌ها پرورده و به سلول‌های T عرضه شوند و سلول‌های T تنها در صورتی پادگن را شناسایی می‌کنند که توسط MHC عرضه شده باشند، پدیده‌ای که به عنوان محدودیت MHC شناخته می‌شود. همچنین MHC نقش اصلی وراثت مقاومت یا حساسیت به بیماری‌ها را بر عهده دارد (Jin et al. 2015, Unanue et al. 2016, Osborne et al. 2015). بسیاری از خصوصیات دیگر غیروابسته به دستگاه ایمنی، از جمله صفات تولیدی در حیوانات نیز توسط خوشه‌ی ژنی MHC تنظیم می‌شود (Nikbakht and Esmailnejad 2015).

[۱*] استاد گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران E-mail: nikbakht@ut.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] دانشجوی دکترای تخصصی ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

[۳] دانشجوی دکترای حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

1- Major histocompatibility complex (MHC)

به مولکول‌های MHC پادگن‌های لکوسیتیی[1] نیز می‌گویند و نام‌گذاری آن‌ها در بین گونه‌های مختلف متفاوت است. این مولکول‌ها در گاو BoLA و در گاومیش Bubu/BuLA نامیده می‌شوند (Amills et al. 1998). خوشه‌ی ژنی MHC در گاومیش مشابه گاو است و در میان ژن‌های MHC گاومیش، بیان ژن BuLA-DRB3 غالب بوده و توالی آن تنوع زیادی دارد. در ساختار MHC کلاس ۲ این تنوع منحصر به اگزون دوم ژن است که دامنه‌ی β۱ مولکول را در ناحیه‌ی اتصال به پپتید رمز می‌کند. از این رو تایپینگ ژن DRB3 در اغلب مطالعات برای بررسی ارتباط MHC با صفات ایمنی و یا صفات تولیدی گاوسانان مورد استفاده قرار گرفته است (Nikbakht et al. 2016, Wang et al. 2008).

از آن جایی که مجتمع عمده‌ی پذیرش بافتی نقشی مهم در پاسخ‌های ایمنی دارد، تنوع مولکول‌های آن فرد را قادر به شناسایی و پاسخ به تعداد زیادی از پپتیدهای بیگانه می‌کند. این تنوع در بین افراد یک جمعیت (گونه) فوق‌العاده زیاد است و در مقابله با عوامل بیماری‌زا ضامن بقای یک گونه است. به عبارتی، تنوع محدود MHC در فرد با تنوع نامحدود آن در جمعیت جبران می‌شود. در دامپزشکی کسب اطلاعات جامع در مورد تنوع ژن‌های MHC برای درک مبانی مقاومت و حساسیت به بیماری‌ها، طراحی واکسن‌ها و داروها و حتی اصلاح نژاد ضروری است (Behl et al. 2012). اما مطالعه‌ی ژن‌های ایمنی و تنوع آن‌ها باید روی تعداد زیادی از افراد صورت گیرد و انجام آزمایش‌های پرهزینه، آن هم به تعداد قابل قبول، معمولاً مانعی بر سر راه این گونه تحقیقات است.

در تحقیق حاضر سه روش الگوهای برش آنزیمی[2] (RFLP)، تعیین توالی مستقیم و تحلیل دقیق دمای شکافت[3] (HRM) برای تعیین ژنوتیپ DRB3 گاومیش مورد استفاده قرار گرفتند تا امکان استفاده از روش HRM و یا جایگزینی آن با روش‌های پیشین مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش کار

اگزون دوم ژن DRB3 مربوط به نمونه‌های DNA گاومیش ارومیه (۳۷ نمونه) و اهواز (۳۵ نمونه)، به روش نیم آشیانه[4] افزوده شد. مراحل کار بر اساس روش van Eijk و همکاران در سال ۱۹۹۲ انجام شد. در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول مرحله‌ی دوم روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد تا کیفیت و طول قطعه‌ی تکثیر شده بر اساس روش‌های معمول مورد ارزیابی قرار گیرد.

شناسایی الگوهای برش آنزیمی بر اساس روش van Eijk و همکاران در سال ۱۹۹۲ انجام شد. آنزیم RsaI (Roche, Germany)، جهت برش محصولات PCR و انجام آزمون RFLP استفاده شد. محصولات برش آنزیمی در کنار نشان‌گر MspI-digested pBR322 (Fermentas, Germany) روی ژل اکریلامید ۱۲ درصد به مدت یک ساعت با اختلاف پتانسیل ۱۵۰ ولت الکتروفورز عمودی و سپس با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شدند. تصاویر ژل‌ها با دستگاه UV ترانس لومیناتور ثبت گردید.

برای آزمون HRM افزوده سازی مرحله‌ی دوم PCR در دستگاه Real time شرکت Qiagen انجام شد.

به واکنش مرحله‌ی دوم افزوده‌سازی یک میکرولیتر اواگرین EvaGreen® Dye (Biotium, Germany) با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار اضافه شد.

مرحله‌ی اول واسرشت اولیه، ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه. مرحله‌ی دوم شامل ۲۵ چرخه و هر چرخه شامل سه گام: گام اول واسرشت ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه. گام دوم اتصال آغازگرها ۶۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و گام سوم بسط آغازگرها ۷۲°C به مدت ۲۰ ثانیه. مرحله‌ی سوم بسط نهایی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

1- Leukocyte antigen (LA)
2- Restriction Fragment Polymorphism
3- HRM-High Resolution Melting
4- Heminested-PCR

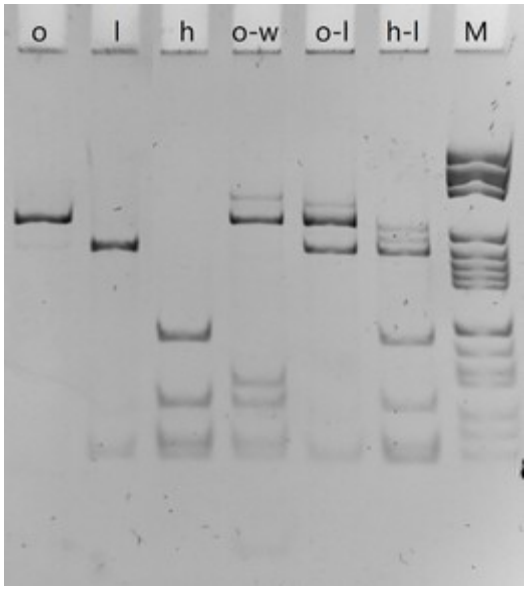
همچنین برای تطبیق و تحلیل نتایج حاصل از ژنوتیپ-های هوموزیگوت از مخلوط افزوده‌های هوموزیگوت با ترکیب آلل‌های احتمالی استفاده شد. نتایج با الگوهای هتروزیگوت نمونه‌های طبیعی مقایسه شدند.

تحلیل HRM در دستگاه Real-time Rotor-Gene Q شرکت Qiagen صورت گرفت. محدوده‌ی دمایی جهت تحلیل HRM ۷۳ تا ۸۸ درجه‌ی سانتی‌گراد با آستانه‌ی ۹۰ درصد اطمینان در نظر گرفته شد.

دو نمونه از هر یک از آلل‌ها (هوموزیگوت) و دو نمونه از هر یک از موارد هتروزیگوت و مجموعاً ۲۰ نمونه که شامل تمامی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها بود جهت تعیین توالی مستقیم ارسال شدند. تعیین توالی دو جهته (Bidirectional) توسط مؤسسه‌ی الفا سکوئنس (کانادا) با دستگاه توالی‌یاب خودکار DNA (ABI 3730 XL) و با روش خاتمه‌دهنده‌ی 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 نرم‌افزار Bio Edit (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

در مجموع نتایج آزمون RFLP، چهار الگوی o، l، h و w مشاهده شد. نتایج الکتروفورز در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس اطلاعات موجود در منابع، الگوی o معادل آلل ۵، الگوی l معادل آلل ۷، الگوی h معدل آلل ۴ و الگوی w معادل آلل ۲ گاومیش است (De et al. 2002). در نتایج تعیین توالی نیز چهار آلل ۰۶۰۱، ۱۰۰۱، ۰۵۰۲ و ۰۲۰۴ شناسایی شدند (جدول ۱).



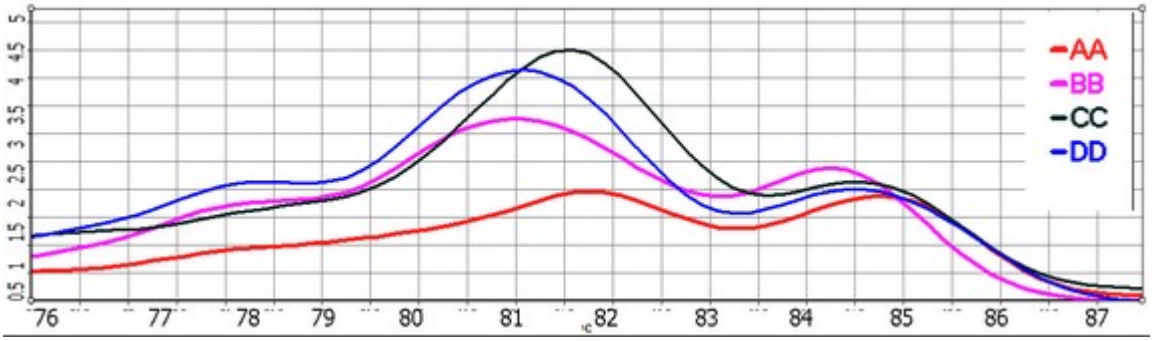
شکل ۱: نتایج RFLP. الگوهای برش آنزیمی (آنزیم Rsa1) ژن Bubu-DRB3 گاومیش

جدول ۱: مقایسه نتایج RFLP، تعیین توالی و الگوهای HRM ژن Bubu-DRB3 گاومیش

الگوی RFLP	آلل بر مبنای RFLP		آلل بر مبنای توالی		الگوی HRM
	آلل ۱	آلل ۲	آلل ۱	آلل ۲	
ww	*2	*2	*0204	*0204	AA
hh	*4	*4	*0502	*0502	BB
oo	*5	*5	*0601	*0601	CC
ll	*7	*7	*1001	*1001	DD
hw	*2	*4	*0204	*0502	AB
ow	*2	*5	*0204	*0601	AC
wl	*7	*2	*1001	*0204	AD
oh	*4	*5	*0502	*0601	BC
hl	*7	*4	*۱۰۰۱	*0502	BD
ol	*7	*5	*1001	*0601	CD

تنوع ژنوتیپ‌ها بر مبنای دمای ذوب[1] (Tm) و نمودارهای HRM تعیین شدند. نقاط دمایی که نشان‌دهنده‌ی تفاوت ژنوتیپ‌ها بودند در جدول ۲ آورده شده است. نمودار Tm مربوط به آلل‌های هوموزیگوت نیز در شکل ۲ دیده می‌شود.

بر اساس نتایج تحلیل HRM و بر اساس تنوع مشاهده شده، ده ژنوتیپ (A تا J) شناسایی شدند (جدول ۱). چهار ژنوتیپ A-D هوموزیگوت و شش ژنوتیپ E-J هتروزیگوت بودند. شکل ۳ تفاوت چهار آلل ۰۶۰۱، ۱۰۰۱، ۰۵۰۲ و ۰۲۰۴ را در تحلیل HRM نشان می‌دهد. اشکال b تا g در شکل ۱ نیز نمایانگر آلل‌های فوق در مقایسه با ترکیب هتروزیگوتی آنهاست.



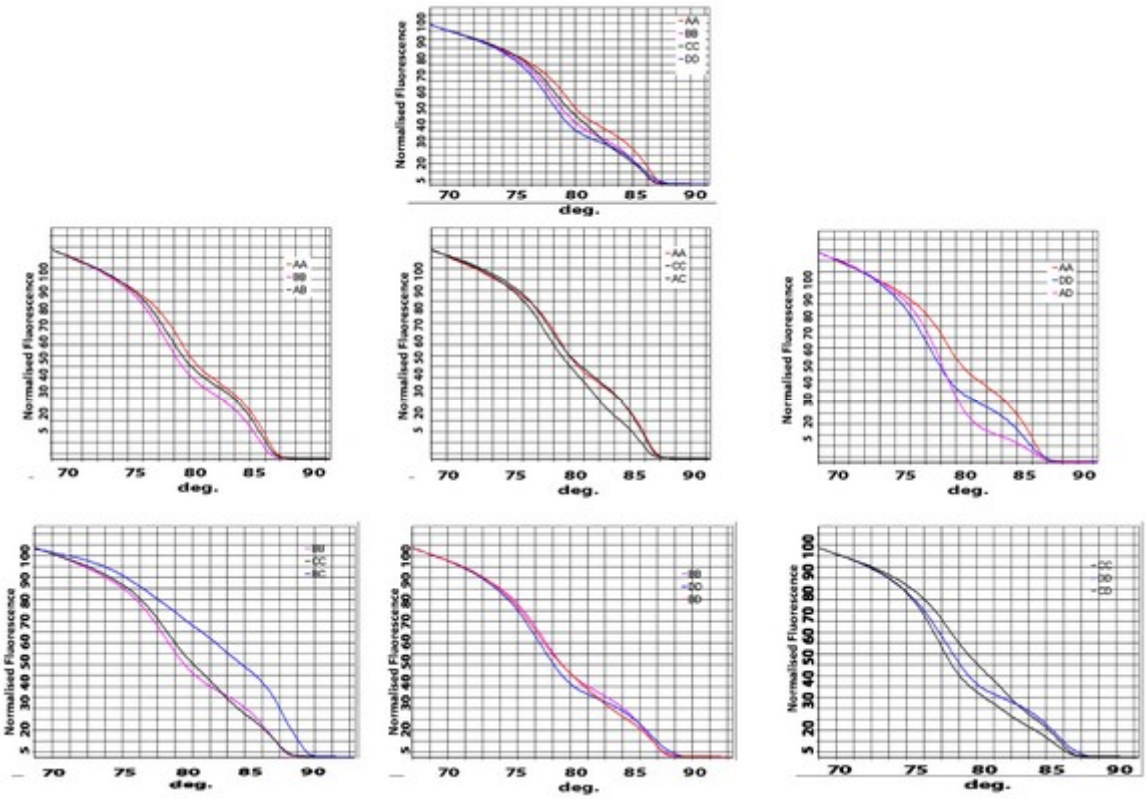
شکل ۲: نمودار دمای ذوب (Tm) و تفکیک آلل‌های هوموزیگوت: الگوی A (آلل ۰۲۰۴)، الگوی B (آلل ۰۵۰۲)، الگوی C (آلل ۰۶۰۱) و الگوی D (آلل ۱۰۰۱)

جدول ۲: داده‌های تحلیل نقطه‌های اوج متغیر دمای ذوب برای ژنوتیپ‌های ژن Bubu-DRB3 گاومیش. هر عدد نمایشگر نقطه ذوب گزارش شده بر حسب سانتی‌گراد توسط دستگاه است.[6]

ژنوتایپ	نقاط تغییر پیام فلورسنت نسبت به تغییر دما (dF/dT) در تحلیل نقطه ذوب (درجه سانتی‌گراد)										
A					81.75						84.75
B		81					84.25				
C			81.5						84.5		
D	78.4	81.1							84.5		
AB				81.65						84.65	
AC	78.15				81.75					84.65	
AD			81.5								
BC						82					
BD	78.25		81.5						84.5		
CD	78.25	81						84.35			

* اختلاف دما در هر نقطه با انحراف معیار کم‌تر از ۰/۱ انتخاب شده است.

1- Melting Temperature ™



شکل ۳: الگوهای HRM مربوط به آلل‌های هوموزیگوت. (a) مقایسه‌ی الگوی A (آلل ۰۲۰۴)، الگوی B (آلل ۰۵۰۲)، الگوی C (آلل ۰۶۰۱) و الگوی D (آلل ۱۰۰۱)در یک تصویر؛ (b تا g) تمایز آلل‌های هوموزیگوت در مقایسه با ترکیب هتروزیگوتی آن‌ها.

بحث

برای تعیین ژنوتیپ DRB3 گاومیش معمولاً از روش‌های مبتنی بر شاخص‌های ریزماهواره و الگوهای برش با آنزیم‌های محدودالاثر (PCR-RFLP) (van Eijk et al. 1992)، و یا از روش دقیق‌تر تعیین توالی مستقیم استفاده شده است (Stafuzza et al. 2016, Takeshima et al. 2015). الگوهای برش آنزیمی از توانایی کافی برای تشخیص برخی تحت تیپ‌های آلل‌های MHC، که اغلب حاصل تغییر در یک نوکلئوتید هستند، برخوردار نیست ولی به تفکیک آلل‌ها کمک می‌کند. 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[1] دارد. برای تشخیص و تفکیک آلل‌ها باید روش‌های بنیان‌سازی (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 هزینه‌ی تنوع ساختارهای تک رشته‌ای DNA (SSCP)[2] 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. روش اخیر برای ژن DRB3 گاومیش استفاده شده است (De et al. 2002).

1- Ambiguity

2- Single stranded conformational polymorphisms (SSCP)

یک روش پیشنهادی برای تعیین تنوع ژنتیکی "تحلیل دقیق دمای شکافت" است. در خصوص تایپینگ MHC این روش تا کنون تنها برای انسان به کار رفته است (Lundgren et al. 2012)، اما به دلیل تشابه ساختار و تنوع این ژن‌ها با سایر پستانداران به نظر می‌رسد بتوان آن را برای گاومیش نیز به کار برد.

در این مطالعه از روش‌های تحلیل دمای ذوب و تحلیل دقیق دمای شکافت برای تعیین ژنوتیپ‌های DRB3 گاومیش استفاده گردید. تحلیل دمای ذوب نشان می‌دهد که اگر چه نتایج آن مطابق با روش‌های دیگر است ولی قابلیت تفکیک دقیق ژنوتیپ را ندارد (جدول ۲). این موضوع با تفاوت بسیار کم نقاط اوج[1] نمودار دمای ذوب مشخص می‌شود. تفاوت‌های کم‌تر از نیم درجه‌ی سانتی‌گراد برای تفکیک و تمایز ژنوتیپ‌ها از ویژگی و دقت بالایی برخوردار نیستند. البته این پدیده تا حدی نیز به ساختار و توالی نوکلئوتیدی ژن DRB3 گاومیش مربوط است.

کاربرد روش HRM برای بررسی تنوع ژن‌های مجتمع عمده پذیرش بافتی در انسان نشان داده شده است (Lundgren et al. 2012). تحلیل نتایج در روش تحلیل دقیق دمای شکافت یا HRM بسیار مشابه با روش SSCP است و در آن تنوع در حد یک نوکلئوتید نیز قابل تشخیص است، با این تفاوت که تمایز الگوها در روش HRP و Tm چشمی نیست و تکرارپذیری و تجدیدپذیری بالایی دارد. در این روش همانند SSCP در وحله‌ی اول امکان تشخیص آلل‌ها وجود ندارد و نتایج تنها نشان دهنده‌ی تنوع ژنوتیپ‌ها هستند، ولی همان گونه که نشان داده شد، نتایج HRM با نتایج تعیین توالی و RFLP تطابق دارد. بنابراین با تطبیق نتایج HRM و Tm با تعیین توالی و یا RFLP می‌شود آلل‌ها را در افراد جمعیت تشخیص داد.

بر اساس تجربیات به دست آمده از تحقیق حاضر می‌توان برای مطالعه‌ی ژن Bubu DRB3 ابتدا کل جمعیت را با روش HRM آزمایش کرد و پس از تعیین الگوها، آزمون تعیین توالی و یا RFLP برای هر الگو انجام شود. ما نشان دادیم که برای ۷۲ نمونه گاومیش ۱۰ الگوی HRM قابل تشخیص است و این بدان معناست که تنها ۱۳/۸ درصد از نمونه‌ها نیاز به آزمایش‌های تکمیلی دارند. با این روش صرفه‌جویی قابل توجهی در وقت و هزینه‌ی آزمایش‌ها خواهیم داشت. البته باید توجه نمود که تعداد کم الگوها در گاومیش به تنوع کم آلل‌ها در این گونه‌ی حیوانی (حدود ۸ آلل) باز می‌گردد و طبیعتاً در بررسی MHC گاو (با حدود ۹۸ آلل) با الگوهای بیش‌تری مواجه خواهیم بود.

در مجموع به نظر می‌رسد استفاده از روش تحلیل دقیق دمای شکافت کاربرد زیادی در بررسی تنوع ژن‌های MHC پیدا کند. اگر چه با این روش نمی‌توان دقیقاً آلل‌های هر کروموزوم را تشخیص داد ولی با توجه به ماهیت هم‌بارز[2] ژن‌های MHC نتایج برای بررسی ارتباط ژنوتیپ با فنوتیپ ایمنی (پاسخ ایمنی و حساسیت یا مقاومت به بیماری) قابل قبول خواهند بود. این استدلال بر این مبنا است که در پاسخ ایمنی تنها یک آلل DRB3 به تنهایی نقش نداشته و هر دو آلل بیان می‌شوند و این ترکیب هر دو آلل (ژنوتیپ) است که تعیین کننده خواهد بود. به هر حال اگر تنها یک آلل هم مؤثر باشد باید ارتباط آن را با یک صفت در ترکیب یا ژنوتیپ هوموزیگوتی بررسی کرد.

1- Peak

2- Codominant

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از از معاونت پژوهشی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران به جهت حمایت و تأمین مالی این تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

Amills, M.; Ramiya,V.; Norimine, J. and Lewin, H.A. (1998). The major histocompatibility complex of ruminants. Revue Scientifique et Technique, 17, 108-120.

Behl, J.D.; Verma, N.K.; Tyagi, N.; Mishra, P.; Behl, R. and Joshi, B.K. (2012). The major histocompatibility complex in bovines: a review. ISRN Veterinary Science, 872710.

De, S.; Singh, R.K. and Butchaiah, G. (2002). MHC-DRB exon 2 allele polymorphism in Indian river buffalo (*Bubalus bubalis*). Animal Genetics, 33: 215-219.

Jin, Y.C.; Wei, P.; Cui, S. and Huang, L. (2015). The Relationship between the three-dimensional (3D) structures of BF molecules and MHC-related Marek's Disease resistance in chickens. Scandinavian Journal of Immunology, 81: 325-327.

Lundgren, A.; Kim, S.; Stadnisky, M.D. and 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.

Nikbakht Brujeni, G.; Ghorbanpour, R. and Esmailnejad, A. (2016). Association of BoLA-DRB3.2 alleles with BLV infection profiles (persistent lymphocytosis/lymphosarcoma) and lymphocyte subsets in Iranian Holstein cattle. Biochemical Genetics, 54: 194-207.

Nikbakht, G. and Esmailnejad, A. (2015). Chicken major histocompatibility complex polymorphism and its association with production traits. Immunogenetics, 67: 247-252.

Osborne, A.J.; Pearson, J.; Negro, S.S.; Chilvers, B.L.; Kennedy, M.A. and Gemmell, N.J. (2015). Heterozygote advantage at MHC DRB may influence response to infectious disease epizootics. Molecular Ecology, 24: 1419-1432.

Stafuzza, N.B.; Olivatto, L.M.; Naressi, B.C.; Tonhati, H. and Amaral-Trusty, M.E. (2016). Analysis of DRB3 gene polymorphisms in Jafarabadi, Mediterranean, and Murrah buffaloes from Brazil. Genetics and Molecular Research, 15.

Takeshima, S.N.; Giovambattista, G.; Okimoto, N.; Matsumoto, Y.; Rogberg-Munoz, A.; Acosta, T.J. et al. (2015). Characterization of bovine MHC class II DRB3 diversity in South American Holstein cattle populations. Tissue Antigens, 86: 419-430.

Unanue, E.R.; Turk, V. and Neefjes, J. (2016). Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease. Annual, Review of Immunology, 34: 265-297.

van Eijk, M.J.; Stewart-Haynes, J.A. and Lewin, H.A. (1992). Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. Animal Genetics, 23: 483-496.

Wang, K.; Sun, D. and Zhang, Y. (2008). Sequencing of 15 new BoLA-DRB3 alleles. International Journal of Immunogenetics, 35: 331-332.

Genotyping of buffalo major histocompatibility complex DRB3 genes using high resolution melting point analysis

Nikbakht Brujeni, Gh.[1]; Alkafajy, A.[2] and Golabdar, S.[3]

Accepted: 04.12.2017 Received: 23.05.2018

Abstract

Major histocompatibility complex (MHC) play a major role in immune responses. Polymorphisms at MHC molecules are associated with the recognition and response to non-self-peptides. Among Bovinae MHC genes, DRB3 is currently used for population genetic and disease association studies. In the present study, the second exon of Bubu-DRB3 was amplified by polymerase chain reaction (PCR), and polymorphisms were detected by three methods of High-resolution melting (HRM), restriction fragment length polymorphisms (RFLP) and direct sequencing. We aimed at genotyping of buffalo DRB3 gene, investigating the feasibility and compatibility of HRM with the current methods. Results of HRM analysis was in concordance with RFLP and direct sequencing. HRM analysis can be used as an analytical method for a large number of buffalo samples. We have concluded that HRM analysis can be used for genotyping of DRB3 and MHC diversity as well as genotype and phenotype association studies. However, lack of allelic discrimination is a notable limitation in HRM method.

Keywords: Major histocompatibility complex, Buffalo, Genotyping, Melting point

1- Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2- PhD Student of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3- DVM Student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
Corresponding Author: Nikbakht Brujeni, Gh., E-mail: nikbakht@ut.ac.ir