

# تمییز آلل‌های MHC سگ (DLA-DRB1) با روش تحلیل دقیق دمای شکافت

سید میلاد واحدی<sup>۱</sup> شهرام جمشیدی<sup>۱</sup> لیلا ننگرانی مهاجر<sup>۱</sup> غلامرضا نیکبخت بروجنی<sup>۲\*</sup>

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

(۲) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

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

## چکیده

**زمینه مطالعه:** نقش مهم مولکول‌های مجتمع عمدۀ پذیرش بافتی (MHC) اتصال به پیتیدهای پادگنی و عرضه آن‌ها به لنفوسيت‌های 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 آلل‌های 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 جمع آوری گردید. پس از استخراج DNA و افزوده سازی آگزون دوم زن DLA-DRB1، تحلیل HRM و منحنی ذوب صورت گرفت. برای تطبیق الگوهای HRM با توالی نوکلئوتیدی آلل‌های، از روش تعیین توالی مستقیم استفاده شد. **نتایج:** بر اساس تنوع مشاهده شده در نتایج HRM و منحنی ذوب، ۴۰ نمونه به ۸ ژنتیپ (A) قابل تقسیم‌بندی بودند. بیشترین فراوانی مربوط به تیپ A (۲۵/۰۰٪) و سپس تیپ C (۱۵/۰۰٪) و E (هر کدام ۸/۲۵٪) بود. در مجموع ۱۷/۵٪ نمونه‌ها هتروزیگوت و ۱۷/۵٪ نمونه‌ها هموزیگوت بودند. **نتیجه گیری نهایی:** مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که برای تاییگ آلل‌های زن DLA-DRB1 از تکنیک HRM با توالی آلل‌ها نشان داد که این روش می‌تواند برای تفکیک آلل‌های DLA-DRB1 به کار رود.

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

MHC در تمامی گونه‌های جانوری به دلیل فشار انتخابی عفونت‌های نوظهور و سازگاریافته و همچنین مکانیسم‌های پیشگیری از درون‌همسری (Inbreeding) از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است. نتیجه این انتخاب طبیعی به صورت فقدان نسبی هموزیگوتی در جمعیت‌های طبیعی تظاهر می‌یابد (۱۳، ۲۴، ۲۵). ارتباط هتروزیگوتی با مقاومت افراد در برابر عفونت‌ها، بیماری‌های انگلی، بیماری‌های با واسطه ایمنی و حتی سرطان‌ها به اثبات رسیده است (۱۸، ۱۵، ۲۲). حفظ تنوع زن‌های MHC امر بسیار مهمی است و این تنوع می‌تواند بر اثر کوچک کردن اندازه جمعیت، محدودیت جغرافیایی و انتخاب برای ویژگی‌های فنتوپی خاص کاهش یابد. درون همسری در سگ‌ها امری شایع است تا به کمک آن ویژگی‌های فنتوپی 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 کفايت لازم در برخورد با عفونت‌ها و افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های خودایمن و سرطان می‌شود (۱). وجود برخی از آلل‌های زن DLA-DRB1 با رخداد بیماری‌های مختلف مثل کراتیت سطحی مزمن، هیپوآدرنوکورتیسیزم و لیشمانیوز سگ‌ها مرتبط است. برخی آلل‌های DRB1 نیز با مقاومت یا حساسیت در برابر بیماری‌های عفونی مرتبطند (۳، ۹، ۱۶)، این یافته‌ها اهمیت بررسی تنوع آلل‌های DLA و بویژه زن DRB1 را دو چندان می‌سازد.

## مقدمه

مجتمع عمدۀ پذیرش بافتی (MHC) نقشی اساسی در پاسخ‌های ایمنی دارد (۱۹). مولکول‌های MHC گلیکوپروتئین‌هایی در سطح یاخته هستند که پیتیدهای پادگنی را به یاخته‌های T عرضه می‌کنند و از این طریق سرنوشت پاسخ‌های ایمنی (همورال یا یاخته‌ای) را رقم می‌زنند. مولکول‌های MHC در سگ، (Dog Leukocyte Antigen) DLA، 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). زن‌های رمز کننده مولکول‌های MHC در سگ، بر روی کروموزوم ۱۲ قرار دارند و ساختار آن‌ها شبیه DQAN است (۱). زن‌های کلاس دو در سگ یک زن عملکردی DQA به نام DLA-DQA1 دارد که با زن DQA1 انسان ارتوЛОگ است. زن DQB به نام DLA-DQB1 نیز در سگ شناخته شده که با DRA، DRB (DLA-DQB1) انسان ارتوЛОگ است. زن‌های عملکردی DQB1 و زن کاذب DRB2 در ناحیه DR قرار دارند. تا کنون حدود ۹۰ آلل DLA-DQB1، ۲۲ آلل برای DLA-DQA1 و ۵۴ آلل برای DLA-DQB1 شناسایی شده است (۱، ۲۲). زن DRB1 سگ (ارتوЛОگ) DQB1 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 و اسرشت اولیه، ۹۵ °C به مدت ۲ min. مرحله دوم شامل ۱۵ چرخه و هر چرخه شامل سه گام: گام اول و اسرشت ۹۵ °C به مدت ۸ s. گام دوم اتصال آغازگرها ۶۵ °C به مدت ۸ s که در هر چرخه ۰/۵ °C کاهش می‌یابد. گام سوم بسط ۷۲ °C به مدت ۸ s.

برنامه PCR مرحله دوم به صورت زیر در دستگاه Real time شرکت Qiagen انجام شد: مرحله اول و اسرشت اولیه، ۹۵ °C به مدت ۲ min. مرحله دوم شامل ۳۰ چرخه و هر چرخه شامل سه گام: گام اول و اسرشت ۹۵ °C به مدت ۸ s. گام دوم اتصال آغازگرها ۵۹/۸ °C به مدت ۸ s. گام سوم بسط ۷۲ °C به مدت ۸ s. مرحله سوم بسط نهایی ۷۲ °C به مدت ۵ min در نهایت به منظور رویت نتایج حاصل از واکنش PCR و ارزیابی کیفیت و طول قطعه تکثیر شده، ۱ml ۱۰ ممحضول دور دوم به همراه ۱ml ۲ بافر بارگزاری X6 به مدت ۴۵ min با ولتاژ ۷۰ روی ژل آکارز ۱٪ الکتروفورز شد. پس از آن ژل با اتیدیوم بروماید (ml/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 Melt Curve و Real-time Melt Curve در دستگاه Rotor-Gene Q شرکت Qiagen صورت گرفت. محدوده دمایی داده شده جهت تحلیل HRM ۹۵ تا ۵۰ °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 در محدوده دمایی ۷۰ تا ۹۸ °C صورت گرفت.

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

## نتایج

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

تاکنون روش‌های گوناگونی برای بررسی تنوع و ژنتوایپینگ آل‌های MHC مورد استفاده قرار گرفته است که عبارتند از: روش‌های سرولوژیک، PCR، کشت مخلوط لفوسیت‌ها، PCR-RFLP، ایزوالتکنیک فوکوسینگ، Next Generation SSCP، توالی یابی مستقیم، نسل آلتی تعیین توالی (Heteroduplex analysis)، تحلیل هترودوپلکس (Sequencing استفاده از الیگونوکلئوتیدهای اختصاصی و استفاده از ریزماهوارهای HRM-High یکی از روش‌های نوین، تحلیل دقیق دمای شکافت (Resolution Melting) است. از آنجایی که برخلاف 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 (۱۲، ۱۷). هدف از مطالعه حاضر تمیزی 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 جمع آوری و در لوله‌های حاوی ماده ضدانعقاد EDTA ذخیره گردید. نمونه‌های خون تازمان استخراج DNA در دمای ۰ °C-نگهداری شدن و سپس جهت استخراج DNA به آزمایشگاه اینمی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انتقال یافتند. اطلاعات مربوط به نمونه‌های جمع آوری شده در جدول ۱ نشان داده شده است. استخراج i-DNA از نمونه‌های خون با کیت تجاری i-genomic Blood (Korea Mini Kit) درستورالعمل کیت انجام شد. نمونه‌ها تازمان آزمایش در ۰ °C-نگهداری شدند.

افزوده سازی اگزون دوم DLA-DRB1 (افزوده سازی اگزون دوم DLA-DRB1 جهت آزمون HRM): به منظور بررسی تنوع با روش Nested-PCR برای افزوده سازی اگزون دوم ژن DLA-DRB1 استفاده شد. واکنش در حجم نهایی ۲۵ ml ۲۰ ng شامل ۱۰ pM ژنومی، اول از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی (در مرحله DRBF: GAT ۲۰۰۸ و Kennedy همکاران در سال ۱۹۹۷) و طبق CGC CCG CTG :DRBR<sup>۱</sup> و DRBTF: CCC و در مرحله دوم از پرایمرهای طراحی شده؛ CGC TCA CCC CCA CGT CGC :DRBTR<sup>۱</sup> و در مرحله دوم از پرایمرهای طراحی شده؛ CCG TCC CCA CAG ۱/TGT C, mM<sup>۲۰۰</sup> dNTPs mM<sup>۵</sup> و یک واحد آنزیم پلی مراز Taq (سیناکلون، ایران) صورت گرفت. واکنش مرحله دوم با تغییر غلظت کلرید منیزیم (۲/۵ mM) و آغازگرهای با شرایط مشابه مرحله اول انجام شد. به منظور انجام آزمون HRM یک Dye EvaGreen<sup>®</sup> (Biotium, Germany) با غلظت ۰/۵ Mm<sup>۱</sup>، نیز به واکنش مرحله دوم

تحلیل Melt curve، براساس تنوع مشاهده شده تعداد ۴۰ نمونه به ۸ ژنتیپ (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.

براساس تحلیل Melt curve و HRM، ۸۲/۵٪ نمونه‌ها هتروزیگوت 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 دو شیب 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 ژنتیپ 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 پیتیدهای پادگنی به لنفوسيت‌های T هستند و یاخته‌های T تنها پس از شناسایی پیتیدهای در کنار MHC پاسخ ایمنی را آغاز می‌کنند. اگرچه ژن‌های MHC I کلاس I در همه یاخته‌های بیان می‌شوند اما پاسخ ایمنی مناسب نیازمند عرضه پیتیدهای آنتی‌ژنی توسط مولکول‌های MHC کلاس II 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 پیتیدی 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 آل تیپ A و سپس تیپ C و

جدول ۱. اطلاعات نمونه‌های جمع آوری شده جهت بررسی پایی مورفیسم ال‌های ژن DLA-DRB۱

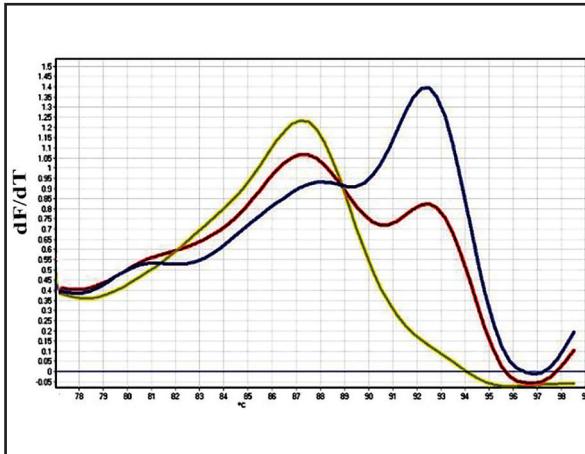
فرافانی ژنتیپ	تعداد نمونه	میانگین سنی گروه کنترل	تزاد
Terrier	۱۹	A (۰.۲۱/۰.۰۵)	۸ سال و ۸ ماه
C (۰.۲۱/۰.۰۵)			
F (۰.۱۵/۰.۷۹)			
B (۰.۱۰/۰.۵۳)			
E (۰.۱۰/۰.۵۳)			
G (۰.۱۰/۰.۵۳)			
D (۰.۰۵/۰.۲۶)			
H (۰.۰۵/۰.۲۶)			
Shih Tzu	۱۰	A (۰.۳۰/۰..)	۸ سال و ۶ ماه
E (۰.۳۰/۰..)			
G (۰.۲۰/۰..)			
C (۰.۱۰/۰..)			
F (۰.۱۰/۰..)			
German Shepherd	۴	A (۰.۵۰/۰..)	۱۱ سال و ۶ ماه
B (۰.۲۵/۰..)			
H (۰.۲۵/۰..)			
Pekignese	۴	A (۰.۲۵/۰..)	۱۱ سال
B (۰.۲۵/۰..)			
C (۰.۲۵/۰..)			
H (۰.۲۵/۰..)			
Great Dane	۲	D (۰.۵۰/۰..)	۷ سال و ۹ ماه
F (۰.۰۵/۰..)			
Chihuahua	۱	E (۰.۱۰/۰..)	۱۱ سال و ۶ ماه

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

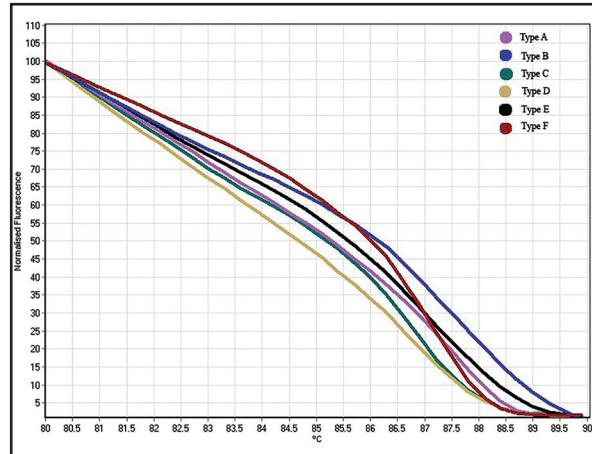
ژنتیپ	هموزیگوتی یا هتروزیگوتی در توالی یابی	فرافانی (%)
A	هموزیگوت	۲۵/۰۰
B	هتروزیگوت	۱۰/۰۰
C	هتروزیگوت	۱۵/۰۰
D	هتروزیگوت	۵/۰۰
E	هتروزیگوت	۱۵/۰۰
F	هتروزیگوت	۱۲/۵۰
G	هتروزیگوت	۱۰/۰۰
H	هتروزیگوت	۲/۵۰

۲۶۰/۲۸۰ nm جهت بررسی خلوص DNA و آلدگی‌های فنولی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. غلظت DNA در تمامی نمونه‌ها بالای ۱/ $\mu$ g/ng 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 Melt curve و HRM بر اساس نتایج تحلیل HRM و

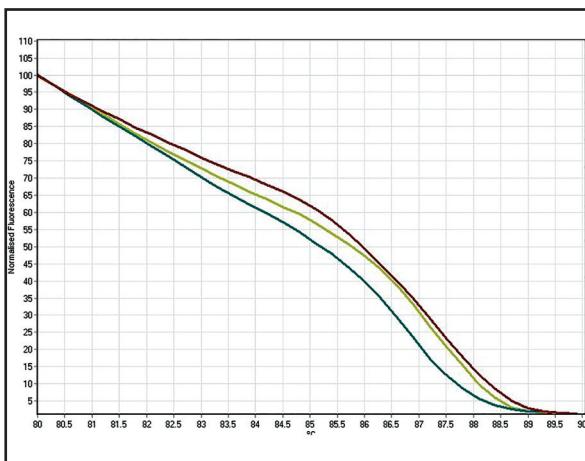




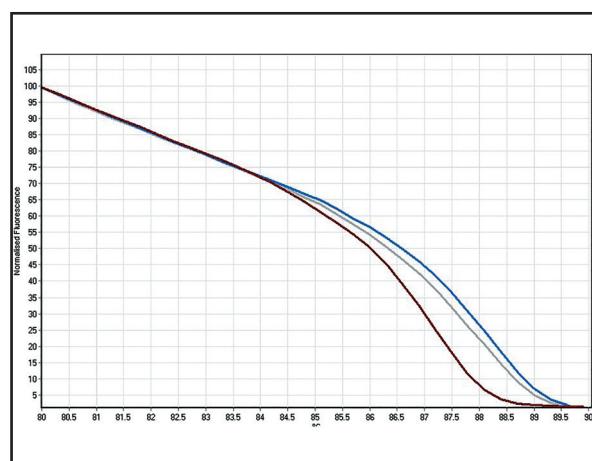
تصویر ۲. تحلیل Melt curve. نمونه‌های آبی و قرمز هتروزیگوتی و نمونه زرد هموژیگوتی را نشان می‌دهد.



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 هموژیگوت شناسایی شده در تحلیل HRM.

پاسخ‌های اینمنی حائز اهمیت است.

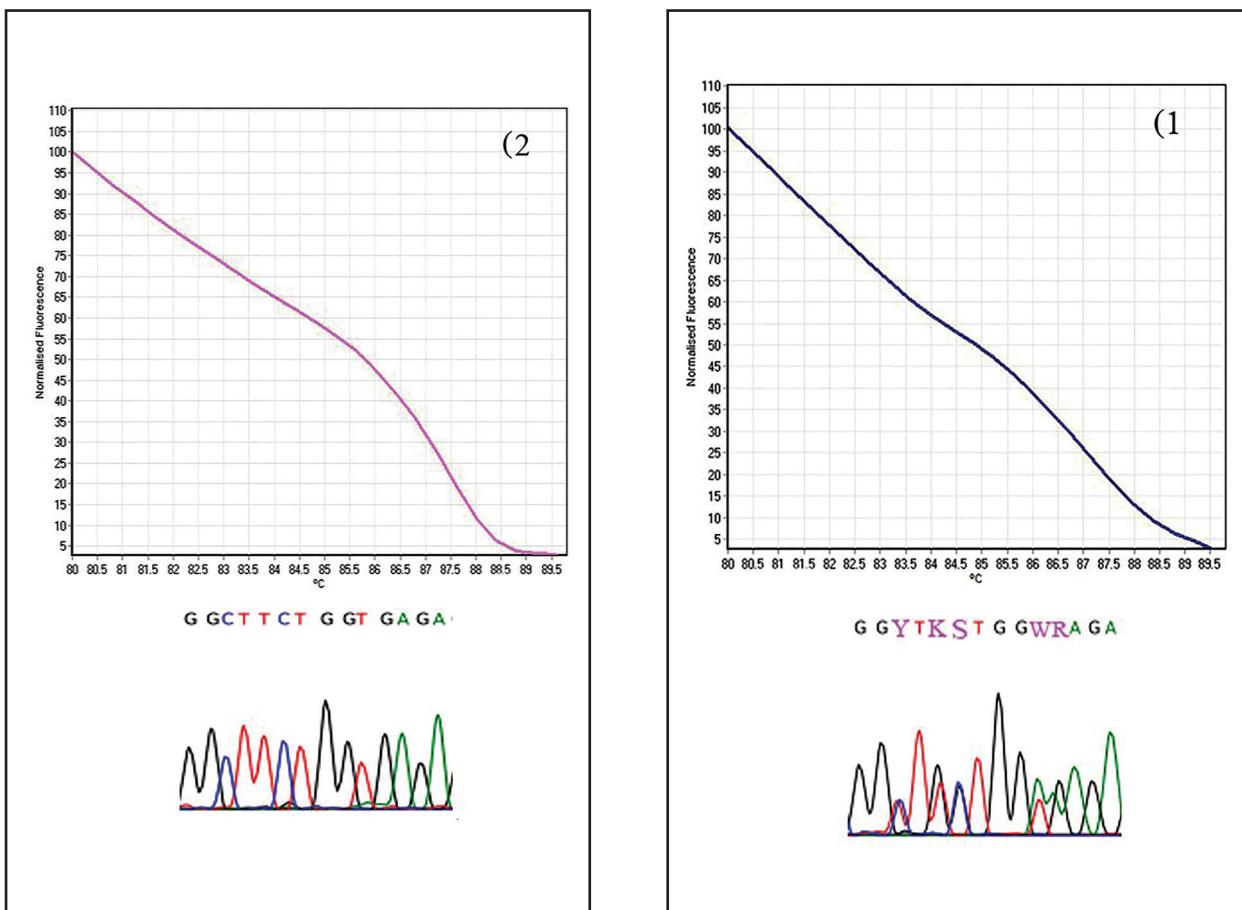
به منظور تعیین تنوع جایگاه‌زنی مذکور، از روش‌های مختلف جهت ارزیابی چندشکلی استفاده می‌شود که پیش‌تر به آن‌ها اشاره شد (۱۴، ۲۱). یکی از این روش‌ها، روش HRM و تعیین توالی مستقیم DNA بر روی محصول PCR می‌باشد که نتایج قابل قبول‌تر و مطمئن‌تری ارائه می‌دهد (۱۲، ۱۷). در این مطالعه برای اولین بار از این روش به طور اختصاصی جهت ارزیابی تنوع آلی اگزون دوم این زن در سگ استفاده شد. شایان ذکر است روش رایج در سایر مطالعات اغلب PCR-SSCP یا PCR-RFLP می‌باشدند 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 تایپیگ آل‌های زن DLA-DRB1 از تکنیک HRM استفاده شده است. گرچه تا کنون مطالعاتی هر چند اندک در انسان جهت تایپینگ آل‌های آنتی‌زن لکوسیتی صورت گرفته است (۱۲، ۱۶).

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

E بود که حاکی از این موضوع است که به نظر می‌رسد چند آلل خاص، واحد 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 شیزو داشتند و مجموع فراوانی دو ژنوتیپ A و C در نژاد تریر بیشتر از ۴۰٪ و مجموع دو ژنوتیپ A و E در نژاد شیزو بیشتر از ۶۰٪ بوده است. بررسی نژاد زمرن شفرد می‌توان به غله ژنوتیپ A پی برد. در این تحقیق تنوع و خصوصیات ژنتیکی آلل‌های MHC مربوط به ناحیه کد کننده اگزون دوم زن DLA-DRB1 در سگ‌های ایران نیز بررسی شد. بررسی تنوع آلل‌های MHC کلاس‌دو از جنبه‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است. این بخش از MHC تنوع قابل ملاحظه‌ای دارد تا عرضه آلتی‌زن‌های مختلف امکان پذیر 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

	10	20	30	40	50	60	
A	CACATTTGGGTAGAAGGTTAAGTTCGAGTGCCATTCAACGGACGGAGCGGGTGC						
B	TT.R..T.YA.K.						
C	TT.G..T.A..						
D	TT.G..GT.CA.KY..Y..						
E	TT.R..T.K.A.K..						
F	TT.R..T.A..						
G	T.A..T.T..GC..						
H	TT.G..GT.CA.KC..Y..						
	70	80	90	100	110	120	
A	GGCTTCTGGTGAGAGACATCTATAACGGGAGGAGATCCTGCGCTTCGACAGCGACGTGG						
B	.T.YS..WA..R..			YA.G..			
C	.T.YS..AR..T..C..			YW.G..			
D	.T.CG..AA..T..C..			TA.G..			
E	..AR..K..			YA.G..			
F	.Y.KS..WR..			YA.G..			
G	..C..RR..			T.G..			
H	.T.CG..AA..T..Y..			WA.G..			

تصویر ۵. هم‌دیفی توالی‌های ژنوتیپ‌های زن DLA-DRB مختلف که بر روی آنها تحلیل HRM انجام شد.



تصویر ۶. تأیید نتایج HRM توسط سکانسینگ در دو نمونه هموزیگوت و هتروزیگوت (نمونه ۱ هتروزیگوتی و نمونه ۲ هموزیگوتی 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 آلل‌های MHC مورد استفاده قرار گیرد. چنانکه بتوان با توالی‌بایی و تشخیص آلل‌ها برای هر یک الگوی مشخص HRM تعریف نمود تا در مطالعات بعد تنها با استفاده از تحلیل HRM بتوان نوع آلل را به راحتی مشخص نمود. تحقیق بر روی سایر نژادها با توجه به تنوع نژادی بالا در سگ و همچنین مطالعه بروی سایر زن‌های MHC کلاس دو و زن‌های



## 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 hypoadrenocortism 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., Brahmshtkri, B.P. and Solanki, J.V. (2004) PCR-SSCP typing of MHC in cattle and buffaloes. *Indian J Anim Sci.* 74(6): 637-639.
- Planell, D., Nagore, E., Moret, A., Botella-Estrada, R., Vila, E., Guillen, 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. (9<sup>th</sup> 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 Describination of Canine MHC (DLA-DRB1) by High Resolution Melt Analysis

Vahedi, S.M.<sup>1</sup>, Jamshidi, Sh.<sup>1</sup>, Lankarani Mohajer, L.<sup>1</sup>, Nikbakht Brujeni, Gh.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department 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