

دستورالعمل فنی

ژنوتیپ سنجی SNP با استفاده از روش ذوب با وضوح بالا (HRM)



نویسندگان

زهرا سادات شبر، مهدی پیل آقایی

رسالة محمد بن عبد الله



نوع نشریه: دستورالعمل فنی

نام نشریه: ژنوتیپ سنجی SNP با استفاده از روش ذوب با وضوح بالا (HRM)

نویسندگان: زهرا سادات شبر، مهدی پیل آقایی

ویراستار علمی: پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

ویراستاران ادبی:

تهیه شده در: سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی

شمارگان:

نوبت انتشار: اول

سال انتشار: 1405

مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است



شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی 69237 به تاریخ 1405/2/12 است



ژنوتیپ سنجی SNP با استفاده از روش ذوب با وضوح بالا (HRM)

نویسندگان
زهرا سادات شبر، مهدی پیل آقایی

فهرست

5	مقدمه
5	ذوب با وضوح بالا (HRM)
6	کاربرد ها
7	عوامل کلیدی موثر بر سنجش HRM
7	طراحی آغازگر
7	طول آمپلیکون
9	کیفیت DNA
10	انتخاب رنگ
11	انواع رنگهای مورد استفاده در HRM
12	روش انجام Real time PCR برای تکنیک HRM
13	دستورالعمل اجرا
16	آنالیز HRM

مقدمه

در طول 30 سال گذشته، استفاده از ژنوتیپ‌سنجی، سبب شناسایی و نقشه برداری از ژن‌ها و مسیرهای متابولیکی در گیاهان شده و همچنین مطالعه تنوع و تکامل گونه‌ها و گزینش مبتنی بر نشانگر (MAS^۱)، را امکان پذیر کرده‌است (Deschamps et al., 2012). استفاده از پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) به‌عنوان نشانگر برای ژنوتیپ‌سنجی با استفاده از توالی‌یابی مجدد، توانایی تشخیص تغییرات در اهداف خاص را افزایش داده است. مهمتر از آن، افزایش اطلاعات در مورد میلیون‌ها SNP در سطح ژنوم یا حذف/درج‌های^۲ کوچک و زمینه توالی اطراف آن‌ها، پایه و اساس ژنوتیپ‌سنجی با توان عملیاتی بالا را ایجاد می‌کند (Deschamps et al., 2012). اگرچه تشخیص تغییرات مربوط به تک نوکلئوتید از تغییرات دیگر دشوارتر است، روش‌های متعددی را می‌توان برای شناسایی جهش SNP در ژنوم مورد استفاده قرار داد. روش‌های رایج برای تشخیص SNP شامل روش‌های توالی‌یابی DNA ژنومی (به عنوان مثال، توالی‌یابی کل ژنوم (WGS)^۳) و توالی‌یابی هدفمند (ژن) و روش‌های مبتنی بر PCR (به‌ویژه با استفاده از پلت‌فرم‌های qPCR^۴) و روش‌های تشخیص دیگر شامل طیف سنجی جرمی^۵، SNaPshot، روش‌های ریزتراشه^۶، و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالای دنا توره کننده (DHPLC)^۷ است (Jian and Li, 2021).

تبدیل مولکول DNA دو رشته ای به دو رشته منفرد آن، دنا توره شدن یا ذوب DNA، برای سال‌های زیادی برای مطالعه ساختار و ترکیب DNA مورد استفاده قرار گرفته است. پیشرفت‌های تکنولوژیکی اخیر، به ویژه برای تشخیص تنوع در توالی DNA پتانسیل این فناوری را بهبود بخشیده است. حساسیت و ویژگی به طور قابل توجهی با توسعه رنگ‌های DNA اشباع‌کننده و بهبود در ابزار دقیق برای اندازه‌گیری رفتار ذوب (بهبود دقت دما همراه با افزایش اندازه‌گیری در واحد زمان و کاهش دما) افزایش یافت (Vossen et al., 2009).

ذوب با وضوح بالا (HRM)

ذوب با وضوح بالا برای نخستین بار در سال ۲۰۰۳ به صورت مشترک توسط دانشگاه یوتا و یک مرکز پژوهشی به نام ایداهو در ایالات متحده معرفی شد و اساس آن، توجه به الگو و رفتار ذوب DNA دورشته‌ای است. میزان به کارگیری این فن در کارهای پژوهشی، در مقایسه با سایر فنون به نحو چشمگیری رشد کرده و دلایل این رشد زیاد را می‌توان در شایستگی‌ها و مزیت‌هایی دانست که این روش به خود اختصاص داده‌است (Wittwer et al., 2003).

^۱ Marker assisted selection

^۲ Deletion/Insertions

^۳ Whole genome sequencing

^۴ Quantitative polymerase chain reaction

^۵ Mass spectrometry

^۶ Microchip

^۷ Denaturing High Performance Liquid Chromatography

تجزیه و تحلیل ذوب با وضوح بالا (HRM) یک تکنیک بیولوژی مولکولی تک مرحله ای ساده و مبتنی بر PCR است که قادر به تعیین دمای ذوب یک آمپلیکون PCR است. اساس فن HRM توجه به الگو و رفتار ذوب رشته‌های DNA در یک دمای خاص می‌باشد. دمای ذوب (T_m)، دمایی است که در آن نصف رشته‌های DNA به صورت تک رشته و نصف دیگر به صورت دورشته وجود دارند (Perini et al., 2021). الگوی تک رشته‌ای شدن رشته‌های DNA برای قطعات مختلف DNA با توجه به توالی نوکلئوتیدی تشکیل دهنده باهم متفاوت بوده و کاملاً اختصاصی عمل می‌کند (Cui et al., 2013). تفاوت این رفتار به صورت یک منحنی با عنوان "منحنی ذوب" نشان داده می‌شود و عواملی مانند طول قطعه، وجود هتروزیگوسیتی، غلظت بازهای C و G در قطعه دورشته‌ای مورد نظر، نحوه توزیع بازها و اثر استاتیک بازها بر یکدیگر بر آن اثر می‌گذارند. در واقع تفاوت الگوی منحنی، موجب شناسایی قطعه مورد نظر می‌شود (Noori-Daloii and Faraji, 2016). با افزایش دمای محلول، توالی خاص آمپلیکون رفتار ذوب را تعیین می‌کند. هنگامی که سیگنال فلورسانس در برابر دما ترسیم می‌شود، شدت فلورسانس که به DNA دورشته ای متصل شده کاهش می‌یابد زیرا DNA دو رشته ای تک رشته می‌شود و رنگ آزاد می‌شود (Er and Chang 2012).

کاربردها

می‌توان از الگوی منحصر به فرد منحنی ذوب، نمودار مشتق یا نمودار تمایز برای اسکن جهش استفاده کرد. اسکن ژن به تشخیص تغییرات در شکل منحنی ذوب آمپلیکون بستگی دارد که از تغییر توالی هتروزیگوت ناشی می‌شود (Er and Chang 2012). ذوب با وضوح بالا یک روش سریع، حساس و دقیق است که در اصل برای تعیین ژنوتیپ دارای پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) و تشخیص جهش‌ها توسعه یافته است (پیل‌آقایی و همکاران، 1403). بر این اساس، تشخیص اختلالات ژنتیکی انسان، به ویژه اختلالات اتوزومال مغلوب، غالب و مرتبط با X، یکی از بزرگترین کاربردهای آنالیز HRM بوده است (Er and Chang 2012). سهولت استفاده، سادگی، انعطاف پذیری، هزینه کم، ماهیت غیر مخرب، حساسیت فوق العاده، HRM را به سرعت به ابزاری مناسب برای ژنوتیپ‌سنجی در کشاورزی تبدیل کرده است (پورداد و همکاران، 1403).

دقت و حساسیت بالا در ردیابی تغییرات و واریانتهای ژنتیکی، سرعت بالا در آنالیز نمونه‌ها، در دسترس بودن نمونه‌ها به خاطر سالم ماندن پس از پایان آنالیز، امکان استفاده دوباره یا استفاده از سایر فنون روی نمونه‌ها، قابلیت به کارگیری متعدد (استفاده در مطالعات پیوستگی، ژنوتیپ‌سنجی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP)، نقشه‌برداری DNA، ردیابی جهش‌ها و بررسی الگوی متیله شدن) و آشکاربودن نتایج، شماری از مزیت‌های فن HRM می‌باشد. بر همین اساس، این فن به عنوان یک روش مرسوم و پرکاربرد در آزمایشگاه‌های علوم مولکولی و به ویژه ژنتیک مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Noori-Daloii and Faraji, 2016).

استاندارد فعلی برای بررسی نتیجه PCR یا هضم، آنالیز محصول با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و رنگ آمیزی اتیدیوم برومید است. هویت قطعه با طول آن، خلوص با عدم وجود قطعات دیگر، و عملکرد با قدرت فلورسانس باند مشخص می شود. HRM یک جایگزین جذاب است و در آن هویت با مشخصات ذوب، خلوص با عدم وجود اعوجاج از منحنی ذوب شاهد (و عدم وجود پیک های ذوب اضافی) و بازده با مقدار سیگنال فلورسانس مشخص می شود. مزایای استفاده از HRM واضح است. برخلاف بسیاری از تکنیک های دیگر (مانند SSCA، dHPLC، DGGE یا الکتروفورز موئین)، به هیچ دستکاری اضافی (بدون هضم یا ژل آگارز و استفاده از مواد شیمیایی خطرناک (اتیدیوم-برومید)) پس از PCR نیاز ندارد، و صرفه جویی قابل توجهی در هزینه حاصل می شود (De Juan et al., 2009). از طرفی ذوب سریعتر از الکتروفورز است و تجزیه و تحلیل داده ها به صورت خودکار انجام می شود. علاوه بر این، از آنجایی که این یک روش غیر تخریبی است، زمانی که HRM نتایج واضحی ارائه نمی دهد، قطعات همچنان می توانند بر روی ژل تجزیه و تحلیل شوند (Vossen et al., 2009).

عوامل کلیدی موثر بر سنجش HRM

طراحی آغازگر

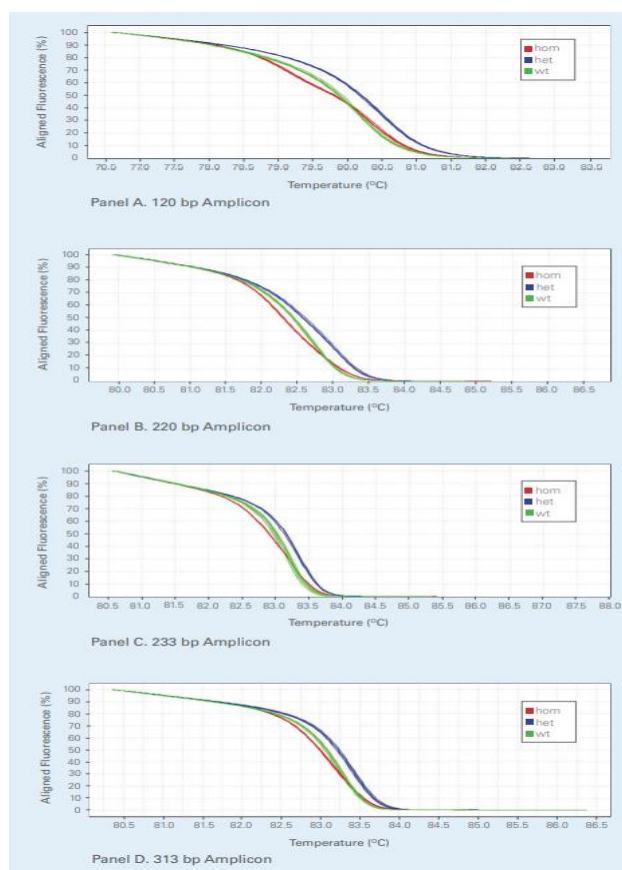
طراحی چندین جفت آغازگر کمک می کند تا اطمینان حاصل شود که حداقل یک جفت بسیار قوی خواهید داشت. هر جفت آغازگر باید از نظر اتصال اختصاصی به هدف مورد نظر آزمایش شود و حداقل پرایمر-دایمر و محصولات غیر اختصاصی تولید کند. بهتر است پرایمرها با کیفیت بالا سنتز شده و توسط HPLC خالص سازی شوند تا آلودگی به حداقل برسد (پیل آقایی و همکاران، 1403).

PCR و سپس آنالیز منحنی ذوب باید برای جستجوی محصولات غیر اختصاصی و پرایمر-دایمرها انجام شود. علاوه بر آنالیز استاندارد، پروفایل های ذوب با وضوح پایین نیز باید مشاهده شوند تا محصولات دیگر را مشاهده کنید. نرم افزار HRM ممکن است نتواند تمام محصولات واکنش غیر اختصاصی را در صورتی که مشخصات ذوب آن ها مشابه باشد تشخیص دهد. در نتیجه، ارزیابی اولیه محصولات PCR از هر جفت آغازگر با الکتروفورز ژل آگارز بهترین روش است. هنگامی که بهترین جفت آغازگر انتخاب شد، سایر عوامل واکنش را می توان بهینه سازی کرد. توصیه می شود برای بررسی کیفیت داخلی PCR که ابزار می تواند ارائه دهد، تجزیه و تحلیل HRM را بر روی یک ابزار qPCR انجام داد (A Guide to High Resolution Melting Analysis, 2023).

طول آمپلیکون

طول قطعه باید بین 120 تا 300 نوکلئوتید باشد: هرچه طول قطعه بیشتر باشد، احتمال حضور SNP های ناخواسته در ناحیه مورد نظر افزایش یافته و در نتیجه منحنی های حاصل پیچیده تر می شود (شکل 1). همچنین، با افزایش طول قطعه احتمال تشکیل ساختارهای ثانویه برای DNA دورشته ای افزایش می یابد که به واسطه ساختار متفاوت، الگوی ذوب متفاوتی خواهند داشت. تأثیر یک تغییر بر شکل منحنی ذوب با افزایش طول آمپلیکون کاهش می یابد، و آمپلیکون های با بیش از 500 جفت

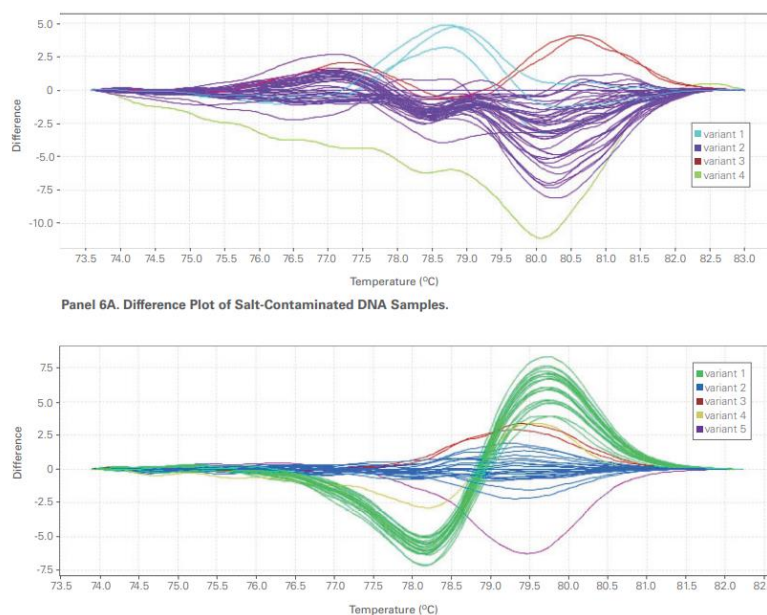
باز اغلب رفتار ذوب چند فازی را نشان می‌دهند که تشخیص تغییرات را مختل می‌کند. بنابراین، ممکن است اگزون‌های طولانی برای غربالگری جهش نیاز به تقسیم‌بندی به چند آمپلیکون داشته باشند (Er and Chang 2012). توصیه می‌شود پس از انتخاب، ناحیه مورد نظر از لحاظ تشکیل ساختارهای ثانویه نیز بررسی شود. برای این منظور باید از سایت DINAMELT استفاده شود، به این نحو که توالی مورد نظر را در ناحیه تعیین شده وارد نموده و گزینه Submit انتخاب شود. در نهایت شکل ساختارهای ثانویه به همراه میزان ΔG تشکیل هر کدام نمایش داده می‌شود. لازم به ذکر است که میزان قابل قبول ΔG برای تشکیل ساختارهای ثانویه تا -1 است. چنانچه طول قطعه کمتر از 70 نوکلئوتید باشد، میزان اتصال رنگ فلوروسنس کم بوده و در نهایت ردیابی و ثبت تغییرات رنگ فلوروسنس مشکل خواهد بود (Noori-Daloii & Faraji, 2016). اگرچه آنالیز HRM برای قطعات تا 600 جفت باز و بیشتر گزارش شده است، تجربه نشان می‌دهد که این فناوری برای قطعات کوچکتر حساس تر است. برای حساسیت بالا حیاتی است که پروفایل ذوب بیش از یک تا دو حوزه ذوب نباشد، هنگامی که قطعات حاوی دامنه‌های ذوب بیشتری هستند، احتمال اینکه همه واریانت‌ها شناسایی نشوند افزایش می‌یابد (Vossen et al., 2009).



شکل 1) اثر افزایش اندازه آمپلیکون بر تجزیه و تحلیل HRM

کیفیت DNA

یکی از بزرگ‌ترین عوامل مرتبط با کیفیت DNA که می‌تواند بر نتایج HRM تأثیر بگذارد، نمک است، زیرا می‌تواند روی روند تغییر دمای ذوب تأثیر بگذارد. اگر کنترل نشود، انتقال نمک و سایر مصنوعات می‌تواند تفسیر منحنی‌های ذوب DNA را پیچیده کند، که منجر به تکرارپذیری پایین‌تر و نرخ خطای بالاتر در فراخوان‌های نوع HRM می‌شود. برخی از کیت‌های جداسازی DNA تجاری از نمک بالا (1M) برای شستشوی اسید نوکلئیک از ستون‌ها یا فیلترها استفاده می‌کنند. این نمونه‌ها باید قبل از PCR در یک بافر کم نمک مانند تریس 108 میلی مولار⁸، EDTA ۹ میلی مولار رسوب داده و مجدداً حل شوند. افزایش pH ناشی از استفاده از NaOH ۱۰ در روش‌های جداسازی نیز می‌تواند بر تجزیه و تحلیل HRM تأثیر بگذارد. استفاده مجدد از TE می‌تواند این مشکل را برطرف کند. شکل 6 نمودار تفاوت بدست آمده از تکثیر نمونه‌های DNA با کیفیت پایین را نشان می‌دهد. روش استخراج مورد استفاده برای این نمونه‌ها منجر به انتقال آلاینده‌ها و نمک‌های PCR شد که اثرات چشمگیری بر منحنی‌های ذوب داشت. قله‌های متعدد و گسترش زیاد جمعیت‌های آمپلیکون الگویی پیچیده ایجاد می‌کند که تفسیر آن دشوار است. شکل 6 نمودار تفاوت نمونه‌های DNA یکسان را نشان می‌دهد که قبل از تکثیر PCR تحت رقت قرار گرفته‌اند. کاهش نمک و سایر آلاینده‌ها در PCR منجر به ایجاد پروفایل‌های ذوب می‌شود که صاف‌تر، گروه‌بندی محکم‌تر و راحت‌تر به خوشه‌های شفاف جدا می‌شوند (Vossen et al., 2009).



شکل 2) نمودارهای تفاوت نمونه‌های DNA آلوده. انواع نمونه DNA با استفاده از کیت جداسازی تجاری با استفاده از شستشوی با نمک بالا، جداسازی شدند که منجر به DNA آلوده به نمک شد. نمونه‌ها تقسیم شدند و نیمی از آنها به نسبت 1:100 در آب رقیق شدند. نمودارهای تفاوت تجزیه و تحلیل HRM نمونه‌های رقیق نشده (A) و رقیق شده نشان

⁸ Tris

⁹ Ethylenediaminetetraacetic acid

¹⁰ Sodium hydroxide

داده شده است، که نشان می‌دهد چگونه رقت یک نمونه آلوده اغلب می‌تواند کیفیت داده‌ها را افزایش دهد (A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis ., 2023)

DNA با کیفیت پایین ممکن است محصولات PCR غیر اختصاصی تولید کند که در نهایت منجر به نمره گذاری نادرست نتایج در آنالیز HRM یا واکنش‌های ناموفق می‌شود. نمونه‌هایی که در مرحله PCR با تأخیر تکثیر می‌شوند یا به حداکثر شدت سیگنال مطلوب نمی‌رسند، ممکن است در آنالیز HRM منجر به نتایج مبهم یا غیرقطعی شوند. برای بهترین نتایج، تمام نمونه‌های DNA در یک آزمایش آنالیز باید با استفاده از روش مشابه تهیه شوند. مقدار ورودی DNA به PCR نیز باید مشابه باشد. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل HRM باید بلافاصله پس از PCR در صورت امکان انجام شود. اگر تجزیه و تحلیل فوری امکان پذیر نباشد، محصولات PCR را می‌توان در دمای -20°C درجه سانتیگراد برای ذوب مجدد، تکثیر مجدد یا توالی‌یابی بعدی نگهداری کرد (A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis ., 2023).

انتخاب رنگ

آنالیز HRM از رنگ‌های متصل‌شونده به DNA دو رشته‌ای (dsDNA^{11}) استفاده می‌کند که در غلظت‌های نسبتاً بالا، PCR را مهار نمی‌کنند. مقدار رنگ فلورسنت متصل به DNA دو رشته‌ای می‌تواند با طول آمپلیکون، ترکیب و شرایط PCR متفاوت باشد. رنگ بیش از حد می‌تواند فرم دو رشته‌ای را تثبیت کند، به طور مصنوعی 12Tm را جابجا کند یا PCR را مهار کند. رنگ بسیار کم می‌تواند منجر به سیگنال کم و نتایج نادرست شود. در حالت ایده‌آل، غلظت بهینه رنگ باید با آزمایش تجربی از طریق آزمون تیتراسیون تعیین شود.

غلظت رنگ کمی بالاتر و کمتر از غلظت اولیه توصیه شده باید برای تعیین غلظتی که حداکثر فلورسانس را بدون مهار PCR می‌دهد آزمایش شود. این رنگ‌ها حساس به نور هستند و در صورت عدم استفاده باید از نور محافظت شوند. برخی از رنگ‌ها در شکل رقیق شده خود پایدار نیستند، بنابراین برای هر آزمایش باید رقت‌های تازه تهیه کرد. برای نگهداری و رقیق سازی باید دستورالعمل‌های سازنده را به دقت دنبال کرد. رنگ‌های مورد استفاده برای آنالیز HRM، رنگ‌های اتصال به DNA دو رشته‌ای هستند که روشن‌تر از رنگ‌هایی هستند که قبلاً استفاده می‌شدند و PCR را در غلظت رنگ بالا مهار نمی‌کنند.

¹¹ Double strand DNA

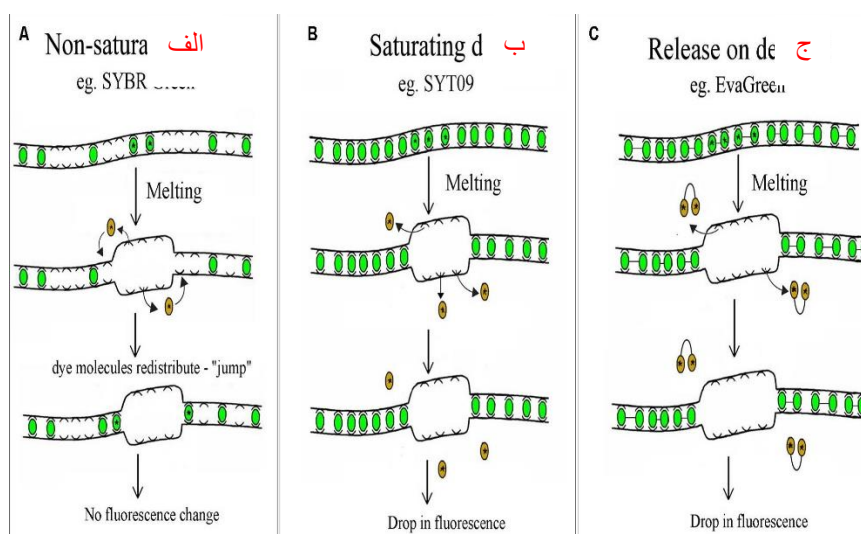
¹² Melting Temperature

انواع رنگ‌های مورد استفاده در HRM

انواع مختلفی از رنگ‌های متصل‌شونده به dsDNA¹³ وجود دارد، از جمله SYBR Green PLUS، LC Green، Eva Green، SYTO9 و ResoLight. افزودن این رنگ‌ها دمای ذوب DNA را 1-3 درجه سانتیگراد افزایش می‌دهد و ممکن است نیاز به تنظیم پارامترهای چرخه‌ای داشته باشد (Scholarly Community Encyclopedia., 2023).

SYBR Green رایج‌ترین رنگ غیر اشباع dsDNA intercalating است. به طور کلی برای اکثر برنامه‌های HRM نامناسب است زیرا نشان داده شده‌است که PCR را در غلظت‌های بالا مهار می‌کند و فرض شده‌است که از مناطق ذوب شده به آمپلیکون dsDNA بازتوزیع می‌شود، همانطور که در (شکل 3 الف) توضیح داده شده‌است.

برای غلبه بر این محدودیت، دسته جدیدی از رنگ‌های dsDNA با نام‌های اشباع‌کننده یا رنگ‌های «رهاسازی بر اساس تقاضا»¹⁴ که DNA پلیمرها را مهار نمی‌کنند یا T_m محصول را تغییر نمی‌دهند، ساخته شده‌اند. بر خلاف SYBR Green، رنگ‌های اشباع مانند SYTO9 یا DNA LCGreen پلیمرها را در غلظت‌های نسبتاً بالا مهار نمی‌کنند. بنابراین، همانطور که در (شکل 3 ب) نشان داده شده‌است، بررسی دقیق رفتار ذوب برای تجزیه و تحلیل HRM امکان‌پذیر است. رنگ‌های «آزادشونده بر اساس تقاضا»، به عنوان مثال، EvaGreen، می‌توانند در غلظت‌های غیر اشباع استفاده شوند. به دلیل مکانیسم جدید انتشار فلورسانس، سیگنال فلورسنت هنگامی که رنگ در محلول آزاد باشد خاموش می‌شود. در عوض، رنگ هنگام اتصال به DNA دورشته سیگنال فلورسنت بالایی از خود ساطع می‌کند (شکل 3 ج). هیچ مهار PCR وجود ندارد، در حالی که رنگ منحصر به فرد آنالیز HRM بسیار حساس را ارائه می‌دهد (Sun et al., 2016). رنگ EvaGreen® یک رنگ اسید نوکلئیک فلورسنت سبز، غیر جهش‌زا و غیر سیتوتوکسیک بوده و به غشای سلولی کاملاً نفوذناپذیر است (Scholarly Community Encyclopedia., 2023).



¹³ Intercalating

¹⁴ Release-on-demand

شکل 3) رنگ‌های غیراشباع، اشباع و "رهاسازی بر اساس تقاضا" dsDNA رنگ‌های درونی. (الف) در غلظت‌های غیر اشباع، رنگ به سرعت به مناطقی که دو رشته‌ای باقی می‌مانند، دوباره متصل می‌شود، در نتیجه هیچ افتی در فلورسانس وجود ندارد. (ب و ج) رنگ‌های اشباع و "رهاسازی بر اساس تقاضا" از نواحی ذوب شده DNA تک رشته‌ای به dsDNA بازتوزیع نمی‌شوند و منجر به کاهش فلورسانس می‌شود. این تفاوت به رنگ‌هایی مانند SYT09 یا EvaGreen حساسیت بالایی را برای تجزیه و تحلیل HRM می‌دهد (Sun et al., 2016).

روش انجام Real time PCR برای تکنیک HRM

دستگاه‌های مختلفی برای انجام روش HRM وجود دارد که برخی نسبت به دیگری دارای مزایا و برتری بوده. باتوجه به منابع دستگاه Rotor-Gene 6000 در این زمینه بهترین عملکرد را داشته و به خوبی می‌تواند نمونه‌های هموزیگوت را از هم و از نمونه‌های هتروزیگوت تفکیک کند. اما با توجه به اینکه چه دستگاهی دردسترس بوده، روش کار نیز می‌تواند متفاوت باشد. در اینجا روش کار با دستگاه Real time PCR Light Cyclers 96 شرح داده می‌شود (پیل‌آقایی و همکاران، 1403). میزان مواد مورد نیاز برای تهیه یک واکنش در جدول 1 و برنامه پیشنهادی برای انجام PCR و HRM در جدول 2 آورده شده است.

جدول 1) مواد مورد نیاز برای تهیه یک واکنش برای انجام PCR و HRM

مقدار نهایی	مقادیر	مواد
X1	μ l4	5X EvaGreen HRM Master Mix
0.25 pmol	μ l0/5	(10 pmol) Forward primer
0.25 pmol	μ l0/5	(10 pmol) Reverse primer
-	μ l14	آب فاقد نوکلئاز
ng 30	μ l1	ng/ μ l 30DNA
-	μ l20	حجم کل

جدول 2) برنامه دما و زمانی برای انجام PCR و سپس HRM

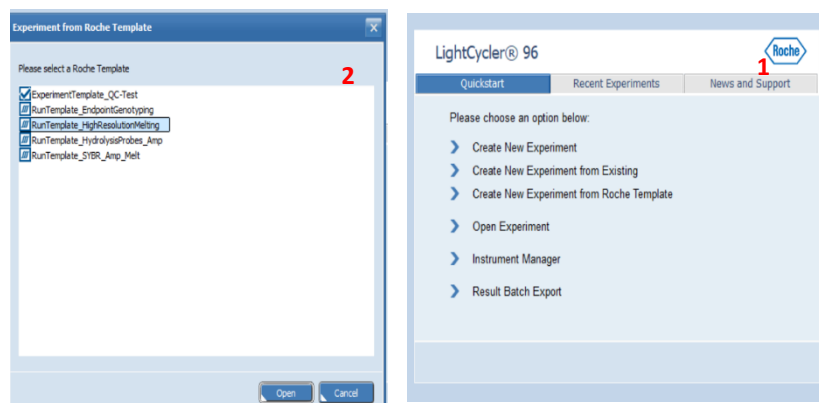
زمان	برنامه دمایی
12 دقیقه	95 °C

95 °C	15 ثانیه
(دمای آنیلینگ مناسب برای پرایمر منتخب)	20 ثانیه
72 °C	20 ثانیه
95 °C	60 ثانیه
40°C	60 ثانیه
65 °C	1 ثانیه
97 °C	1 ثانیه

پس از اتمام آزمایش، نتایج با استفاده از نرم افزار Roche diagnostics بررسی شده و با مقایسه منحنی‌های ذوب هر نمونه، تفاوت ژنوتیپ‌ها مشخص می‌شود.

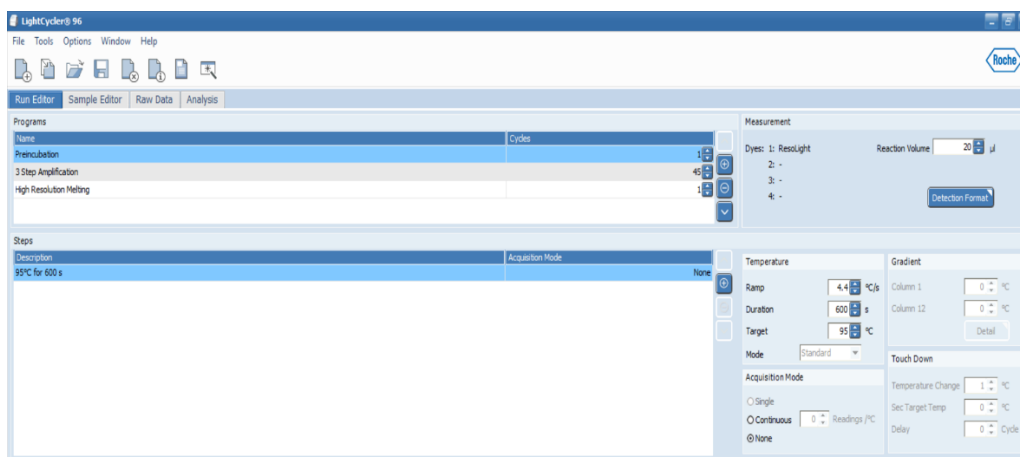
دستورالعمل اجرا

ابتدا برنامه مربوط به ریل تایم را باز کرده و روی گزینه Create new Experiment from Roche Template کلیک کرده و سپس Run Template-High Resolution Melting را انتخاب می‌کنیم (شکل 4).



شکل 4. انتخاب برنامه ذوب با وضوح بالا

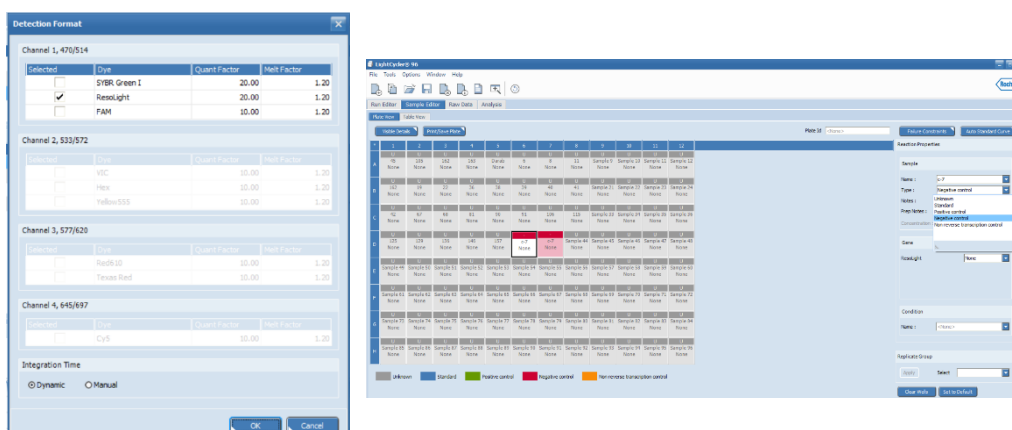
حال یک صفحه جدید باز شده که صفحه Run Editor می‌باشد. در این صفحه باید تنظیمات مربوط به تکثیر قطعه مورد نظر را پر کرد. برای وارد کردن دما و زمان برای مراحل مختلف تکثیر از جعبه سمت راست قسمت Temperature استفاده می‌کنیم. برای تغییر زمان از Duration و برای تعیین دما از Target استفاده می‌کنیم. برای قسمت High Resolution Melting اعداد مربوط به دستگاه را تغییر نمی‌دهیم (شکل 5).



شکل 5. تنظیم دمای مناسب برای تکثیر و دوب با وضوح بالا

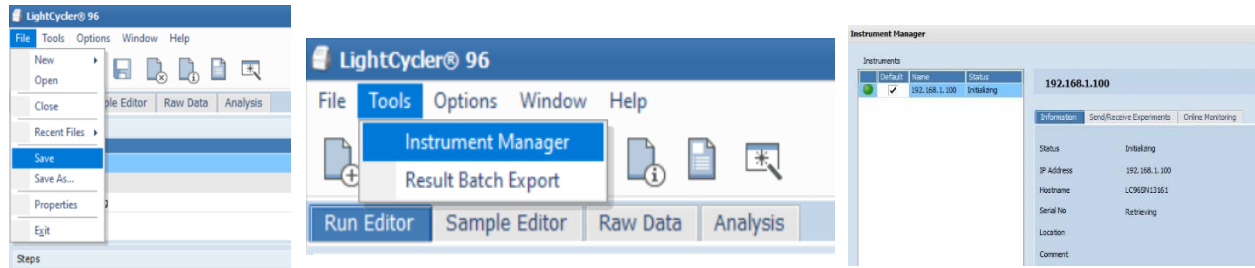
حال با توجه به رنگ مورد استفاده باید از قسمت Detection Format رنگ مورد نظر که در Real-Time PCR استفاده شده را انتخاب کنیم. البته اگر از رنگ اوا گرین استفاده شد باتوجه به اینکه این رنگ در دستگاه وجود ندارد باید گزینه Resolight استفاده شود. سپس باتوجه به حجم مواد مورد نظر میزان Reaction volume را که در بالا وجود دارد را تغییر می دهیم.

حالا وارد صفحه بعد یعنی Sample Editor می شویم. با توجه به تعداد و جایگاه مورد نظر نمونه ها را از جعبه سمت راست قسمت Name و type تعیین می کنیم. برای نمونه های کنترل منفی از گزینه Negative Control استفاده می کنیم (شکل 6).



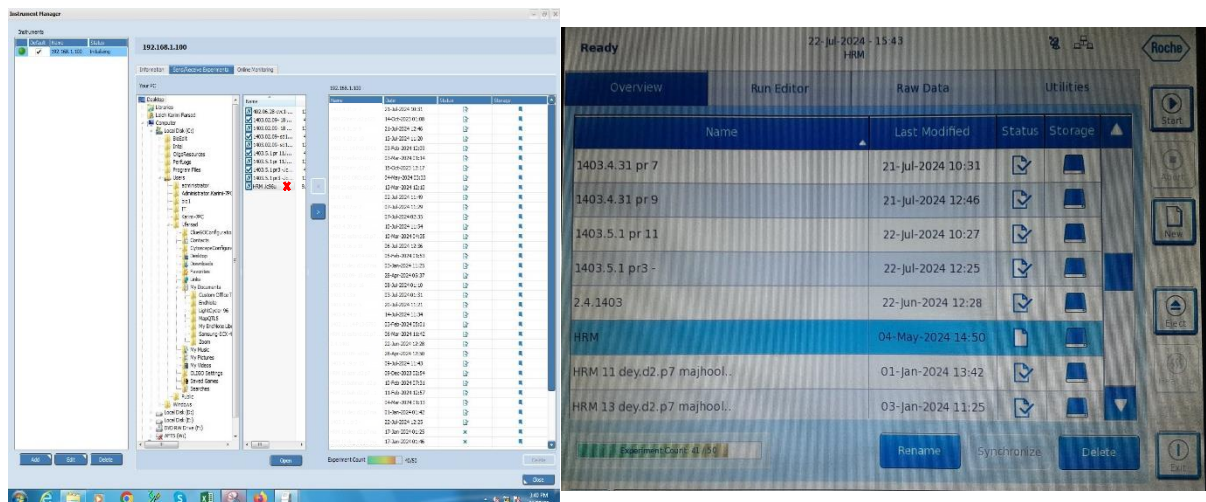
شکل 6. انتخاب رنگ مناسب و نام گذاری و تنظیم چاهک ها

در پایان از قسمت File گزینه Save را میزنیم. سپس باید برنامه ذخیره شده را به دستگاه ریل تایم منتقل کنیم. برای این کار باید از نوار بالا سمت چپ گزینه Tools و Instrument Manager را انتخاب کنیم و پس از سبز شدن چراغ گزینه Save/Resive Experiments را انتخاب می کنیم (شکل 7).



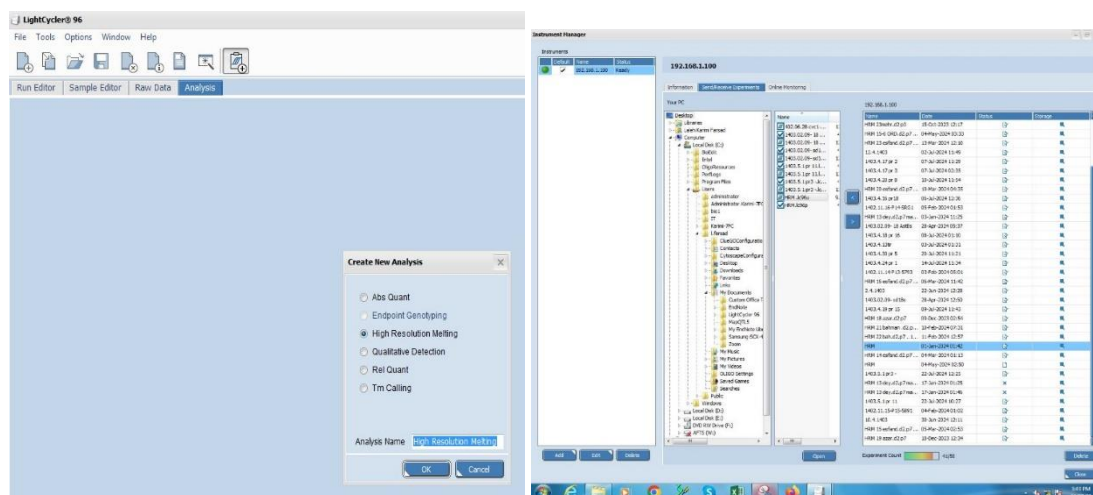
شکل 7. ذخیره اطلاعات در رایانه و انتقال به دستگاه ریل تایم

بعد برنامه خود را از جایی که ذخیره کرده بودیم انتخاب و با فلش آبی رنگ که در وسط صفحه وجود دارد به دستگاه ریل تایم منتقل می کنیم، سپس باید از صفحه Overview برنامه ای که به آن منتقل کرده بودیم را پیدا و انتخاب کنیم و بعد گزینه Start را از بالا سمت راست انتخاب تا برنامه شروع شود (شکل 8).



شکل 8. انتخاب برنامه از دستگاه و شروع برنامه PCR

پس از اتمام برنامه باید آن را از دستگاه به کامپیوتر منتقل کرد. برنامه ای که به کامپیوتر منتقل می شود دارای یک تیک آبی می باشد که می توان از آن متوجه شد که برنامه پایان یافته می باشد. پس از انتقال به کامپیوتر روی گزینه open کلیک کرده. سپس از روی برنامه ای که باز کرده بودیم گزینه Analysis و سپس Add Analysis را زده و High Resolution Melting را انتخاب کرده و سپس به بررسی و آنالیز نمونه ها می پردازیم (شکل 9).



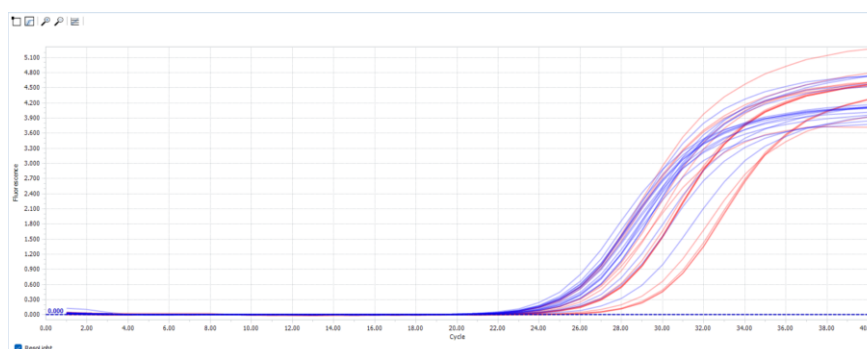
شکل 9. انتقال نتیجه اطلاعات به رایانه پس از اتمام PCR

آنالیز HRM

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

1. مرحله تکثیر (شکل 10) : به منظور تعیین صحت و مناسب بودن تکثیر ناحیه DNA هدف ، منحنی تکثیر مورد بررسی قرار می گیرد. این منحنی به صورت صعودی است. نمونه با استفاده از رنگ های فلورسنت متصل شونده به DNA تحت PCR قرار می گیرد. با پیشرفت PCR ، مقدار DNA تقویت شده افزایش می یابد و منجر به افزایش سیگنال فلورسانس می شود. یک منحنی سیگموئید شکل ایجاد می شود که فاز نمایی نشان دهنده تقویت موفقیت آمیز است. خط مبنا سطح فلورسانس اولیه را نشان می دهد و فلات نشان دهنده پایان واکنش است (Fisher et al., 2010).

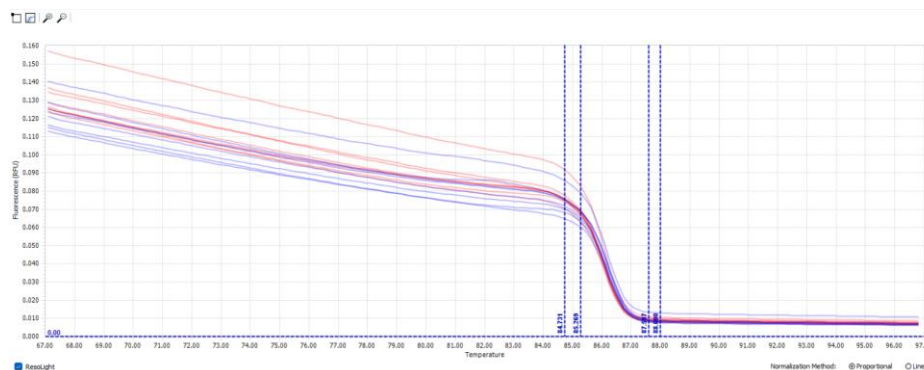
شایان ذکر است که برای آنالیز HRM نکات مهمی باید مورد توجه قرار گیرد ؛ به ویژه آنکه " بازدهی منحنی بالای ۴/۱ باشد ، به " مرحله تراز " قابل قبولی رسیده باشد و فاصله ۱۵Ct نمونه ها بیشتر از ۳ چرخه نباشد. اگر میزان Ct نمونه ها با هم متفاوت باشد بیانگر متفاوت بودن غلظت فرآورده های PCR است که همین امر موجب پیچیده شدن تفسیر خواهد شد (Introduction to High Resolution Melt Analysis Guide., 2023) .



¹⁵ Cycle threshold

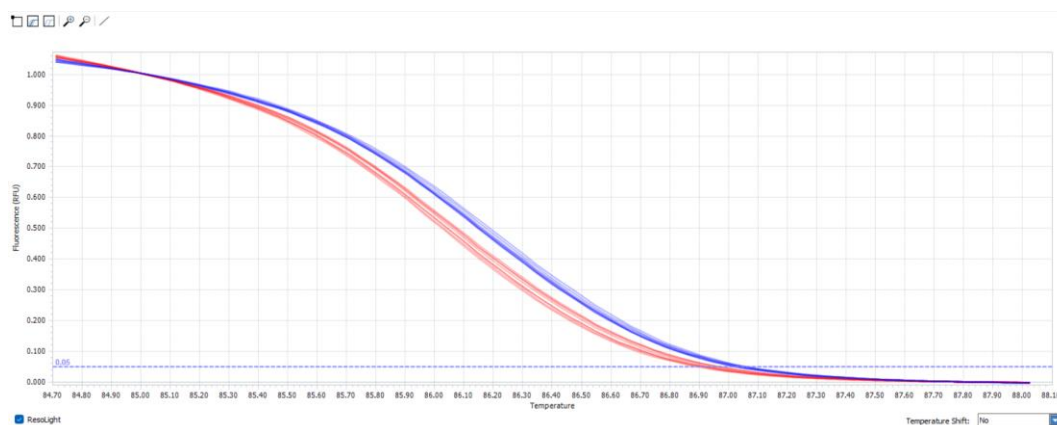
شکل 10. منحنی تکثیر نمونه‌های مورد آزمایش (پورداد و همکاران، 1403).

2. بررسی منحنی ذوب (شکل 11) : این بررسی روی منحنی مشتقی انجام می‌گیرد و هدف آن کسب اطمینان از اختصاصی بودن فرآورده‌های مورد نظر است. چنانچه فرآورده‌های غیر اختصاصی وجود داشته باشند، حضور منحنی‌های درهم رفته و آشفته را شاهد هستیم. منحنی مشتقی براساس منفی مشتق فلوئورسنس تقسیم بر مشتق دما (محور Y) به دما (محور X) رسم می‌شود.



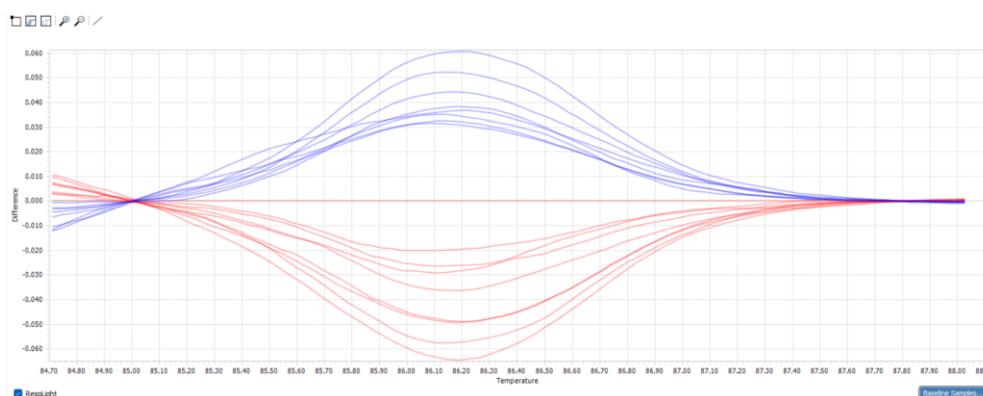
شکل 11. منحنی ذوب نمونه‌ها و تنظیم نقاط پیش‌ذوب و پس‌ذوب برای در برگرفتن ناحیه مورد نظر (پورداد و همکاران، 1403).

3. مرحله نرمال کردن منحنی ذوب (شکل 12) : در این مرحله از منحنی استاندارد (نه مشتقی) استفاده می‌شود. پس از تعیین محدوده نواحی " پیش ذوب " و " پس ذوب "، نرم افزار ناحیه پیش ذوب را به مقدار ۱۰۰ و ناحیه پس ذوب را به صفر می‌رساند و یک منحنی نرمال شده به دست می‌آید. ناحیه پیش ذوب ناحیه ای است که همه فرآورده‌ها حالت دورشته ای دارند و شدت فلوئورسنس حداکثر است و ناحیه پس از ذوب ناحیه ای است که همه فرآورده‌ها به حالت تک رشته درآمده و دیگر جذب فلورسنس وجود ندارد (Erali and Wittwer et al., 2010).



شکل 12. منحنی ذوب نرمال که از منحنی تکثیر حاصل شده (پورداد و همکاران، 1403).

4. منحنی تمایز (شکل 13): در این مرحله از یک منحنی استاندارد (برای نمونه ، منحنی مربوط به A/A استفاده می شود و سایر منحنی های به دست آمده با آن مقایسه می شود . به این صورت که نرم افزار ، منحنی مربوط به نمونه استاندارد را صفر در نظر می گیرد و فاصله منحنی مربوط به نمونه های مجهول را نسبت به آن تعیین می کند. نمودار حاصله به شکل زنگوله ای بوده و نسبت تغییرات فلورسنس به تغییرات دما را نشان می دهد. ژنوتیپ سنجی ها اکنون متمایزتر هستند، اما تفاوت بین منحنی های ذوب اغلب در برخی موارد کوچک است (Erali et al., 2008).



شکل 13. منحنی تمایز نمونه های مورد نظر با در نظر گرفتن نمونه مرجع که بقیه نمونه ها نسبت به آن سنجیده می شوند (پورداد و همکاران، 1403).

5. خوانش اتوماتیک: در این مرحله دستگاه به صورت خودکار ژنوتیپ نمونه های مجهول را تعیین می نماید و اطلاعات مربوط به ژنوتیپ استاندارد را با ضریب تطابق ۹۰ درصد با نمونه مجهول مرتبط می سازد. اگر میزان CI ۱۶ کمتر از ۹۰ درصد باشد، آن نمونه را به عنوان واریانت معرفی می کند (Noori-Daloii & Faraji, 2016).

جمع بندی

در بخش کشاورزی و اصلاح نباتات، شناسایی سریع و دقیق تنوع های ژنتیکی درون گونه های گیاهی برای توسعه ارقام مقاوم به بیماری، دارای عملکرد بالا یا صفات کیفی مطلوب، از اهمیت حیاتی برخوردار است. چندشکلی های تک نوکلئوتیدی (SNPs) و سایر تغییرات کوچک در ژنوم گیاهان، اطلاعات ارزشمندی در مورد ژن های مسئول صفات اقتصادی فراهم می کنند. روش ذوب با وضوح بالا (HRM) به عنوان یک تکنیک حساس، کارآمد و سریع، بستری مناسب برای ارزیابی این تنوع های ژنتیکی در مقیاس های بزرگ فراهم می آورد.

HRM یک ابزار قدرتمند پس از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) است که تفاوت ها در توالی DNA را بر اساس پایداری حرارتی محصولات تکثیر شده، تشخیص می دهد. در این روش، پس از تکثیر ناحیه مورد نظر ژنوم گیاهی، مولکول های دو رشته ای DNA با استفاده از رنگ های حساس به DNA (مانند EvaGreen) نشانه گذاری می شوند. با افزایش تدریجی دمای

¹⁶ Confidence interval

نمونه در دستگاه Real-time PCR، DNA شروع به ذوب شدن (دنا توره شدن) و تبدیل شدن به تک رشته می‌کند. این فرآیند ذوب، منجر به کاهش ناگهانی فلورسانس می‌شود. کوچک‌ترین تفاوت در توالی DNA (مانند یک SNP)، باعث ایجاد یک تغییر ظریف در ساختار ماریچ دو رشته‌ای و در نتیجه تغییر در دمای ذوب یا شکل منحنی ذوب می‌گردد. توانایی HRM در ثبت این تغییرات جزئی، امکان تفکیک دقیق گونه‌ها، واریته‌ها یا ژنوتیپ‌های مختلف گیاهی را فراهم می‌کند. در نتیجه، روش ذوب با وضوح بالا (HRM) یک ابزار تشخیصی و غربالگری سریع، ارزان و قدرتمند است که می‌تواند تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی در ژنوم گیاهی را با دقت بالا تفکیک کند. این تکنیک، با ارائه ژنوتیپ‌سنجی سریع و ایمن در یک محیط لوله بسته، فرآیند اصلاح نباتات و مدیریت تنوع ژنتیکی در محصولات کشاورزی را به طور قابل توجهی تسریع می‌بخشد.

منابع

سیدسعید پورداد، زهرا سادات شبر، مهدی جمشید مقدم، حسین هداوند میرزائی، دادیار محمدی شکوه، زهرا نصراللهی خشکبار، لیلا پورهنک، راحله میردار منصوری، مهدی پیل آقایی (1403). ارزیابی زراعی، بیوشیمیایی و مولکولی ژرم‌پلاسم گلرنگ در شرایط دیم برای گزینش ژنوتیپ‌های بی‌خار با میزان روغن دانه و محتوی اسید اولئیک بالا، گزارش نهایی پروژه مصوب سازمان تات، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی به شماره : 000889-012-05-05-7، 46-1، 46-1.

مهدی پیل آقایی، زهرا سادات شبر و سیدسعید پورداد (1403). بهینه‌سازی روش ذوب با وضوح بالا: مطالعه موردی روی ژن مسئول تبدیل اولئیک اسید به لینولئیک اسید در گلرنگ. مجله ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، 1(3)، 1-18.

A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis. Gene Quantification. Available online
: <https://www.google.com/search?q=%0D%0Ahttp%3A%2F%2Fwww.gene-quantification.com%2Fab-hrm-guide.pdf>. (accessed on 18 August 2024).

Batrinou, A., Strati, I. F., Houhoula, D., Tsaknis, J., & Sinanoglou, V. J. (2020). Authentication of olive oil based on DNA analysis. *Grasas y Aceites*, 71(3), e366–e366.

Cui, G., Ding, H., Xu, Y., Li, B., & Wang, D. W. (2013). Applications of the method of high resolution melting analysis for diagnosis of Leber's disease and the three primary mutation spectrum of LHON in the Han Chinese population. *Gene*, 512(1), 108-112.

De Juan, I., Esteban, E., Palanca, S., Barragán, E., & Bolufer, P. (2009). High-resolution melting analysis for rapid screening of BRCA1 and BRCA2 Spanish mutations. *Breast cancer research and treatment*, 115, 405-414.

Deschamps, S., Llaca, V., & May, G. D. (2012). Genotyping-by-sequencing in plants. *Biology*, 1(3), 460-483.

- Er, T. K., & Chang, J. G. (2012). High-resolution melting: applications in genetic disorders. *Clinica Chimica Acta*, 414, 197-201.
- Erali, M., & Wittwer, C. T. (2010). High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods*, 50(4), 250-261.
- Erali, M., Voelkerding, K. V., & Wittwer, C. T. (2008). High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and molecular pathology*, 85(1), 50-58.
- Fisher, C., Meng, R., Bizouarn, F., & Scott, R. (2010). High resolution melt parameter considerations for optimal data resolution. *Bio-Rad Laboratories: Hercules, CA, USA*.
- Jian, Y., & Li, M. (2021). A narrative review of single-nucleotide polymorphism detection methods and their application in studies of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bio-X Research*, 4(01), 1-9.
- Kwok, P.-Y. (2001). Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2(1), 235–258.
- Noori-Daloii, M. R., & Faraji, K. (2016). High resolution melt analysis (HRM) and its strategic applications especially in molecular genetics. *The Horizon of Medical Sciences*, 22(1), 77–88.
- Perini, M., Batisti Biffignandi, G., Di Carlo, D., Pasala, A. R., Piazza, A., Panelli, S., ... & Comandatore, F. (2021). MeltingPlot, a user-friendly online tool for epidemiological investigation using High Resolution Melting data. *BMC bioinformatics*, 22, 1-8.
- QIAGEN. Principles of High Resolution Melting (HRM) technology [Cited 2024, 18 August]. Available from: <https://www.qiagen.com/ir/resources/technologies/hrm/principle%20of%20hrm%20technology/>
- Scholarly Community Encyclopedia. Available online: <https://encyclopedia.pub/> (accessed on 21 January 2023).
- Semagn, K., Bjørnstad, Å., & Ndjiondjop, M. N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African journal of biotechnology*, 5(25).

Sun, W., Li, J. jian, Xiong, C., Zhao, B., & Chen, S. lin. (2016). The potential power of bar-HRM technology in herbal medicine identification. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, Issue MAR2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00367>

Thermo Fisher Scientific. A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis. www.appliedbiosystems.com (accessed on 18 January 2023).

Vossen, R. H., Aten, E., Roos, A., & den Dunnen, J. T. (2009). High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More than just sequence variant screening. *Human mutation*, 30(6), 860-866.

Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., & Pryor, R. J. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical chemistry*, 49(6), 853-860.

Yuan, H.-Y., Chiou, J.-J., Tseng, W.-H., Liu, C.-H., Liu, C.-K., Lin, Y.-J., . . . Hsu, C.-N. (2006). FASTSNP: an always up-to-date and extendable service for SNP function analysis and prioritization. *Nucleic acids research*, 34(suppl_2), W635-W641.

Yumpu. Introduction to High Resolution Melt Analysis Guide - Kapa Biosystems. Available online: <https://www.yumpu.com/en/document/view/11708647/introduction-to-high-resolution-melt-analysis-guide-kapa-biosystems> (accessed on 3 February 2023).