



Optimization of high-resolution melting method: a case study on the gene responsible for converting oleic acid to linoleic acid in safflower

Mahdi Pil-Aghaee 

PhD Student, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Email address: m.pilaghaee@modares.ac.ir

Zahra-Sadat Shobbar 

*Corresponding Author: Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. Email address: shobbar@abrii.ac.ir

Seyed Saeed Pouredad 

Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. Email address: s.pouredad@abrii.ac.ir

Abstract

Objective

High-resolution melting (HRM) analysis is an affordable, specific, and rapid tool for analyzing various sequences, screening, and genotyping. This method detects small nucleotide changes based on the melting properties of double-stranded DNA. This study aimed to optimize the HRM assay for safflower genotyping concerning oleic acid content. The FAD2-1 gene introduces a double bond into the oleic acid substrate, converting it into linoleic acid. In high-oleic acid varieties, a single nucleotide polymorphism (SNP) in this gene has been reported to introduce a premature stop codon, leading to enzyme inactivation. Therefore, accurately detecting genotypes carrying this SNP in the FAD2-1 gene could be a reliable method for identifying safflower genotypes with high oleic acid content.

Materials and Methods

HRM analysis was performed using two fluorescent dyes (EvaGreen and SYBR Green), three different concentrations of template genomic DNA, and two pairs of primers (HRM1 and HRM2, producing amplicons of 117 bp and 265 bp, respectively) on eight safflower genotypes. The aim was to determine the optimal conditions for distinguishing genotypes based on the presence or absence of the target SNP in the melting curves.

Results

Between the two primer sets, HRM1, which amplified a smaller 117 bp fragment, provided better differentiation among genotypes than HRM2, which amplified a larger 265 bp fragment. In comparing fluorescent dyes, EvaGreen enabled more apparent discrimination of genotypes in a single reaction than SYBR Green. Furthermore, genomic DNA concentration did not significantly affect the melting curve distinction within the tested range.

Conclusion

This study confirms and extends previous findings, demonstrating that smaller amplicons yield better melting curve distinction. EvaGreen fluorescent dye is also a suitable alternative to SYBR Green, providing improved genotyping efficiency.

Keywords: EvaGreen, Genotyping, Melting curve, Real-Time PCR, Single nucleotide polymorphism.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Pil-Aghae M, Shobbar ZS, Pourdad SS (2024) Optimization of High-Resolution Melting (HRM) Method: A Case Study on the Gene Responsible for Converting Oleic Acid to Linoleic Acid in Safflower. *Journal of Genetics and Plant Breeding* 1 (1), 1-18.

Journal of Genetics and Plant Breeding 1 (1), 1-18.

DOI: 10.22103/gpb.2024.4849

Received: June 10, 2024.

Received in revised form: August 16, 2024.

Accepted: August 17, 2024.

Published online: September 28, 2024.

Publisher: Research and Technology Institute of Plant Production,

Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman and Iranian Genetics Society.



© the authors


بهبینه‌سازی روش ذوب با وضوح بالا:

مطالعه موردی روی ژن مسئول تبدیل اولئیک اسید به لینولئیک اسید در گلرنگ

مهدی پیل‌آقایی 


دانشجوی دکتری، گروه نانو بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه:

m.pilaghaee@modares.ac.ir

زهره سادات شبر 

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: shobbar@abrii.ac.ir

سیدسعید پورداد 

استاد، گروه زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

رایانامه: s.pourdada@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۵/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۷

چکیده

هدف: روش ذوب با وضوح بالا (HRM) یک ابزار مقرون به صرفه، اختصاصی و سریع است که برای تجزیه و تحلیل انواع توالی، غربالگری و ژنوتیپ‌سنجی کاربرد دارد. این روش بر اساس خواص ذوب DNA دو رشته‌ای، تغییرات نوکلئوتیدی کوچک را تشخیص می‌دهد. هدف پژوهش حاضر، بهبود بهینه‌سازی آزمون HRM برای ژنوتیپ‌سنجی گلرنگ از نظر محتوای اولئیک اسید است. نقش ژن *FAD2-1*، اضافه کردن یک پیوند دوگانه در سوبسترای اولئیک اسید و تبدیل آن به لینولئیک اسید است. در رقم‌های با محتوای بالای اولئیک اسید، وجود یک SNP در این ژن گزارش شده که موجب به‌وجود آمدن کدون خاتمه زودرس و از کار افتادن آنزیم حاصل می‌شود. بنابراین تشخیص صحیح و سریع ژنوتیپ‌های دارای SNP مذکور در ژن *FAD2-1* می‌تواند راه‌کار مناسبی برای تشخیص ژنوتیپ‌های گلرنگ با محتوای بالای اولئیک اسید باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، روش HRM با استفاده از دو رنگ فلورسنت اواگرین و سایبرگرین، سه غلظت مختلف DNA ژنومی الگو و دو جفت آغازگر مختلف به نام HRM1 و HRM2 (که قطعه حاصل از تکثیر با استفاده از آن‌ها دربردارنده SNP مذکور بوده و به ترتیب شامل ۱۱۷ و ۲۶۵ جفت باز می‌باشد) روی هشت ژنوتیپ گلرنگ انجام شد تا شرایط مناسب برای تفکیک منحنی ذوب برای ژنوتیپ‌های دارای SNP و بدون آن مشخص شود.

نتایج: در مقایسه آغازگرهای HRM1 و HRM2، آغازگر HRM1 به دلیل تولید قطعه کوچک ۱۱۷ جفت بازی، تفکیک را بهتر از آغازگر HRM2 که قطعه بزرگتر ۲۶۵ جفت بازی تولید می‌کرد، انجام داد و در مقایسه رنگ اواگرین و سایبرگرین، اواگرین توانست در یک واکنش PCR، ژنوتیپ‌های بیشتری را به درستی تفکیک کند. همچنین، غلظت DNA در محدوده مورد بررسی تأثیر چندانی در تفکیک منحنی‌های ذوب نداشت.

نتیجه‌گیری: این مقاله یافته‌های پیشین را تایید و گسترش می‌دهد که تفکیک منحنی‌های ذوب برای قطعات تکثیرشده کوچک‌تر بهتر صورت می‌گیرد و رنگ اواگرین جایگزین مناسبی برای رنگ سایبرگرین بوده و با استفاده از رنگ اواگرین می‌توان به کارایی بهتری دست یافت.

کلیدواژه‌ها: اواگرین، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، منحنی ذوب، ریل تایم پی‌سی‌آر، ژنوتیپ‌سنجی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: پیل آقایی مهدی، شبر زهرا سادات، پورداد سیدسعید (۱۴۰۳) بهینه‌سازی روش ذوب با وضوح بالا: مطالعه موردی روی ژن مسئول تبدیل اولئیک اسید به لینولئیک اسید در گلرنگ. *مجله ژنتیک و به‌نژادی گیاهی*، ۱(۱)، ۱-۱۸.

Publisher: Research and Technology Institute of Plant Production,
Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman and
Iranian Genetics Society



© the authors

مقدمه

تجزیه و تحلیل ذوب با وضوح بالا (HRM) یک روش چندکاره مبتنی بر DNA است که از زمان معرفی آن در سال ۲۰۰۲ در زمینه‌های مختلف استفاده شده است (Tamburro & Ripabelli 2017). این تکنیک از رنگ‌های فلورسنت متصل شونده به DNA و ابزارهای تخصصی برای تجزیه و تحلیل رفتار ذوب آمپلیکون‌های DNA استفاده می‌کند و امکان شناسایی تغییرات توالی را بدون نیاز به پردازش پس از PCR فراهم می‌کند (Montgomery et al. 2010; Wittwer et al. 2003). تکنیک HRM در زمینه‌های مختلف پژوهش‌های گیاهی کاربردهای فراوانی دارد که از جمله می‌توان به بهبود ژنتیکی محصولات کشاورزی، آزمون کیفیت و ایمنی مواد غذایی و احراز هویت گیاهی اشاره کرد (Grazina et al. 2022; Simko et al. 2016). این روش با موفقیت در کاربردهای مختلف، از جمله اسکن ژن، ژنوتیپ‌سنجی، و تجزیه و تحلیل متیلاسیون استفاده شده است.

(Montgomery et al. 2010). HRM را می‌توان بدون نیاز به کاوشگرهای نشاندار استفاده کرد (Erali & Wittwer 2010). این روش حساسیت بالایی را در تشخیص انواع توالی هتروزایگوت نشان داده است و مطالعات در این زمینه نرخ تشخیص نزدیک به ۱۰۰ درصد را گزارش می‌دهد (Vossen et al. 2009). سرعت زیاد، هزینه کم و بازده بالا، این روش را برای تحقیقات و تشخیص‌های رایج مناسب ساخته است (Tamburro & Ripabelli 2017). با وجود برخی محدودیت‌ها، سادگی، دقت و تطبیق‌پذیری HRM آن را به ابزاری ارزشمند در مطالعات ژنتیکی و ژنومی در رشته‌های مختلف تبدیل کرده است (Simko 2016; Tamburro & Ripabelli 2017). در مقایسه با تکنیک‌های سنتی مانند توالی‌یابی مستقیم و ژل الکتروفورز با شیب واسرشتی، HRM به‌طور قابل‌توجهی زمان‌های چرخه را کاهش داده و هزینه‌های کمتری دارد (De Leeneer et al. 2008). با این حال، عواملی مانند کیفیت نمونه و طرح آزمایشی می‌توانند بر موفقیت تحلیل HRM تأثیر بگذارند و اهمیت بهینه‌سازی مناسب را برجسته می‌کنند (Taylor 2009; Bruzzone et al. 2013).

با استفاده از HRM می‌توان چندشکلی‌های مختلف از جمله چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) و درج‌ها/حذف‌ها را بدون آغازگرها یا پروب‌های برجسب‌دار شناسایی کرد (Liew et al. 2004). این روش شامل استخراج DNA، تکثیر PCR همراه با رنگ‌های فلورسنت و تجزیه و تحلیل منحنی ذوب برای شناسایی تغییرات کوچک نوکلئوتیدی است (Grazina et al. 2014; Knopkiewicz et al. 2021). HRM به‌ویژه برای تشخیص SNP و ژنوتیپ‌سنجی در گیاهان، مطالعات نقشه‌برداری ژنوم و گزینش مبتنی بر نشانگر در برنامه‌های به‌نژادی ارزشمند است (Chagné et al. 2015). HRM را می‌توان برای ایجاد نشانگرهای قابل‌اعتماد برای تمایز بین آل‌های هموزیگوت حاوی SNP با راهبردهای بهینه‌سازی از جمله جایگزینی نزدیکترین نوکلئوتید مجاور و کاهش اندازه قطعه PCR استفاده کرد (Yamagata et al. 2018). تجزیه و تحلیل HRM به‌ویژه در شناسایی هتروزایگوت‌ها به‌دلیل تشکیل هترو دوپلکس‌ها، که شکل‌های منحنی ذوب را تغییر می‌دهند، مؤثر است (Wittwer et al. 2003; Liew et al. 2004). عوامل متعددی می‌توانند بر عملکرد HRM تأثیر بگذارند، از جمله کیفیت منبع DNA، تکرارپذیری روش جداسازی، طراحی آغازگر، طول قطعه تکثیر شده، آماده‌سازی نمونه و خطای پیمت کردن (جدول ۱). بررسی دقیق این عوامل برای ژنوتیپ‌سنجی موفقیت‌آمیز HRM، به‌ویژه در تنظیمات با توان عملیاتی بالا، حیاتی است (Słomka et al. 2017). این تکنیک برای استفاده با رنگ‌های مختلف، مانند سایبرگرین و اوآگرین سازگار شده است. سایبرگرین یک رنگ فلورسنت است که به‌طور خاص به DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود (Konschak & Tinhofer 2011; Yang et al. 2016). سایبرگرین یک سیگنال فلورسنت بسیار قوی از خود نشان می‌دهد، اما نشان داده شده است که واکنش PCR را مهار می‌کند و دارای محدوده دینامیکی ضعیف و تکرارپذیری کمتری نسبت به سایر رنگ‌های شیمیایی تشخیص است (Buh Gašparič et al. 2010; Gudnason et al. 2007). تجزیه و تحلیل منحنی ذوب با استفاده از سایبرگرین به‌دلیل تأثیر رنگ بر دمای ذوب و با توزیع مجدد رنگ که در طول ذوب رخ می‌دهد، پیچیده است (Giglio et al. 2003) و به این دلیل سایبرگرین باید در غلظت‌های غیراشباع کم برای جلوگیری از مهار واکنش استفاده شود (Wittwer et al. 2003).

اواگرین یکی دیگر از رنگ‌های DNA است که نسبت به سایبرگرین مهار کمتری نسبت به PCR دارد و به‌عنوان جایگزین به بازار عرضه می‌شود (Mao et al. 2007; Sang & Ren 2006). اطلاعات ساختاری دقیق به‌طور کلی برای رنگ‌های اختصاصی در دسترس نیست، که پیش‌بینی رفتار آن‌ها را در ریل تایم PCR دشوار می‌کند (Gudnason et al. 2007). انتخاب ابزار و رنگ تا حد زیادی بر وضوح و دقت تجزیه و تحلیل ذوب DNA برای ژنوتیپ‌سنجی و اسکن جهش تأثیر می‌گذارد. ابزارهای با وضوح بالا که به‌طور خاص برای تجزیه و تحلیل ذوب طراحی شده‌اند، همراه با رنگ‌های اشباع‌کننده مانند اواگرین، عملکرد برتر را در تشخیص هتروزیگوت‌ها و ژنوتیپ‌سنجی پلی‌مورفیسیم‌های تک نوکلئوتیدی ارائه می‌دهند (Herrmann et al. 2006).

گلرنگ (*Carthamus tinctorium* L.) از گیاهان دانه روغنی بومی ایران محسوب می‌شود و تنوع ژنتیکی بالایی در میان ژنوتیپ‌های آن از نظر اسید چرب وجود دارد (Golkar et al. 2011). اکثر گونه‌های مود آزمایش تا به امروز دارای درصد بالای لینولئیک اسید هستند و وجود اولئیک اسید بالا در روغن‌ها به‌دلیل پایداری اکسیداتیو و تحمل به درجه حرارت بالا باعث کاربرد در مصارف صنعتی و غذایی می‌شود (Shafiei-Koij et al. 2020). ژن FAD2-1 یکی از اعضای خانواده ژنی FAD است که وظیفه‌ی آن اضافه کردن یک پیوند دوگانه در سوبسترای اولئیک اسید و تبدیل آن به لینولئیک اسید است (Kadirvel et al. 2017; Dar et al. 2020). در رقم‌های با محتوای بالای اولئیک اسید، وجود یک SNP در این ژن موجب به‌وجود آمدن کدون خاتمه زودرس و از کار افتادن آنزیم موردنظر می‌شود (Guan et al. 2012). در این مطالعه، با استفاده از روش HRM به بررسی SNP موجود در ناحیه کدکننده ژن FAD2-1 گلرنگ پرداخته شد و پارامترهای مختلف مانند تأثیر رنگ اواگرین و سایبرگرین، میزان غلظت DNA و طول آمپلیکون بر منحنی ذوب و تفکیک ژنوتیپ‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد هشت ژنوتیپ گلرنگ (سه ژنوتیپ ۱۰۲، ۱۶۲ و ۱۶۳ دارای یک SNP در ناحیه کدکننده ژن FAD2-1 و پنج ژنوتیپ گل‌دشت، امید، فرامان، ۴۵ و ۱۰۵ نرمال (بدون SNP) کشت شده و استخراج DNA با استفاده از روش CTAB تغییر یافته (Doyle and Doyle 1987) روی نمونه‌های برگ‌ی و سپس تست آغازگرها روی ژنوتیپ‌های مورد نظر انجام شد. در مرحله اول، غلظت بهینه برای DNA الگو مورد بررسی قرار گرفت و ریل تایم PCR با غلظت‌های ۱۰، ۳۰ و ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر (مطابق مواد مذکور در جدول ۴ یک میکرولیتر از DNA الگو با غلظت‌های مذکور در ۱۵ میکرولیتر محلول واکنش مورد استفاده قرار گرفت) برای دو ژنوتیپ فرامان و ۱۶۲ در دستگاه Real time PCR Light Cycler 96 System انجام شد (جدول ۲) و پس از انجام آزمون HRM منحنی‌های ذوب مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله دوم برای تفکیک اختصاصی SNP مورد نظر از دو آغازگر HRM1 و HRM2 که بر اساس توالی ناحیه آگزون ژن FAD2-1 توسط نرم‌افزار Oligo7 طراحی شده‌بود استفاده شد که به‌ترتیب قطعه‌ای به‌طول ۱۱۷ و ۲۶۷ جفت باز تولید می‌کردند.

جدول ۱. راهنمای عملی برای کاربر در روش HRM (Słomka et al. 2017)

Table 1. A practical guide for users of the HRM method (Słomka et al. 2017)

راه حل Solutions	عیب‌یابی Troubleshooting	موضوع Issue
<ul style="list-style-type: none"> استخراج DNA با استفاده از یک روش استاندارد مناسب برای همه نمونه‌ها Using a standard DNA extraction method for all samples ذخیره سازی مناسب نمونه‌ها Proper storage of samples کمیت سنجی استاندارد و رقیق‌سازی یکسان نمونه‌های DNA Standard quantification and uniform dilution of DNA samples تجزیه و تحلیل همزمان نمونه‌ها با روش جداسازی یکسان، خوشه‌بندی مناسب و صریح نمونه‌ها را تضمین می‌کند Parallel analysis of samples with the same isolation method ensures appropriate and explicit clustering of samples 	<p>روش‌های مختلف جداسازی و ترکیب نمونه، تجزیه و تحلیل موازی را دشوار می‌کند</p> <p>Different isolation methods and sample composition make parallel analysis difficult</p>	آماده سازی DNA preparation
<ul style="list-style-type: none"> قوانین استاندارد طراحی آغازگرها (دمای ذوب مشابه برای همه آغازگرها، به طور بهینه حدود 60 درجه سانتیگراد؛ از ساختارهای ثانویه مانند سنجاق سر، همودایمرها یا هتروداایمرها اجتناب شود) Standard primer design rules (same melting temperature for all primers, such as around 60°C; avoid secondary structures such as hairpins, homodimers or heterodimers) برای ژنوتیپ‌سنجی دقیق، آغازگرها باید تا حد امکان نزدیک به SNP طراحی شوند For accurate genotyping, primers should be designed as close to the SNP as possible کاهش اندازه آمپلیکون معمولاً خوشه بندی را بهبود می‌بخشد (80-100 جفت باز برای ژنوتیپ‌سنجی و 150-250 جفت باز برای اسکن ژن توصیه می‌شود (از چندین حوزه ذوب در یک آمپلیکون اجتناب شود)) Reducing amplicon size usually improves clustering (80-100 bp is recommended for genotyping and 150-250 bp for gene scanning (avoid multiple melting domains in one amplicon)) آزمون واکنش با آغازگرهای طراحی شده: بهینه‌سازی PCR با گرادیان دمای اتصال توصیه می‌شود Reaction test with designed primers: PCR optimization with annealing temperature gradient is recommended نتیجه حاصل از الکتروفورز محصول PCR، اختصاصی بودن آغازگر، اندازه مورد انتظار آمپلیکون و عدم وجود محصولات خارجی را نشان می‌دهد The result of PCR product electrophoresis shows the specificity of the primer, the expected amplicon size, and the absence of foreign products در صورت لزوم، غلظت یون منیزیم Mg^{2+} تنظیم شود If necessary, adjust the concentration of magnesium ion Mg^{2+} در صورت امکان، تمایز منحنی‌های ذوب را برای نمونه‌های منتخب با ژنوتیپ‌های شناخته شده آزمایش کنید If possible, test the differentiation of melting curves for selected samples with known genotypes 	<p>وضوح ضعیف منحنی ذوب و بهینه‌سازی PCR</p> <p>Poor melting curve resolution and PCR optimization</p>	طراحی آغازگر Primer design

ادامه جدول ۱. راهنمای عملی برای کاربر در روش HRM

Continuation of Table 1. A practical guide for users of the HRM method

راه حل Solutions	عیب‌یابی Troubleshooting	موضوع Issue
<ul style="list-style-type: none"> • تایید ذوب برای نمونه‌های توالی یابی شده • Melting verification for sequenced samples • آغازگرهای طراحی مجدد یا جفت آغازگر اضافی که در کنار موقعیت SNP قرار دارند (واقع در دنباله مکمل آغازگر) باید در تنظیمات آزمایشی گنجانده شوند • Redesigned primers or additional primer pairs flanking the SNP position (located in the primer complementary sequence) should be included in experimental setup 	<ul style="list-style-type: none"> • تغییرات غیرمنتظره در توالی آغازگر و خوشه بندی نادرست • Unexpected variation within primer sequence and incorrect clustering 	<ul style="list-style-type: none"> • طراحی آغازگر Primer design
<ul style="list-style-type: none"> • DNA پلیمرازهای Hot-Start با حذف محصولات غیر اختصاصی، ویژگی واکنش را بهبود می‌بخشد • Hot-Start DNA polymerases improve reaction specificity by eliminating nonspecific products • رنگ‌های متصل شونده به DNA دو رشته ای حساس به نور هستند و باید از نور محافظت شوند • dsDNA binding dyes are photosensitive and should be protected from light • اطمینان حاصل کنید که تمام اجزای واکنش به اندازه کافی مخلوط شده و مخلوط حاصل پیش از توزیع سانتریفیوژ شده‌است • Ensure that all reaction components are adequately mixed and the resulting mixture is centrifuged before dispensing • پلیت‌های سفید PCR به پلیت‌های شفاف ارجحیت دارند • White PCR plates are preferable to clear plates • برای جلوگیری از تبخیر و اطمینان از انتقال موثر نور، یک چسب شفاف نوری را روی پلیت بچسبانید • To prevent evaporation and ensure effective light transmission, apply a transparent optical seal on the plate • تهیه مخلوط اصلی با معرف تازه و واحد، برای همه نمونه‌ها در یک آزمایش واحد • Preparation of master mix with fresh and uniform reagent for all samples in a single experiment 	<ul style="list-style-type: none"> • معرف‌ها، تجهیزات، جایجایی Reagents, equipment, handling 	<ul style="list-style-type: none"> • مشکلات فنی با تکرارپذیری Technical issues with reproducibility
<ul style="list-style-type: none"> • در صورت امکان، مخلوط کردن نمونه (نرمال و دارای SNP) برای ایجاد هترو دوپلکس در طول ذوب توصیه می‌شود • If possible, mixing samples (normal and SNP) to create heteroduplexes during melting is recommended • توالی اصلی باید به عنوان یک استاندارد برای تأیید نتایج HRM استفاده شود • The original sequence should be used as a standard to verify HRM results • هر نمونه ناشناخته که یک منحنی ذوب منحصر به فرد را نشان می‌دهد باید با توالی یابی تأیید شود • Each unknown sample that shows a unique melting curve should be confirmed by sequencing 	<ul style="list-style-type: none"> • احتمال وجود تنوع در یک آمپلیکون منفرد Probability of variation in a single amplicon 	<ul style="list-style-type: none"> • چندین جایگاه چند شکلی نزدیک Multiple proximate polymorphic sites

در مرحله آخر برای بررسی تاثیر نوع رنگ فلورسنت مورد استفاده بر تفکیک منحنی‌های ذوب در HRM از دو مستر میکس مختلف به نام HRM Mix EvaGreen® HOT FIREPol® شرکت (Solis Biodyne) حاوی رنگ اواگرین و مستر میکس Sina Green HS-qPCR Mix شرکت سیناکلون حاوی رنگ سایبرگرین استفاده شد. واکنش ریل تایم PCR برای تکثیر قطعه با استفاده از دو مستر میکس مختلف سایبر گرین و اوا گرین طبق (جدول ۳) و برنامه PCR مطابق با جدول گذاشته شد. پس از اتمام آزمایش، نتایج با استفاده از نرم‌افزار Roche diagnostics بررسی گردید و با مقایسه منحنی‌های ذوب هر نمونه، تفاوت ژنوتیپ‌ها مشخص شد.

جدول ۲. برنامه ریل تایم PCR و HRM برای تکثیر قطعه مورد نظر

Table 2. Real-time PCR and HRM program for amplification of the desired fragment

دما	زمان
Temperature	Time
95° C	720 s
95° C	15 s
60° C	20 s
72° C	20 s
95° C	60 s
40° C	60 s
65° C	1 s
97° C	1 s

جدول ۳. میزان مواد مورد استفاده در Real-Time PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر

Table 4. The reagent quantities used in Real-Time PCR for a 15 µL reaction volume

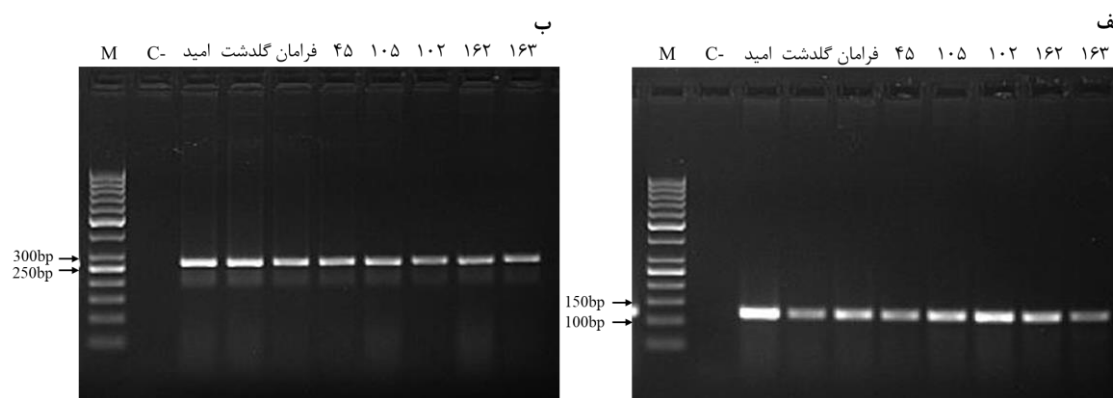
مستر میکس	آغازگر پیشرو ^۲	آغازگر پسرو ^۱	DNA	آب فاقد نوکلئاز
Master mix	Reverse primer	Forward primer		Nuclease-free water
سایبرگرین	7.5 µl	0.7 µl	1 µl (30 ng)	5.1 µl
SybrGreen				
اواگرین	3 µl	0.7 µl	1 µl (30 ng)	9.6 µl
EvaGreen				

¹ Reverse

² Forward

نتایج و بحث

پس از انجام واکنش PCR برای حصول اطمینان از اتصال درست آغازگرها و تکثیر صحیح قطعه، محصول PCR روی ژل الکتروفورز برده شد و باند اختصاصی مورد نظر در ۱۱۷ جفت باز و ۲۶۷ جفت باز مشاهده شد (شکل ۱). پس از انجام آزمون HRM با غلظت‌های ۱۰، ۳۰ و ۵۰ نانوگرم و بررسی منحنی‌های حاصل، مشاهده شد که در هر سه غلظت مختلف DNA الگو، ژنوتیپ‌های دارای SNP از ژنوتیپ‌های نرمال به خوبی تفکیک شده‌اند (شکل ۲). بنابراین بر اساس نتایج به دست آمده، رقت DNA در بازه ۱۰ تا ۵۰ نانوگرم تاثیر چندانی در تفکیک منحنی‌های ذوب ندارد. در تحقیقی گزارش شد که به‌طور کلی عملکرد HRM در طیف وسیعی از غلظت‌های DNA مناسب است (Soltani et al. 2023). همچنین گزارش شده که هنگام تجزیه و تحلیل تنوع در ژن JAK2، استفاده از مقادیر مختلف DNA، تفاوت قابل توجهی در منحنی ذوب ایجاد نکرد (Hosoi et al. 2024). با این حال، طبق یک گزارش غلظت DNA می‌تواند بر دمای ذوب در شرایط خاص تأثیر بگذارد (Ng et al. 2014).

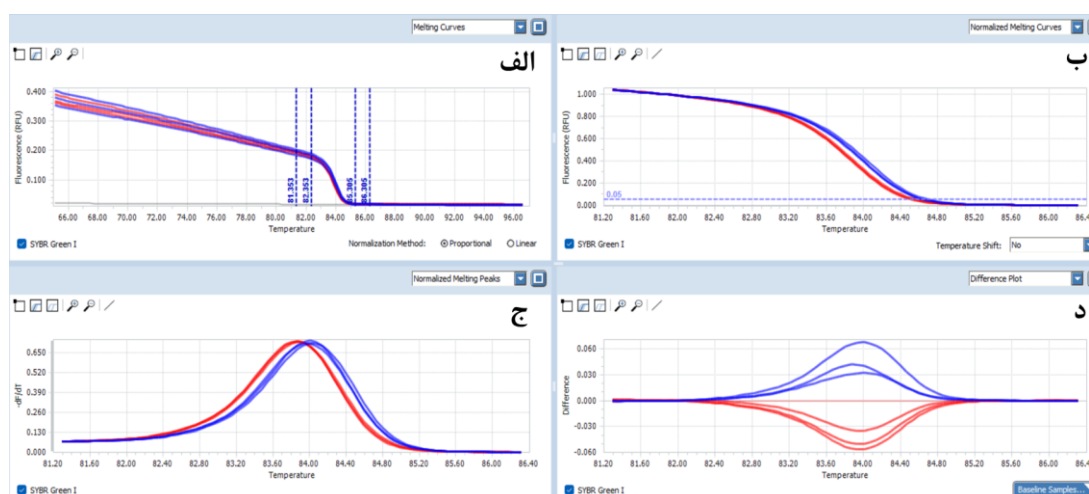


شکل ۱. تست آغازگرها برای هشت ژنوتیپ مورد نظر (نام ژنوتیپ‌ها در بالای ژل ذکر شده است). C- شاهد منفی یعنی بدون DNA است). الف) نتایج ژل الکتروفورز برای آغازگر HRM1 (که قطعه‌ای به طول ۱۱۷ جفت باز تولید می‌کند) ب) نتایج ژل الکتروفورز برای آغازگر HRM2 (که قطعه‌ای به طول ۲۶۷ جفت باز تولید می‌کند).

Figure 1. Primer screening for eight target genotypes (Genotype names are labeled above the gel lanes. C- indicates the negative control without DNA template). a) Electrophoresis gel results for primer HRM1, amplifying a 117 bp fragment. b) Electrophoresis gel results for primer HRM2, amplifying a 267 bp fragment.

در ادامه آزمایش، آزمون HRM با آغازگرهای HRM1 و HRM2 انجام شد. این دو آغازگر که به ترتیب قطعه‌هایی به طول ۱۱۷ و ۲۶۷ جفت باز تولید می‌کردند. آغازگر اول توانست به درستی هشت ژنوتیپ را بر اساس وجود و عدم وجود SNP مورد نظر در ناحیه کدکننده ژن FAD2-1 تفکیک کند. زیرا در توالی تکثیر شده، فقط SNP مورد نظر قرار داشت (شکل ۳ الف) و تفاوت

دیگری که باعث تفکیک اشتباه ژنوتیپ‌ها شود وجود نداشت. آغازگر HRM2 نتوانست هشت ژنوتیپ مورد نظر را بر اساس وجود و عدم وجود SNP مورد نظر تفکیک کند، به این ترتیب که ژنوتیپ‌های ۴۶، ۱۰۲ و ۱۶۲ را در یک گروه قرار داد (شکل ۳ ب). زیرا توالی بزرگتری را در بر می‌گرفت و احتمال دارد شامل تفاوت‌های دیگری باشد که مدنظر نبوده است. مطالعات نشان داده‌اند که اندازه آمپلیکون به‌طور قابل توجهی بر عملکرد HRM تأثیر می‌گذارد، با آمپلیکون‌های کوچک‌تر به‌طور کلی تشخیص بهتر صورت می‌گیرد (Li et al. 2010; R. Pomeroy et al. 2014). طراحی آغازگر بسیار مهم است و اندازه آمپلیکون معمولاً بین ۱۰۰-۳۰۰ جفت باز است (Wahyuningsih et al. 2017).



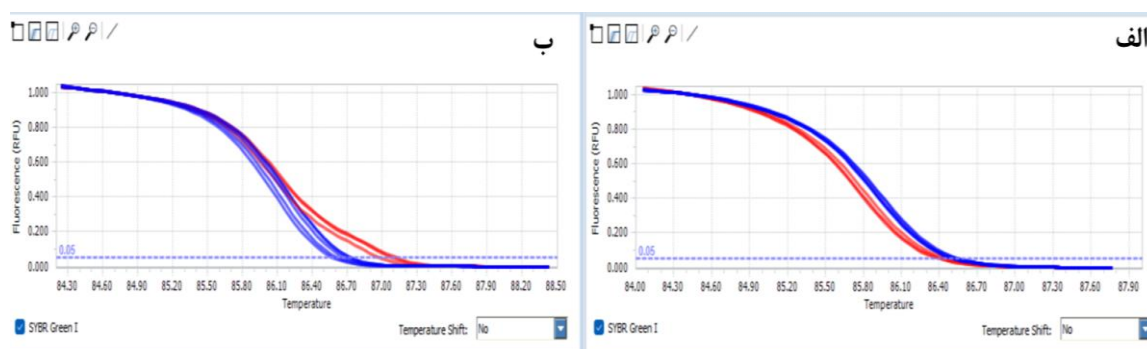
شکل ۲. نتایج آزمون HRM با سه غلظت مختلف DNA ژنومی الگو (غلظت‌های ۱۰، ۳۰ و ۵۰ نانوگرم

بر میکرولیتر): ژنوتیپ دارای SNP (ژنوتیپ ۱۶۲، که به رنگ قرمز نشان داده شده است) در تمام غلظت‌های DNA مورد بررسی از ژنوتیپ نرمال (ژنوتیپ فرامان، که با رنگ آبی نشان داده شده است) تفکیک شده است. الف) منحنی ذوب ب) منحنی ذوب نرمال ج) نمودار ذوب نرمال د) منحنی تمایز.

Figure 2. HRM assay results with three different template DNA concentrations (10, 30, and 50 ng/μL): Genotype 162 (carrying SNP, shown in red) is distinguished from the normal genotype (Faraman, shown in blue) across all three concentrations. A) Melting curve B) Normalized melting curve C) Normalized melting peak D) Difference plot.

با این حال، HRM همچنان می‌تواند ژنوتیپ‌ها را در آمپلیکون‌های بزرگ‌تر تا ۷۰۰ جفت باز متمایز کند، اگرچه مورد اخیر به ابزارهایی با وضوح بالا نیاز دارد (R. Pomeroy et al. 2014). آمپلیکون‌های کوچک‌تر باعث سرعت ذوب سریعتر و افزایش اختلاف دمای ذوب نسبی می‌شود و در نتیجه تشخیص و تمایز را بهبود می‌بخشد (Li et al. 2017; Erali et al. 2008). از طرفی کیفیت و ویژگی آغازگرها برای نتایج دقیق ریل تایم PCR بسیار مهم است (Moulazadeh & Ghanbariasad 2021).

بهینه‌سازی غلظت آغازگر می‌تواند باعث حذف دایمرهای آغازگر و بهبود واکنش های PCR شود (Sadeghi et al. 2015). خلوص آغازگرهای PCR نقش مهمی در این تکنیک ها ایفا می‌کند (Takei & Nakatani 2013). خالص‌سازی آغازگرها با HPLC می‌تواند آلاینده‌ها را حذف کرده و ظرفیت اتصال را بهبود بخشد (Weissman et al. 2013). این پیشرفت‌ها به ژنوتیپ‌سنجی SNP کارآمدتر و قابل اعتمادتر در گیاهان و سایر موجودات کمک می‌کند. در مرحله آخر، آزمون HRM برای هشت ژنوتیپ با مسترمیکس اواگرین گذاشته‌شد که به‌درستی سه ژنوتیپ ۱۰۲، ۱۶۲ و ۱۶۳ که دارای تک SNP بودند از ۵ ژنوتیپ امید، گلدشت، فرامان، ۴۵ و ۱۰۵ که بدون تغییر بوده تفکیک شدند (شکل ۴ الف). اما برای آزمون HRM با مسترمیکس سایبرگرین، دو ژنوتیپ گلدشت و امید رفتار اشتباه داشتند یعنی منحنی ذوب آن‌ها مانند ژنوتیپ‌های نرمال دیگر نبود. اما وقتی تعداد ژنوتیپ‌ها به شش عدد کاهش داده شدند، تفکیک تمام ژنوتیپ‌ها به‌درستی انجام شد (شکل ۴ ب).



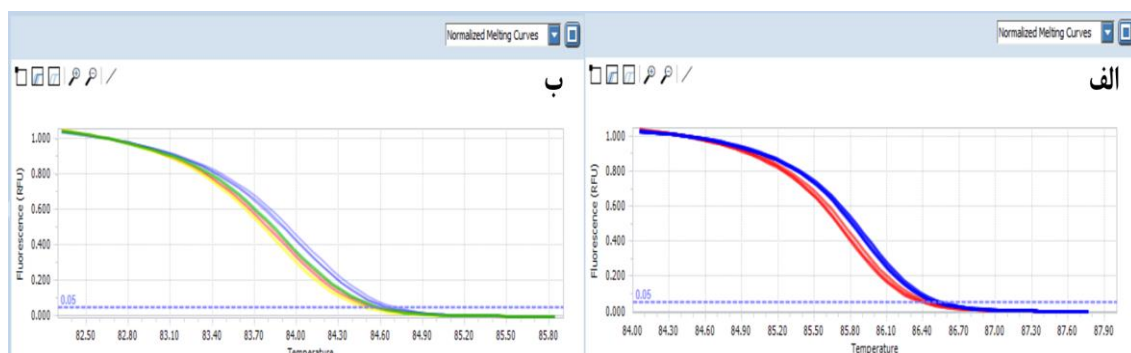
شکل ۳. تاثیر طول آمپلیکون بر نتایج آزمون HRM (الف) آزمون HRM با آغازگر HRM1 که قطعه‌ای به طول ۱۱۷ جفت باز تولید کرد، تفکیک ژنوتیپ‌های نرمال و دارای SNP را به‌درستی در منحنی ذوب نرمال نشان داد. ب) استفاده از آغازگر HRM2 که قطعه‌ای به طول ۲۵۶ جفت باز تولید کرد، باعث شد که تغییرات دیگر، به‌جز SNP مورد نظر در این قطعه قرار گیرد و باعث بهم خوردن منحنی ذوب نرمال و تفکیک نادرست ژنوتیپ‌ها شد.

Figure 3. Effect of amplicon length on HRM assay results

- a) HRM analysis using primer HRM1 (amplifying a 117-bp fragment) correctly distinguished between normal and SNP-carrying genotypes in the normalized melting curve.
- b) Primer HRM2 (amplifying a 256-bp fragment) introduced additional sequence variations led to the inclusion of changes, other than the desired SNP within the amplicon, leading to distorted melting profiles and impaired genotype discrimination.

اواگرین در ریل تایم PCR از سایبرگرین بهتر عمل می‌کند و بازده واکنش و قدرت سیگنال بهتری را نشان می‌دهد

(Eischeid 2011). رنگ‌های تجاری HRM مانند LCGreen Plus و اواگرین عموماً بهترین عملکرد را دارند، این یافته‌ها نشان می‌دهد که اواگرین جایگزین امیدوارکننده‌ای برای سایبرگرین برای تکنیک‌های مختلف آنالیز DNA، از جمله HRM و ریل تایم PCR هستند (Radvánszky et al. 2015). اواگرین، یک رنگ مقرون به صرفه intercalating DNA نشان داده شده است که عملکرد قابل مقایسه با رنگ‌های گران‌تر مانند LCGreen در برنامه‌های HRM دارد. در HRM غلظت رنگ باید برای اندازه‌گیری دقیق دمای ذوب (T_m) بهینه شود، زیرا هم مقادیر ناکافی و هم بیش از حد می‌تواند بر نتایج تأثیر بگذارد. HRM با استفاده از اواگرین همچنین می‌تواند T_m تری پلکس‌های DNA، ساختار سنجاق سری و دوبلکس‌های RNA را اندازه‌گیری کند (Wang et al. 2016). در سنجش‌های ریل تایم PCR چندگانه، اواگرین بهتر از سایبرگرین عمل کرد و وضوح پیک بهتر، حساسیت بالاتر و همبستگی بهبود یافته بین مقادیر Ct و غلظت DNA را ارائه داد (Khan et al. 2011). این یافته‌ها نشان می‌دهد که اواگرین ممکن است جایگزینی برتر برای سایبرگرین در کاربردهای مختلف آنالیز DNA باشد. در حالی که معمولاً سایبرگرین مورد استفاده قرار می‌گیرد هر دو رنگ اواگرین و SYTO در ریل تایم PCR عملکرد بهتری از سایبرگرین دارند و راندمان واکنش و قدرت سیگنال بهتری را ارائه می‌دهند (Eischeid 2011). Aijuka و Buys (2020) پیشنهاد کردند که کارایی بهبود یافته اواگرین ممکن است به دلیل توانایی آن در ایجاد محصولات غیر اختصاصی کمتر باشد. این ویژگی نه تنها به حساسیت بهتر کمک می‌کند، بلکه قابلیت اطمینان کلی نتایج PCR را نیز بهبود می‌بخشد (Aijuka & Buys 2020).



شکل ۴. مقایسه رنگ اواگرین و سایبر گرین در آزمون HRM (الف) با رنگ اواگرین، تمام هشت ژنوتیپ به درستی در منحنی ذوب نرمال تفکیک شده‌اند (ب) با رنگ سایبر گرین، ژنوتیپ گلدشت (سبز رنگ) و ژنوتیپ امید (زرد رنگ) رفتار اشتباه نسبت به ژنوتیپ‌های نرمال نشان داده در گروه ژنوتیپ‌های دارای SNP قرار گرفته‌اند.

Figure 4. Comparison of EvaGreen and SYBR Green dyes in HRM analysis

a) Using EvaGreen, all eight genotypes were accurately distinguished in the normalized melting curve.

b) With SybrGreen, genotypes Goldasht (green) and Omid (yellow) exhibited aberrant melting profiles, resulting in their misclassification as SNP-carrying genotypes despite being normal variants.

نتیجه‌گیری: آزمون HRM روشی مقرون به‌صرفه و سریع است که می‌تواند برای ژنوتیپ‌سنجی دقیق ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گیرد. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، طراحی آغازگر بسیار مهم است و تفکیک منحنی‌های ذوب برای آمپلیکون‌های کوچک‌تر بهتر صورت می‌گیرد. آمپلیکون‌های بزرگتر، توالی بیشتری را دارا بوده و احتمال دارد شامل تفاوت‌های دیگری باشد که مدنظر نبوده‌است. رنگ اواگرین مناسب‌تر از سایبرگرین بوده و با استفاده از اواگرین می‌توان به کارایی بهتری دست یافت. مقادیر مختلف DNA الگو در محدوده ۱۰ تا ۵۰ نانوگرم تأثیری بر منحنی‌های ذوب ندارد و ژنوتیپ‌سنجی به درستی انجام می‌شود.

References

- Aijuka, M., & Buys, E. M. (2020). Detection of extended-spectrum beta-lactamase cefotaxime resistance and virulence genes in *Escherichia coli* by duplex quantitative real-time PCR and melt curve analysis. *Letters in Applied Microbiology*, *71*(1), 54–60. <https://doi.org/10.1111/lam.13274>
- Bruzzone, C. M., Tawadros, P. S., Boardman, L. A., & Steer, C. J. (2013). Enhanced primer selection and synthetic amplicon templates optimize high-resolution melting analysis of single-nucleotide polymorphisms in a large population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, *17*(9), 675–680. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2013.0113>
- Buh Gašparič, M., Cankar, K., Žel, J., & Gruden, K. (2008). Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology*, *8*, 1-12. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-26>
- Chagné D. (2015). Application of the high-resolution melting technique for gene mapping and SNP detection in plants. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1245*, 151–159. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6_11
- Dar, A. A., Choudhury, A. R., Kancharla, P. K., & Arumugam, N. (2017). The FAD2 Gene in Plants: Occurrence, Regulation, and Role. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1789. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01789>
- De Leeneer, K., Coene, I., Poppe, B., De Paepe, A., & Claes, K. (2008). Rapid and sensitive detection of BRCA1/2 mutations in a diagnostic setting: comparison of two high-resolution melting platforms. *Clinical Chemistry*, *54*(6), 982–989. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.098764>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, *19*, 11-15.

- Eischeid A. C. (2011). SYTO dyes and EvaGreen outperform SybrGreen in real-time PCR. *BMC Research Notes*, 4, 263. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-263>
- Erali, M., & Wittwer, C. T. (2010). High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods (San Diego, Calif.)*, 50(4), 250–261. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.013>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.03.012>
- Giglio, S., Monis, P. T., & Saint, C. P. (2003). Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research*, 31(22), e136. <https://doi.org/10.1093/nar/gng135>
- Golkar, P., Arzani, A., & Rezaei, A. M. (2011). Genetic variation in safflower (*Carthamus tinctorious* L.) for seed quality-related traits and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(4), 2664–2677. <https://doi.org/10.3390/ijms12042664>
- Grazina, L., Costa, J., Amaral, J. S., & Mafra, I. (2021). High-Resolution Melting Analysis as a Tool for Plant Species Authentication. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2264, 55–73. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1201-9_5
- Guan, L. L., Y. W. Xu, Y. B. Wang, L. Chen, J. F. Shao & W. Wu. (2012). Isolation and characterization of a temperature-regulated microsomal oleate desaturase gene (ctFAD2-1) from safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 30: 391-402. <https://doi.org/10.1007/s11105-011-0349-7>
- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D. D., & Wolff, A. (2007). Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Research*, 35(19), e127. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm671>
- Han, Y., Khu, D. M., & Monteros, M. J. (2012). High-resolution melting analysis for SNP genotyping and mapping in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, 29(2), 489–501. <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9566-x>
- Herrmann, M. G., Durtschi, J. D., Bromley, L. K., Wittwer, C. T., & Voelkerding, K. V. (2006). Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clinical Chemistry*, 52(3), 494–503. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.063438>
- Hosoi, H., Hori, Y., Fukutsuka, K., Osuga, M., Koh, Y., Mushino, T., Hanaoka, N., Yamamoto, N., Ohno, H., & Sonoki, T. (2024). Detection of the JAK2 V617F Mutation in Urinary

- Cell-free DNA in Patients with Myeloproliferative Neoplasms. *Internal Medicine (Tokyo, Japan)*, 63(14), 1987–1993. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.2837-23>
- Kadirvel, P., et al. (2020). "Marker-assisted selection for fast-track breeding of high oleic lines in safflower (*Carthamus tinctorious* L.)." *Industrial Crops and Products* 158: 112983. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112983>
- Khan, S. A., Sung, K., & Nawaz, M. S. (2011). Detection of aacA-aphD, qacEδ1, marA, floR, and tetA genes from multidrug-resistant bacteria: Comparative analysis of real-time multiplex PCR assays using EvaGreen(®) and SYBR(®) Green I dyes. *Molecular and Cellular Probes*, 25(2-3), 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.01.004>
- Knopkiewicz, M., Gawłowska, M., & Śawiecicki, W. (2014). The application of high resolution melting in the analysis of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism markers in a pea (*Pisum sativum* L.) population. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 50(2), 151-156. <https://doi.org/10.17221/113/2013-CJGPB>
- Konschak, R., & Tinhofer, I. (2011). Prestaining of PCR products with SYBR Green for agarose gel electrophoresis: advantages and limitations. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49(6), 1069–1071. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.171>
- Li, M., Palais, R. A., Zhou, L., & Wittwer, C. T. (2017). Quantifying variant differences in DNA melting curves: Effects of length, melting rate, and curve overlay. *Analytical Biochemistry*, 539, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.10.015>
- Li, Y. D., Chu, Z. Z., Liu, X. G., Jing, H. C., Liu, Y. G., & Hao, D. Y. (2010). A cost-effective high-resolution melting approach using the EvaGreen dye for DNA polymorphism detection and genotyping in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(12), 1036–1042. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.01001.x>
- Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., & Wittwer, C. (2004). Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical chemistry*, 50(7), 1156–1164. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.032136>
- Mao, F., Leung, W. Y., & Xin, X. (2007). Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnology*, 7, 76. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-76>
- Montgomery, J. L., Sanford, L. N., & Wittwer, C. T. (2010). High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 10(2), 219–240. <https://doi.org/10.1586/erm.09.84>

- Moulazadeh A, & Ghanbariasad A. (2021). The Primer Specificity is Critical to Getting Right Results in Real Time PCR. *JABS*; 11 (1):3665-3666. <https://doi.org/10.18502/jabs.v11i1.8758>
- Ng, J., Holt, D., Andersson, P., & Giffard, P. (2014). DNA concentration can specify DNA melting point in a high-resolution melting analysis master mix. *Clinical Chemistry*, 60(2), 414-416. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.215582>
- Pomeroy, R. S., Balamurugan, K., Wong, H., & Duncan, G. (2014). High-resolution melt analysis of the minisatellite D1S80: a potential forensic screening tool. *Electrophoresis*, 35(21-22), 3020–3027. <https://doi.org/10.1002/elps.201400143>
- Sadeghi, S., Tabatabaeian, H., & Hojati, Z. (2015). Optimization of real time PCR for precise measurement of HER2 overexpression in breast cancer specimens. *Research in Molecular Medicine*, 3(2), 37-44. <https://doi.org/10.7508/rmm.2015.02.006>
- Sang, F., & Ren, J. (2006). Capillary electrophoresis of double-stranded DNA fragments using a new fluorescence intercalating dye EvaGreen. *Journal of Separation Science*, 29(9), 1275-1280. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600029>
- Shafiei-Koij, F., Ravichandran, S., Barthet, V. J., Rodrigue, N., Mirlohi, A., Majidi, M. M., & Cloutier, S. (2020). Evolution of *Carthamus* species revealed through sequence analyses of the *fad2* gene family. *Physiology and Molecular Biology of Plants: An International Journal of Functional Plant Biology*, 26(3), 419–432. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00739-4>
- Simko I. (2016). High-Resolution DNA Melting Analysis in Plant Research. *Trends in Plant Science*, 21(6), 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.004>
- 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. <https://doi.org/10.3390/ijms18112316>
- Soltani, A., Shariati, A., Didehdar, M., Anoushirvani, A. A., Tabaeian, S. P., & Moradabadi, A. (2023). The Effect of DNA Concentration on the HRM Performance in Detecting Jak2 p. V617F Variant in Patients with Myeloproliferative Neoplasms. *Current Signal Transduction Therapy*, 18(2), 33-39.
- Takei, F., & Nakatani, K. (2013). The chemistry of PCR primers: concept and application. *Israel Journal of Chemistry*, 53(6-7), 401-416. <https://doi.org/10.1002/ijch.201300027>
- Tamburro, M., & Ripabelli, G. (2017). High Resolution Melting as a rapid, reliable, accurate and cost-effective emerging tool for genotyping pathogenic bacteria and enhancing molecular epidemiological surveillance: a comprehensive review of the literature. *Annali di igiene*

- : *Medicina Preventiva e di Comunita*, 29(4), 293–316.
<https://doi.org/10.7416/ai.2017.2153>
- Taylor C. F. (2009). Mutation scanning using high-resolution melting. *Biochemical Society Transactions*, 37(Pt 2), 433–437. <https://doi.org/10.1042/BST0370433>
- 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. <https://doi.org/10.1002/humu.21019>
- Wahyuningsih, H., K Cayami, F., Bahrudin, U., A Sobirin, M., Ep Mundhofir, F., Mh Faradz, S., & Hisatome, I. (2017). Optimization of PCR Condition: The First Study of High Resolution Melting Technique for Screening of APOA1 Variance. *Yonago Acta Medica*, 60(1), 24–30. <https://doi.org/10.3390/biom13101468>
- Wang, J., Pan, X., & Liang, X. (2016). Assessment for Melting Temperature Measurement of Nucleic Acid by HRM. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016, 5318935. <https://doi.org/10.1155/2016/5318935>
- Weissman, D., Pardi, N., Muramatsu, H., & Karikó, K. (2013). HPLC purification of in vitro transcribed long RNA. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 969, 43–54. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-260-5_3
- Wittwer C. T. (2009). High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Human mutation*, 30(6), 857–859. <https://doi.org/10.1002/humu.20951>
- 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 Pt 1), 853–860. <https://doi.org/10.1373/49.6.853>
- 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 Pt 1), 853–860. <https://doi.org/10.1373/49.6.853>
- Yamagata, Y., Yoshimura, A., Anai, T., & Watanabe, S. (2018). Selection criteria for SNP loci to maximize robustness of high-resolution melting analysis for plant breeding. *Breeding Science*, 68(4), 488–498. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.18048>
- Yang, J., Kempes-Mols, B., Spruyt-Gerritse, M., Anholts, J., Claas, F., & Eikmans, M. (2016). The source of SYBR green master mix determines outcome of nucleic acid amplification reactions. *BMC Research Notes*, 9, 292. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2093-4>