مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

کاربرد الگوریتم uMelt SM در آنالیز منحنی ذوب Real-time PCR

اناهیتا خارابی ماسوله[1]، عباس سعیدی[2]*

[1] دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه علوم گیاهی و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

[2] استاد گروه علوم گیاهی و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۲۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۰۷

چکیده

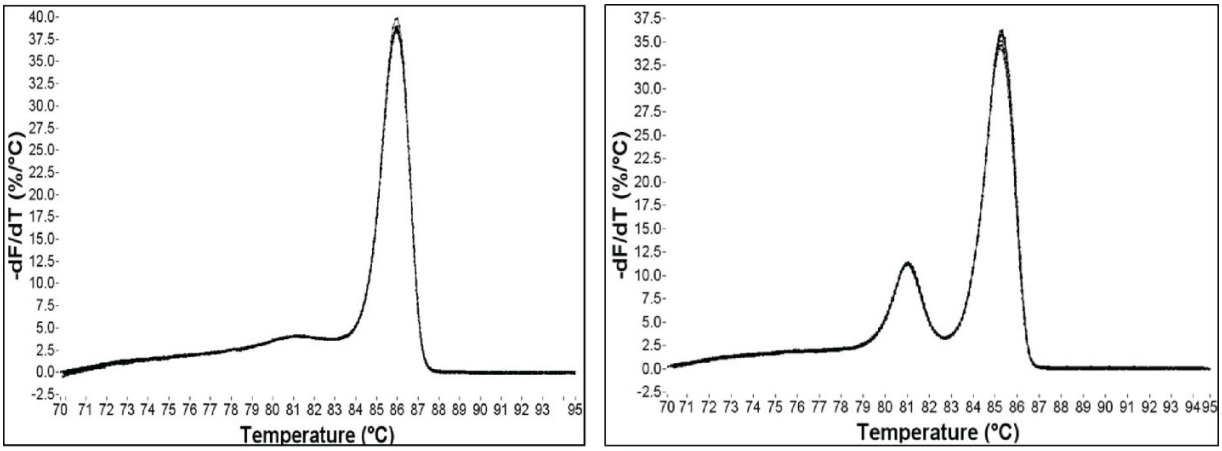
یکی از چالش‌های موجود در تفسیر نتایج qPCR، اطمینان از اختصاصی بودن قطعات تکثیر شده است که برای بررسی آن از آنالیز منحنی ذوب استفاده می‌شود. پیک‌های اضافی در منحنی ذوب همیشه نشان دهنده یک مشکل نیست، به همین منظور در این مقاله یک ابزار مبتنی بر وب به نام uMelt SM به عنوان راهکاری کاربردی و ساده برای آنالیز صحیح منحنی ذوب به محققین پیشنهاد می‌گردد که امکان پیش‌بینی منحنی ذوب DNA و پروفیل‌های واسرشته سازی را با وضوح بالای فلورسنت از محصولات PCR فراهم می‌کند. نتایج این مطالعه نشان داد که منحنی‌های ذوب براساس چه پارامترهایی تولید شده و الگوریتم مناسب برای نحوه کار با این نرم افزار ارائه گردید. در نهایت ژن‌های اکتین و سوپراکسید دیسموتاز از قارچ *Pyricularia oryzae* به عنوان الگوی مناسب برای تعیین منحنی پیش‌بینی شده با استفاده از این نرم‌افزار ارائه گردید و منحنی Real-time PCR نیز ترسیم شد. براساس نتایج منحنی ذوب با استفاده از نرم افزار uMelt SM در مقایسه با منحنی ذوب دستگاه Real-Time PCR تطابق بالایی را نشان می‌دهد که این نتایج تأییدی بر مزیت‌هایی همچون سهولت استفاده، صرفه‌جویی در زمان، هزینه و تلاش در بخش تجربی با استفاده از این نرم‌افزار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *qPCR، منحنی ذوب، آزمایش، پیش بینی، uMelt SM*

* نویسنده مسئول: عباس سعیدی تلفن: ۰۲۱۲۹۹۰۳۲۴۴ Email:abbas.saidi@gmail.com

مقدمه

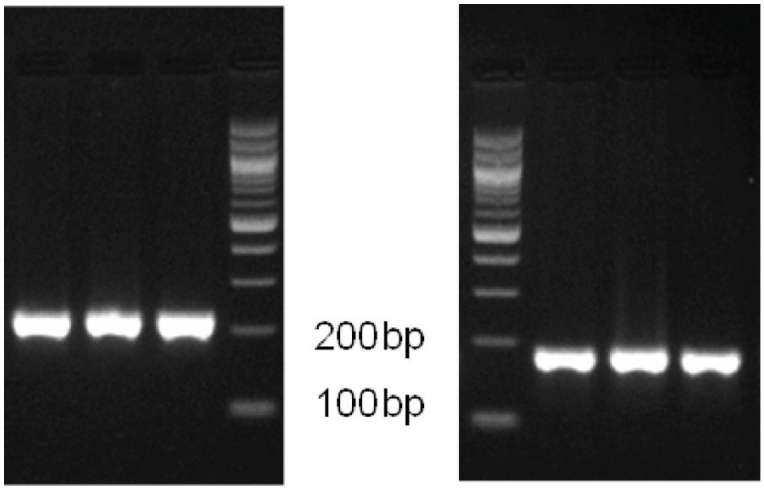
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی (qPCR)، یک روش آزمایشگاهی زیست شناسی مولکولی بوده که بر اساس واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) شناخته می‌شود. از جمله مزایای Real-Time PCR ترسیم منحنی ذوب است که این عمل پس از اتمام فرآیند PCR انجام می‌شود. این منحنی در سال ۱۹۹۷ به عنوان جایگزینی برای الکتروفورز ژل برای ارزیابی خلوص محصول معرفی شد (Ririe *et al*., 1997). دمای ذوب DNA پارامتر ویژه‌ای از این مولکول بوده و به ساختمان DNA و عواملی نظیر طول و تعداد نوکلئوتیدها، میزان نمک محیط و درصد GC بستگی دارد (Capote *et al*., 2012). از آنجایی که رنگ SYBR Green نمی‌تواند بین محصولات دورشته‌ای مختلف تفاوتی قائل باشد و نتایج غالبا" بیشتر از غلظت اصلی برآورد می‌شود (Capote *et al*., 2012; Primrose *et al*., 2001)، می‌توان با استفاده از منحنی ذوب تنوع محصولات (قطعات اختصاص/غیر اختصاصی و پرایمر–دایمر) را در فرآیند PCR مشخص کرد. بعد از اینکه PCR به اتمام رسید، دستگاه قادر به ترسیم نمودار ذوب هر نمونه بوده که این کار به‌وسیله اندازه‌گیری تغییرات فلورسانس در دماهای مختلف صورت می‌گیرد. مراحل انجام کار به این ترتیب است که برای رسم منحنی، دستگاه دمای نمونه‌ها را در فواصل زمانی مشخص (مثلاً هر ۱۰ ثانیه) به مقدار معینی تغییر می‌دهد. بطور نمونه ابتدا دستگاه دمای نمونه‌ها را به ۹۴ درجه سانتیگراد رسانده که در این حالت تمام DNAها به صورت تک رشته‌ای در آمده و میزان SYBR Green متصل شده حداقل بوده و در نتیجه میزان فلورسانس ساطع شده کم می‌باشد. به تدریج دستگاه دمای نمونه ها را در هر مرحله ۰/۵ درجه سانتی‌گراد کاهش داده و به مدت ۱۰ ثانیه در آن دما ثابت نگه داشته و در این مدت نور ساطع شده از نمونه‌ها توسط دستگاه اندازه‌گیری می‌شود. همزمان با این عمل منحنی تغییرات فلورسانس برحسب دما که همان منحنی ذوب است ترسیم می‌شود (Ririe *et al*., 1997). توانایی پیش‌بینی شکل و موقعیت منحنی ذوب برای طراحی و بهینه‌سازی آزمون ضروری است. پیک‌های اضافی در منحنی ذوب همیشه نشان‌دهنده مشکل خاصی نیست. اگرچه اغلب فرض می‌شود که یک تناظر یک طرفه بین تعداد قله ها و تعداد محصولات وجود دارد اما این امر به وضوح برای بسیاری از توالی‌هایی که در آن-ها اختلاف توزیع گوانیدین- سیتوزین (GC) باعث تولید دامنه‌های مختلف ذوب می شود، صادق نیست (Dwight *et al*., 2011). به طور مثال در شکل۱ منحنی ذوب برای دو قطعه تکثیر شده نشان داده شده است. پیک مجزا برای یک قطعه از اگزون ۱۷b از ژن CFTR (شکل A.۱) معمولاً به عنوان خلوص آن قطعه تفسیر می‌شود.



A. CFTR Exon 17b B. CFTR Exon 7

شکل ۱- منحنی ذوب qPCR از A) اگزون ۱۷b ژن CFTR و B) اگزون ۷ ژن CFTR.

Figure 1- The qPCR melting curve from A) Exon 17b of the CFTR gene and B) Exon 7 of the CFTR gene.



A. CFTR Exon 17b B. CFTR Exon 7.

شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز محصولات qPCR رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید از A) اگزون ۱۷b ژن CFTR و B) اگزون ۷ ژن CFTR.

Figure 2- Agarose gel electrophoresis of qPCR products stained with ethidium bromide A) Exon 17b and B) Exon 7 of *CFTR* gene.

در مقابل، منحنی ذوب برای قطعه تکثیر شده از اگزون ۷ ژن *CFTR* (شکل B.۱) دو پیک را نشان می‌دهد که معمولاً به عنوان نشانه ۲ قطعه تکثیر شده جداگانه تفسیر می‌شود. اما، در واقع نتایج ژل الکتروفورز (شکل ۲) نشان می‌دهد که هر دو منحنی یک قطعه واحد را تولید کرده و یک محصول PCR واحد را تأیید نموده است (Downey *et al*., 2014). نرم‌افزار uMelt SM براساس مدل‌های ذوب DNA با استفاده از ترمودینامیک نزدیکترین همسایه و محاسبات بازگشتی به وسیله مکانیک آماری طراحی شده است (Zimm, 1960; Crothers, 1968; Poland, 1974; Gotoh, 1983; Steger, 1994; Blake *et al*., 1999; Tøstesen *et al*., 2003; Markham & Zuker, 2005) که می‌تواند آنالیز فلورسانس ذوب محصولات PCR را در یک برنامه سریع تحت وب پیش‌بینی نماید. این نرم افزار پیش‌بینی منحنی ذوب را بطور دقیق و با وضوح بالا ارائه می‌دهد. بارگذاری محصول PCR بر روی ژل آگارز، استانداردی برای بررسی محصولات PCR است. ضمناً هنگامی که یک تضاد ظاهری بین ژل و داده ذوب وجود دارد، uMelt SM می‌تواند برای آزمایشات اعتبارسنجی فراهم کند. برای مثال، اختلاف مشاهده شده بین منحنی ذوب پیش‌بینی شده با منحنی ذوب دستگاه Real-Time PCR (شکل ۳) بیانگر عدم صحت توالی‌های تکثیر شده نمی‌باشد. همچنین تصویر ژل (شکل ۳) محصولات PCR با اندازه یکسان را تأیید می‌نماید. با این حال، به علت توزیع متنوع GC در توالی ژن مورد نظر، چندین دامنه ذوب وجود خواهد داشت و دامنه ذوب متفاوت بیانگر تضاد محصولات تک باندی PCR (شکل ۳) نمی‌باشد. برای مثال ذکر شده، با توجه به اینکه دامنه‌های ذوب آزمایش از طریق پیش بینی uMelt SM بدست آمده بود لذا تأیید ژل آگارز غیر ضروری تلقی می‌گردد (University of Utah).

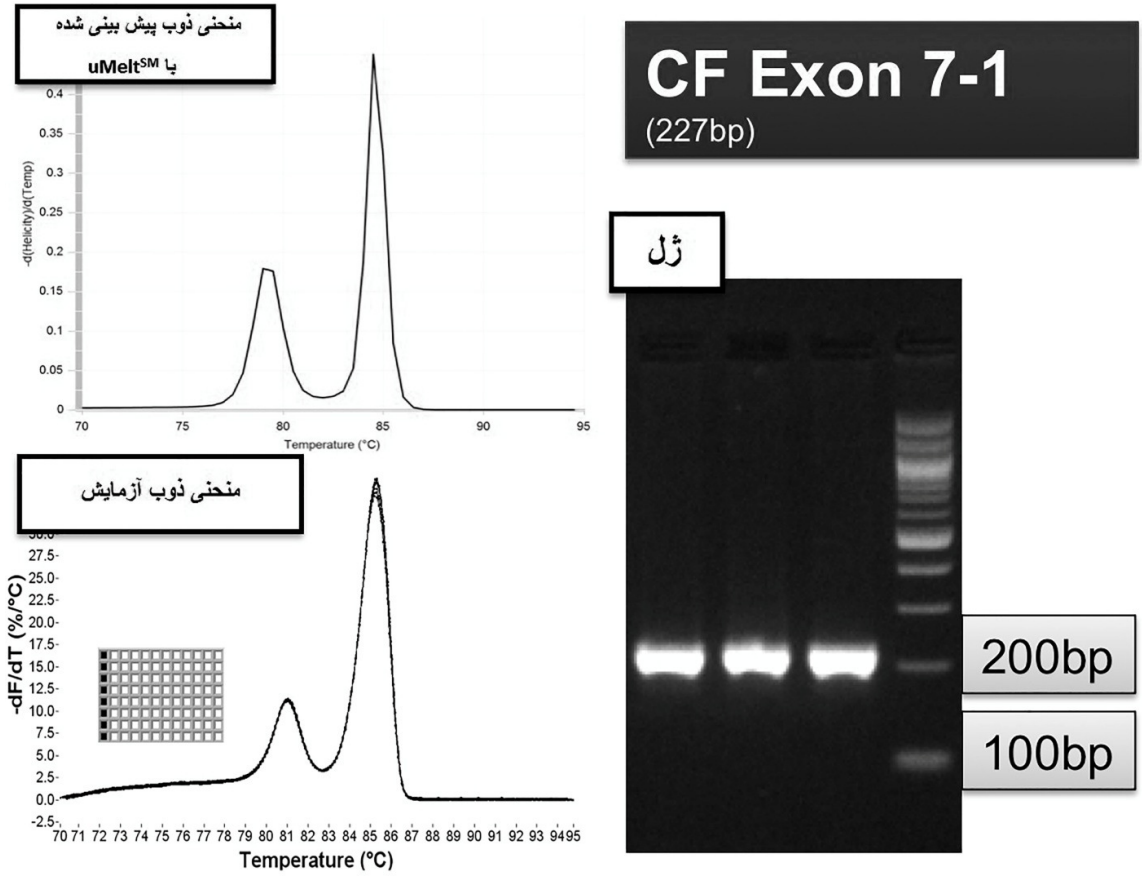
مواد و روش‌ها

نرم‌افزار uMelt SM به صورت آنلاین به آدرس https://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html قابل دسترسی است. با کلیک کردن روی لینک نشان داده شده با پیکان در شکل ۴، uMelt SM راه اندازی می‌شود. مراحل کار با نرم افزار، به ترتیب با شماره‌گذاری در شکل۵ نشان داده شده است.

ابزارهای کاربری ساده برای استفاده از این نرم‌افزار شامل یک جایگاه اختصاصی برای وارد نمودن توالی قطعه تکثیر شده (شکل ۵- شماره ۱)، یک منوی کشویی برای انتخاب مدل پیش‌بینی منحنی ذوب (شکل ۵- شماره ۲) و جایگاه‌هایی در قسمت Standard برای وارد نمودن غلظت Na^+، Mg^{2+} و DMSO (شکل ۵- شماره ۳) می‌باشد.

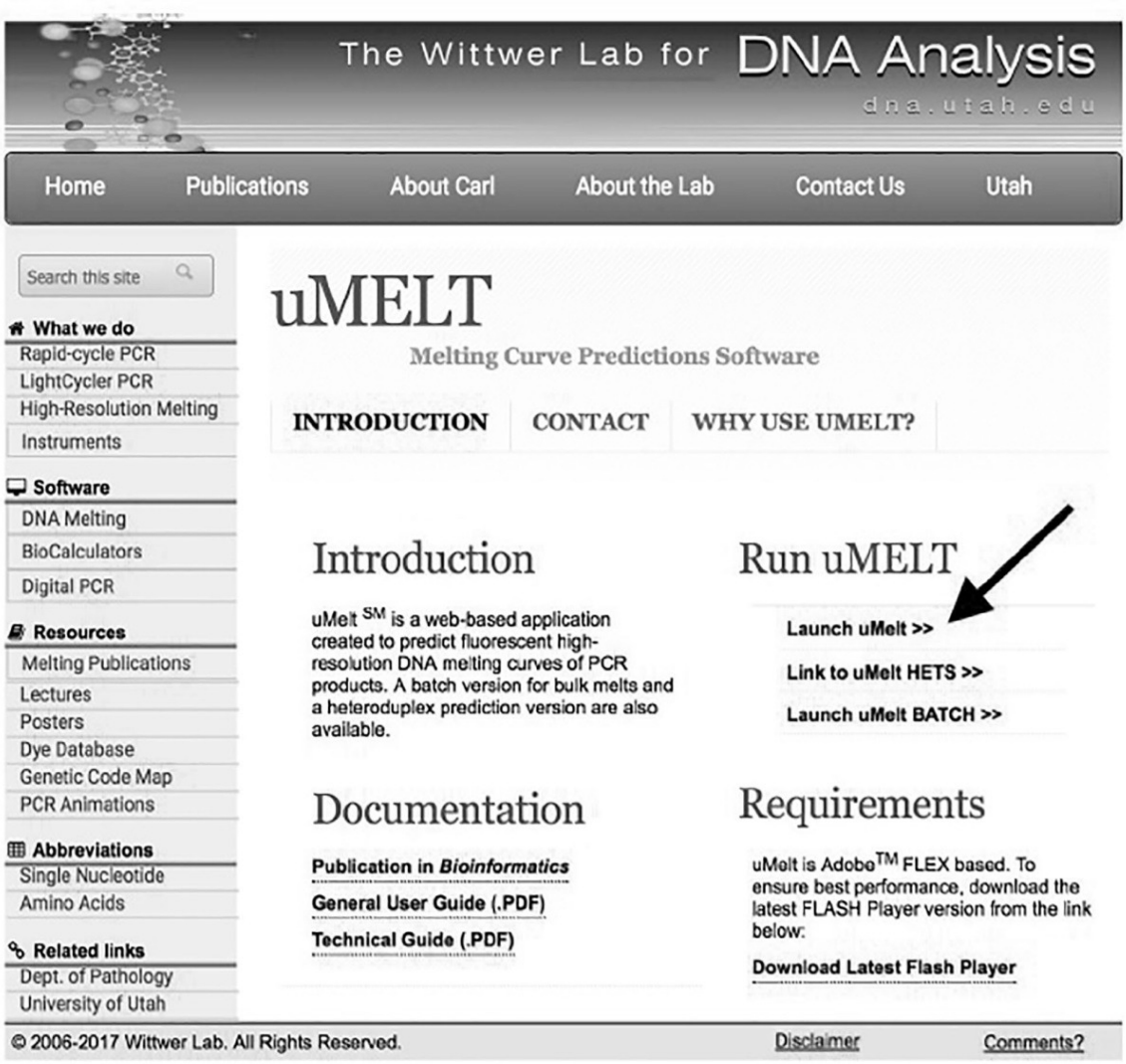
مدل‌های پیش‌بینی منحنی ذوب، قبلا توسط مقالات مجلات براساس پارامترهای ترمودینامیک نزدیکترین همسایه از جمله روش‌های مختلف

تجزیه و تحلیل داده‌ها، غلظت نمک‌های مختلف و ... ارائه شده است که کاربر می‌تواند با توجه به شرایط آزمایش و ژن مورد نظر، مدل مناسب را انتخاب نماید. برای تعریف شرایط آزمایشگاهی و مطابقت بهتر پیش‌بینی منحنی ذوب مشاهده شده با نتایج منحنی ذوب حاصل از دستگاه، پارامترهای زیر در قسمت Advanced در شکل ۵- شماره ۳ ارائه شده و قابل تنظیم می‌باشند (شکل ۶).



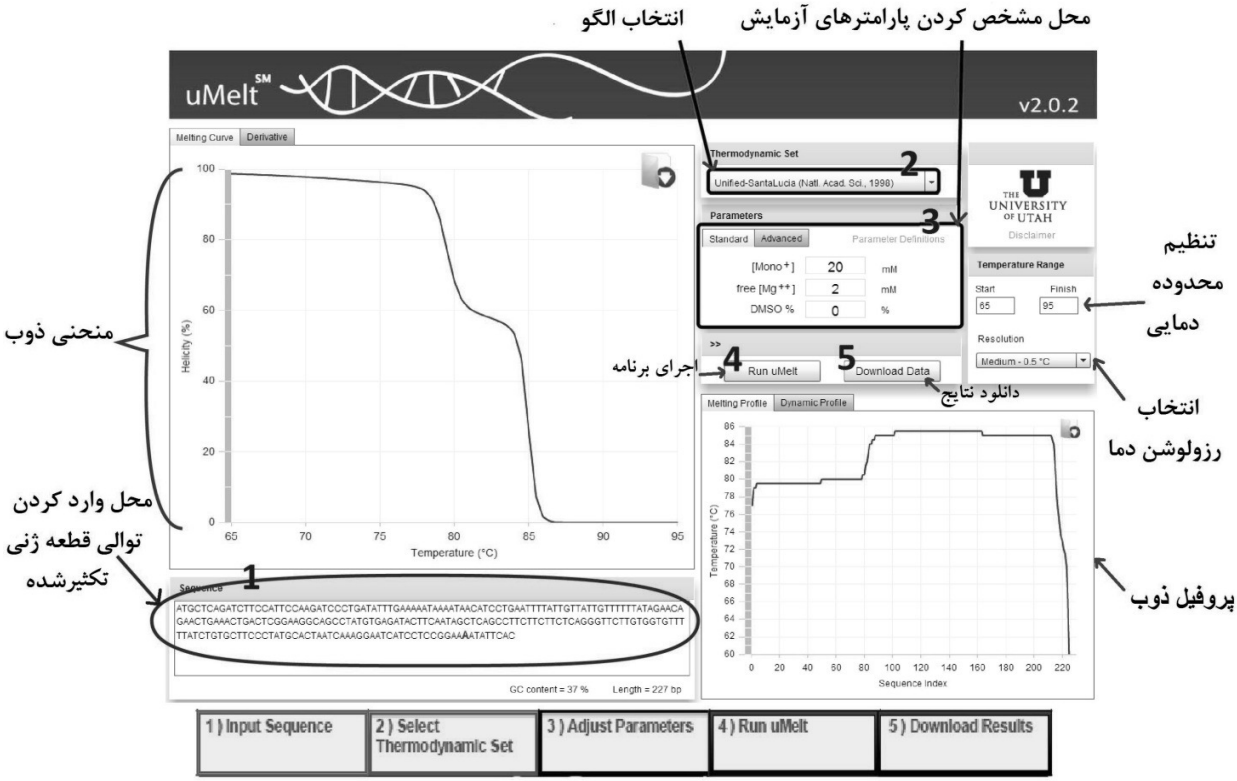
شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز و منحنی ذوب پیش‌بینی شده و آزمایش مربوط به محصولات qPCR از اگزون ۱-۷ ژن *CF*.

Figure 3- Agarose gel electrophoresis and predicted melting curve and the assay for qPCR products from CF Exon 7-1.



شکل ۴- لینک نرم‌افزار uMelt SM.

Figure 4- uMelt SM software link.



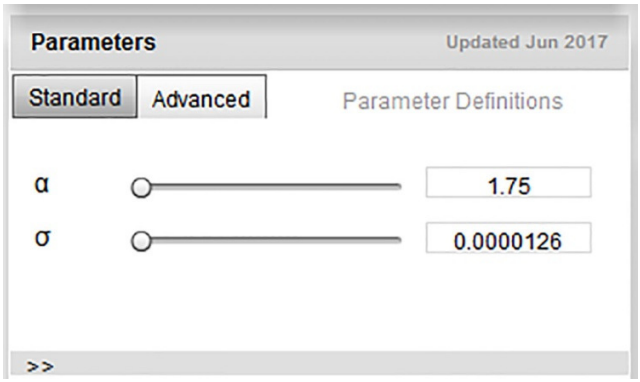
شکل ۵- مراحل کار با نرم‌افزار uMelt SM.

Figure 5- Operational steps involved with the uMelt SM software.

- α که شاخص بسته شدن حلقه[1] است.
- σ به عنوان تعاون ذوب[2] تعریف می شود که در مولکول‌های زنجیره ای بزرگ ساخته شده از بسیاری از واحدهای مشابه (یا تقریبا یکسان) (مانند DNA، پروتئین‌ها و فسفولیپیدها) مشاهده می‌شود. زمانی که چنین مولکول‌هایی تحت فرآیند انتقال فاز مانند ذوب شدن، بازشدن فولدینگ یا بازشدن بعد از پیچیده شدن، قرار می‌گیرند به‌عنوان زیر مجموعه Cooperativity شناخته می‌شوند. σ بالاتر (نزدیک به ۱) موجب فرایند ذوب تدریجی-تر می‌شود. پیشرفت‌های اخیر در درک رفتار ذوب DNA دو رشته‌ای همراه با روش‌های مکانیک آماری منجر به برآوردهای بهبود یافته از فاکتورهای مربوط به آنتروپی حلقه[1] برای رویدادهای جداسازی زنجیره‌ها، به ویژه برای ذوب حلقه داخلی است.

[1] Loop closure exponent
[2] Melting cooperativity

[1] Loop entropy



شکل۶- بخش تنظیمات α و σ.

Figure 6 – Setting section for α and σ.

در پژوهشی Blossey and Carlon (2003) جزئیات بیشتر استفاده از α و σ در تجزیه و تحلیل منحنی ذوب DNA برای توالی‌ها در طیف گسترده‌ای از طول (تقریباً بین ۱۰-۱۰^{۶} جفت باز) را ارائه داده‌اند. در این مقاله جهت تأیید روش پیشنهادی، توالی دو ژن از قارچ *Pyricularia oryzae* با مشخصات جدول ۱ انتخاب و با استفاده از روش ارائه شده در کتاب راهنمای کاربردی NCBI استخراج گردید (Mahdizadeh *et al.*, 2013). سپس پرایمرهای اختصاصی مربوط به آنها طراحی و توسط دستگاه Real-time PCR تکثیر و منحنی ذوب آن‌ها رسم شد. انالیز توالی‌های به دست آمده در uMelt انجام و به‌عنوان نمونه هایی از مقایسه منحنی ذوب آزمایش و منحنی پیش‌بینی شده در این نرم‌افزار مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

در نرم‌افزار uMelt^{SM} از دو متغیر α (شاخص بسته شدن حلقه) و σ (تعاون ذوب) برای محاسبه پارامتر آنتروپی حلقه (LEP)[1] با فرمول ۱ استفاده می‌شود که برای تنظیم پارامترهای پایداری جفت باز به کار می‌رود.

$$LEP(x) = \sigma \times (N+1)^{-\alpha} \qquad (۱)$$

در این فرمول، N طول توالی و x شاخص جفت باز است. فاکتورهای پایداری جفت باز[2] بر اساس مقادیر ترمودینامیکی (آنتروپی، آنتالپی) برای نزدیک‌ترین همسایه هر جفت در توالی محاسبه می‌شود.

[1] Loop entropy parameter
[2] Base pair stability factors

جدول ۱- مشخصات دو ژن تکثیر شده در قارچ عامل بلاست برنج با Real-time PCR.

Table 1- Specifications of rice blast amplified genes using Real-time PCR.

Gene Name نام ژن	Sequence توالی	PCR product size (bp) اندازه محصول PCR	GC content محتوای (گوانیدین- سیتوزین) %
Actin (اکتین)	AGGCCCATGTCTTCGAAATTTTTTGGCCATGATG TTGGTGTGTTGGGGGGAGGCATGTCTAAAACTG CAGGAAAAGTACGATGGTATTTGTCTTTAAGTA GTTCGGCGTTGTCGCGCGGAGAAACCGGGCAGG CGGACCACGTATTCGGGAGGTTGATGATACA	164	**50**
Superoxide dismutase (سوپراکسید دیسموتاز)	CTATTAGATGTCCCAGCGATGCCGAGAACAGCA TCTCTCCCGCCTTCTATTAGGGAATGGGCTTTAT CGAGGCTGACGGGACACTTGCCGCCGGCATGGG ATGTATAGACATAAAAACTGCTGTACCATGTTGT ACATGTAACATACCTTTTAAATGGAGAAGAACA GAACAAGGC	176	**47**

الگوهای متفاوتی از تنظیمات ترمودینامیک نزدیکترین همسایه برای محاسبه فاکتور پایداری قابل انتخاب است (Dwight, University of Utah). برای محاسبه فاکتور پایداری جفت باز (S) از معادلات پایداری Blake and Delcourt (1998) با یک نسخه تغییریافته از معادله استفاده شده است (فرمول ۲). تغییرات شامل کاتیون‌های تک ظرفیتی (SantaLucia *et al*., 1998)، یون Mg^{2+} آزاد (von Ahsen *et al*., 2001) و تنظیمات ترمودینامیکی است (Dwight, University of Utah).

$$S = \frac{e^{-(\Delta H - T \times \Delta S)}}{R \times T} \qquad (۲)$$

در این معادله پارامترهای ΔH آنتالپی و ΔS آنتروپی از یکی از چندین کتابخانه ترمودینامیکی برداشت شده است. T دمای مطلق و R ثابت بولتزمن است. پارامترهای آنتروپی برای غلظت‌های کاتیون تک ظرفیتی و Mg^{2+} تغییر می‌یابد (Dwight *et al*., 2011). سپس روابط بازگشتی مورد استفاده قرار می‌گیرد تا تمام پیکربندی های ممکن از مارپیچ[3] به حالت‌های ساختارهای تصادفی[4] و احتمالات آن‌ها حساب شود. مجموع این احتمالات، میزان مارپیچی بودن (فلورسانس) توالی بوده که در دمای مشخص شده به دست آمده است. در نهایت میزان مارپیچی بودن در برابر دمای مربوطه پیش‌بینی شده است (Dwight, University of Utah).

[3] Helix
[4] Random coil

منحنی‌های ذوب (شکل ۷- A) در حالت پیش‌بینی مارپیچی بودن[1] در مقابل دما نمایش داده می شود و پلات‌های حاصله با استفاده از مشتق منفی مارپیچی بودن نسبت به درجه حرارت محاسبه می‌شود (شکل ۷-B). غلظت نمک، حضور مواد متصل به DNA (مانند اتیدیدوم بروماید)، یونهای تک ظرفیتی، منیزیم آزاد، DMSO[2]، FBS[3] و پارامترهای دیگر مانند pH، منحنی ذوب را تحت تاثیر قرار می‌دهند. الگوریتم uMelt SM اجازه می دهد تا برخی از این پارامترها به منظور بهتر منعکس کردن محتویات مسترمیکس‌های تجاری مختلف بهینه‌سازی گردد (Facultad de Medicina UASLP, 2017).

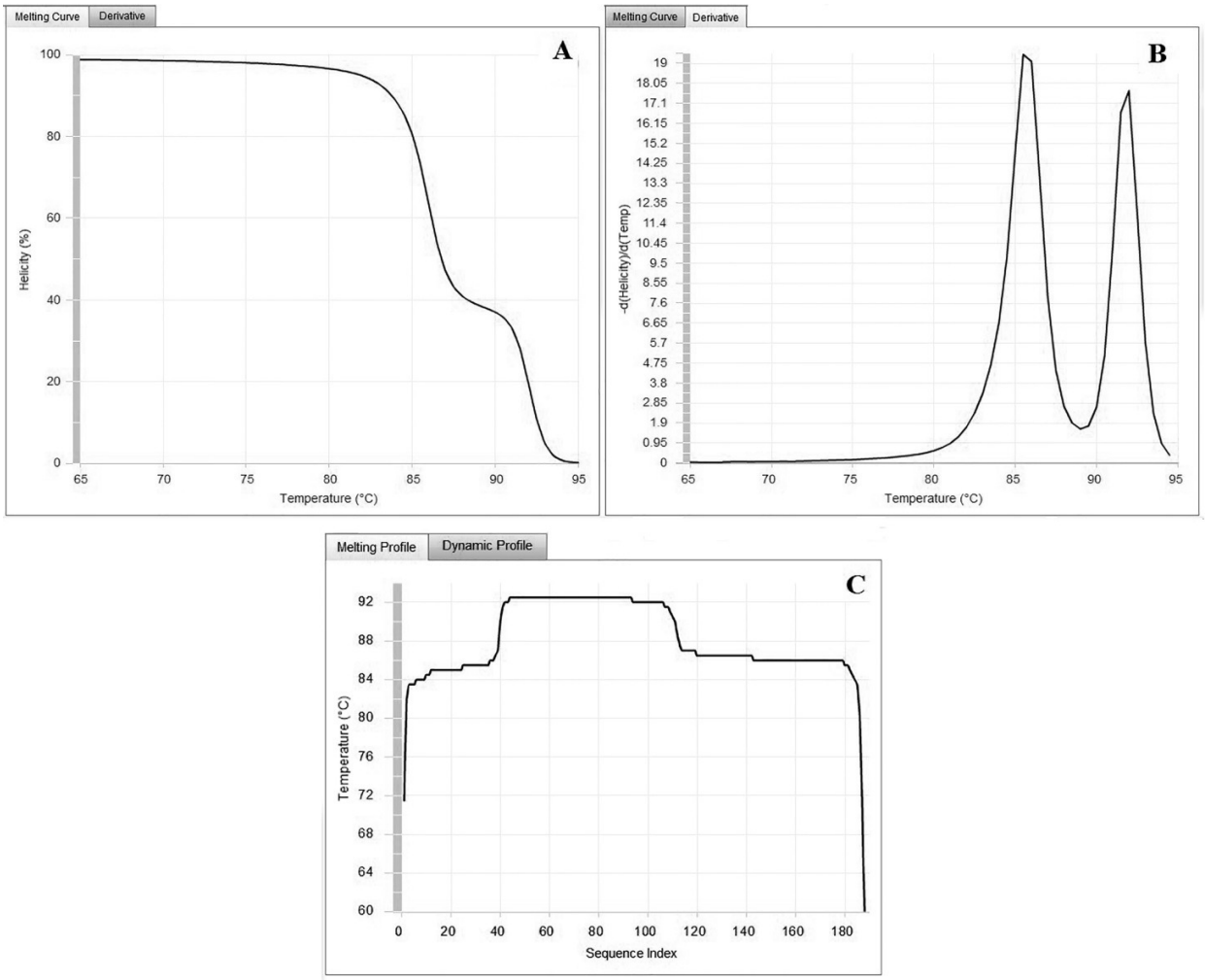
علاوه بر منحنی ذوب، نمودار مشتق شده و پروفیل استاتیک ذوب، دینامیکی از پروفیل ذوب ارائه شده است که تجسم تفکیک رشته با تغییر دما می‌باشد (شکل ۸).

همانطور که از نتایج منحنی ذوب دو ژن اکتین و سوپراکسید دیسموتاز از قارچ *Pyricularia oryzae* در مقایسه با منحنی پیش‌بینی شده مشخص است uMelt SM با پیش بینی منحنی ذوب محصولات PCR ، یک ابزار مناسب برای طراحی و بهینه‌سازی آزمایشات ذوب با وضوح بالا را فراهم می‌کند (شکل ۹). نتایج ژل آگارز هم اختصاصی بودن قطعات تکثیر شده را تأیید می‌نماید (شکل ۱۰). اما با این تطابق لزوماً نیازی به ژل نیست و این نرم‌افزار می‌تواند سبب صرفه‌جویی در زمان، مواد و تلاش در بخش تجربی گردد.

این آزمایش با دستگاه شرکت Applied biosystem مدل StepOne و با کیت SYBR Green انجام شد و دمای ذوب آزمایش برای ژن اکتین و سوپراکسید دیسموتاز به ترتیب ۷۹/۹۲ °C و ۸۰/۸۲ °C بوده که میزان تخمینی آن با uMelt SM، ۸۰ °C و ۸۰/۷۵ °C بدست آمد.

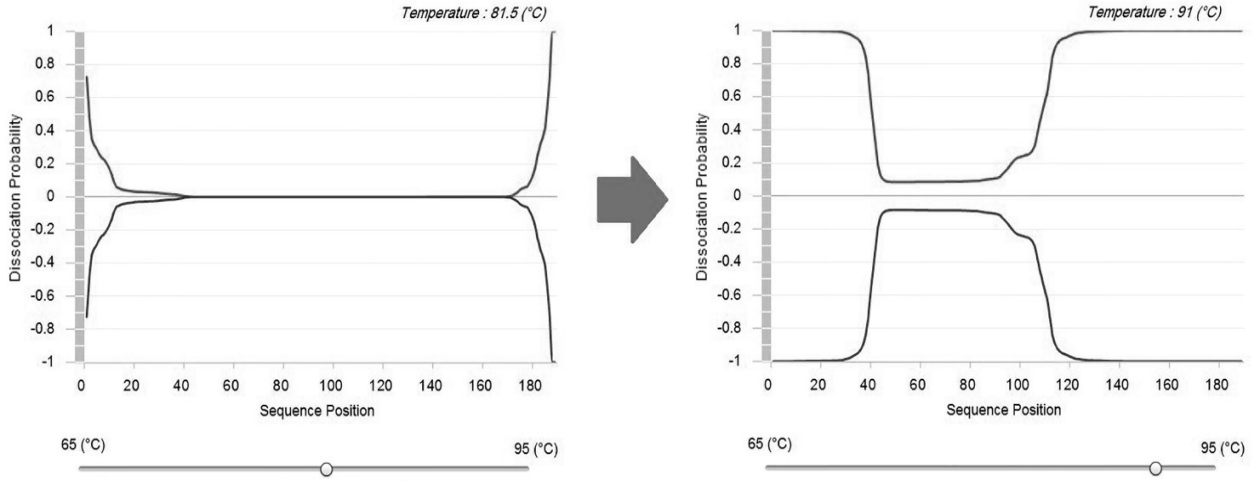
دمای ذوب تخمینی ممکن است تا حدودی با منحنی ذوب دستگاه ABI7500 متفاوت باشد، این تغییرات با EvaGreen بین ۰/۱ تا ۰/۳ و با SYBR Green بین ۰/۲ تا ۱/۴ درجه سانتی‌گراد مشخص شده است (Facultad de Medicina UASLP, 2017). وجود اختلاف بین دمای ذوب حاصل از دستگاه و دمای ذوب تخمینی با نرم افزار، در محدوده مقادیر عنوان شده قابل قبول می‌باشد.

[1] Helicity
[2] Dimethyl sulfoxide
[3] Fetal Bovine Serum



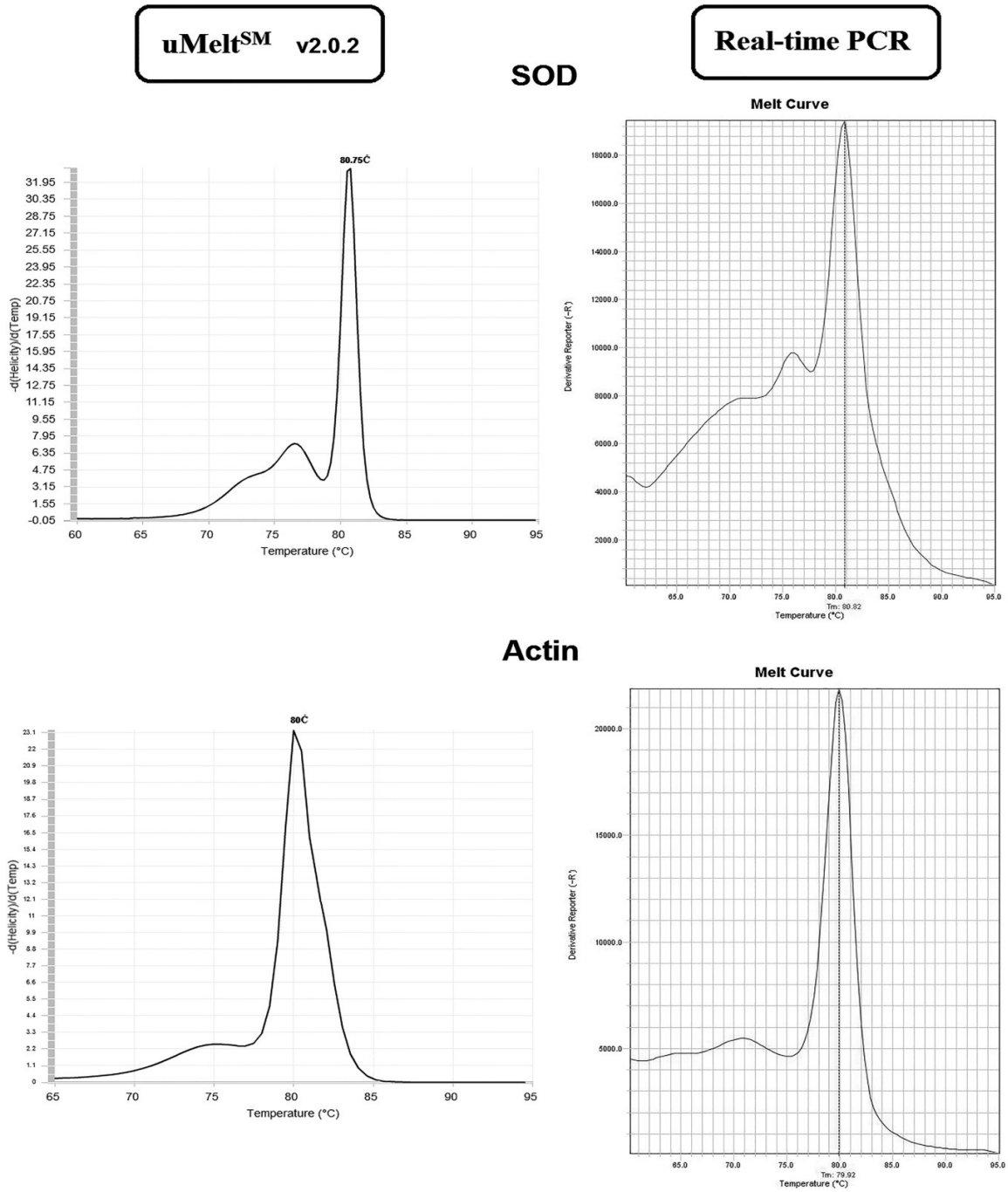
شکل۷- A) منحنی ذوب: دما و فلورسانس. B) مشتق: دما و[(دما)d/(مارپیچی بودن)d-] . C) پروفیل ذوب: شاخص توالی و Tm.

Figure 7- A) Melting curve: temperature and fluorescence. B) Derivative: Temperature and -d(Helicity)/d(Temperature). C) Melting Profile: Sequence Index and Tm.



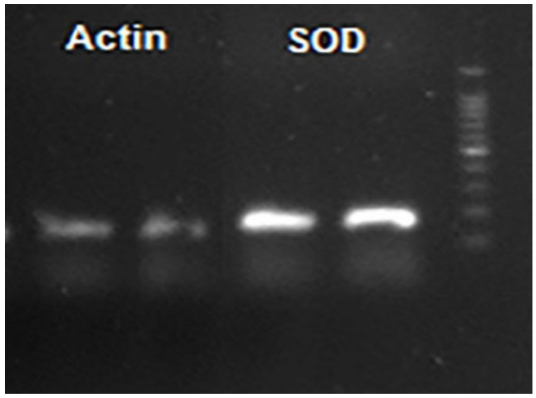
شکل۸- پروفیل دینامیکی ذوب.

Figure 8- Dynamic melting profile.



شکل ۹- تطابق منحنی ذوب پیش بینی شده توسط uMelt SM و منحنی ذوب آزمایش برای ژن‌های اکتین و سوپراکسید دیسموتاز در قارچ *Pyricularia oryzae*.

Figure 9- Matching the uMelt SM predicting melting curve and the experiment melting curve for *actin* and *superoxide dismutase* genes in *Pyricularia oryzae* fungus.



شکل ۱۰- نمونه محصولات qPCR روی ژل آگارز ۱ درصد برای ژن‌های اکتین و سوپراکسید دیسموتاز با نشانگر اندازه مولکولی ۱۰۰bp.

Figure 10- Samples of qPCR products on a 1% agarose gel for the *Actin* and *SOD* genes as compared with the 100 bp Ladder.

منابع

Blake RD, Delcourt SG (1998). Thermal stability of DNA. Nucleic Acids Research 26: 3323–3332.

Blake RD, Bizzaro JW, Blake JD, Day GR, Delcourt SG, Knowles J, Marx KA, SantaLucia J (1999). Statistical mechanical simulation of polymeric DNA melting with MELTSIM. Bioinformatics (Oxford, England) 15: 370–375.

Blossey R, Carlon E (2003). Reparametrizing the loop entropy weights: effect on DNA melting curves. Physical Review E 68: 061911.

Capote N, Pastrana AM, Aguado A, Sánchez-Torres P (2012). Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. Plant Pathology, InTech, pp. 151-202.

Crothers DM (1968). Calculation of melting curves for DNA. Biopolymers 6: 1391–1404.

Downey N (2014). Interpreting melt curves: An indicator, not a diagnosis. DECODED Newsletter, from http://www.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/core-concepts/decoded/2014/01/20/interpreting-melt-curves-an-indicator-not-a-diagnosis.

Dwight Z, uMelt Technical Guide v2.0, University of Utah, Wittwer DNA Lab, from http://www.dna.utah.edu/

Dwight Z, Palais R, Wittwer CT (2011). uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. Bioinformatics 27: 1019–1020.

Gotoh O (1983). Prediction of melting profiles and local helix stability for sequenced DNA. Advance Biophysics 16: 1–52.

Markham NR, Zuker M (2005). DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. Nucleic Acids Research 33: W577–W581.

Mehdizadeh, V., Nassaghusseini, S M., Safaei, N., Saidi, A., NCBI: A Comprehensive Guide. Agricultural Education and Extension Publication. 186 pages. Tehran, Iran.2013.

Primrose SB, Twyman RM (2001). Old RW Principles of Gene Manipulation, Blackwell Publishing Company.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer, CT (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Analytical Biochemistry 245: 154-160.

SantaLucia J (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest neighbor thermodynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences 95: 1460-1465.

Steger G (1994). Thermal denaturation of double-stranded nucleic acids: prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction. Nucleic Acids Research 22: 2760–2768.

Tøstesen E, Liu F, Jenssen TK, Hovig, E (2003). Speed-up of DNA melting algorithm with complete nearest neighbor properties. Biopolymers 70: 364–376.

University of Utah, Department of pathology, Why Use uMELT?, from https://www.dna.utah.edu/umelt/um_gel.html

von Ahsen N, Wittwer CT, Schutz E (2001). Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg(2+), deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. Clinical Chemistry 47: 1956-61

Zimm BH (1960). Theory of “Melting” of the helical form in double chains of the DNA type. The Journal of Chemical Physics 33: 1349–1356.

Application of uMelt SM algorithm in Real-time PCR melting curve analysis

Kharabi Masooleh A.[1], Saidi A.[2*]

[1]MSc of Agricultural Biotechnology, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, G.C. Velenjak, Tehran, Iran.
[2]Professor, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, G.C. Velenjak, Tehran, Iran.

Abstract

One of the challenges in interpreting the results obtained in qPCR is to make sure the amplicons are specific and that the melting curve analysis is used to examine it. Additional peaks in the melting curve is not always indicative of a problem, for this purpose, in this paper, a web-based tool called uMelt SM is suggested to researchers as a practical and simple way for the correct analysis of the melting curve which provides the possibility of predicting the DNA melting curve and denaturation profiles of the high-fluorescence resolution of PCR products. The results of this study showed that the melting curves were generated based on parameters were generated and an appropriate algorithm for working with this software was presented. Finally, *actin* and *superoxide dismutase* genes from *Pyricularia oryzae* were presented as a suitable model for determining the predicted curve using this software and Real-Time PCR curve was also drawn. Results of the uMelt SM predicted melting curves showed a high degree of compliance with the real-time PCR melting curves, which confirms the advantages of ease of use, saving time, cost, and effort in the experimentalist part when using uMelt SM software.

Keywods: *qPCR, melting curve, experiment, predict, uMelt*^{SM}.

* Corresponding Author: Saidi A. Tel: +982129903244 Email: abbas.saidi@gmail.com