مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

چند شکلی ژن پروتئین پرایون (PrP) با استفاده از تکنیک PCR-SSCP و تعیین توالی مستقیم در گوسفندان نژاد ایرانی قزل، هرکی و ماکویی

وحید دانش*[1]، سید حسن حافظیان[2]، قدرت الله رحیمی میانجی[3]، ایوب فرهادی[4]

[1] دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[2] دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[3] استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[3] استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۰۵/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۰٤

چکیده

اسکراپی یا بیماری انسفالوپاتی های اسفنجی شکل قابل انتقال (TSE) یک بیماری عفونی کشنده گوسفند و بز است که روی سیستم عصبی مرکزی حیوان تاثیر می گذارد. در این پژوهش، از ۳۰۰ راس گوسفند نژاد بومی قزل، ماکویی و هرکی نمونه های خون جمع آوری و با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی یک قطعه ۱۷۳ جفت بازی از اگزون سه ژن پروتئین پرایون تکثیر شد. با استفاده از تکنیک PCR-SSCP الگوی باندی برای هر یک از نمونه ها در جمعیت مورد مطالعه شناسایی و بعد از توالی یابی چند شکلی های مشاهده شده در کدون های ۱۳٦، ۱٥٤ و ۱۷۱ آنالیز و مقایسه آن بین نژادهای مختلف انجام گرفت. در این مطالعه دو هاپلوتایپ ARR و ARQ شناسایی شد که بیشترین فراوانی مربوط به هاپلوتایپ حساس به اسکراپی (ARQ) بود. بیش از ۹۸ درصد نمونه ها با داشتن ژنوتیپ ARQ/ARQ در دسته گوسفندان با مقاومت پائین نسبت به این بیماری قرار گرفتند. سه چند شکلی جدید L178, E147 و L173برای اولین بار در جهان در این مطالعه مشاهده شد. مقایسه فراوانی هاپلو ژنوتیپی بین نژاد های ماکویی- قزل و ماکویی- هرکی از نظر آماری معنی دار بود (P<۰/۰۵). اطلاعات بدست آمده در این پژوهش شاید بتواند برای برنامه های اصلاحی جهت کنترل این بیماری در جمعیت گوسفندان ایران موثر باشد.

واژه های کلیدی: *گوسفندان نژاد بومی، اسکراپی، ژن پروتئین پرایون، چند شکلی، PCR-SSCP.*

* نویسنده مسئول: وحید دانش تلفن: ۰۹۱٤۳٤۳٦۱۰٤ Email: v.danesh@yahoo.com

مقدمه

نگهداری و پرورش گوسفند در ایران به منظور تامین گوشت، شیر، پوست و الیاف پشمی انجام می شود (Sajadi Zarjani *et al*., 2015). در گوسفندداری برای افزایش راندمان تولید، اصلاح دام نقش اساسی از جمله در کنترل بیماری ها ایفا می‌کند. به منظور به حداقل رساندن سرمایه گذاری و افزایش بازدهی، در برنامه های اصلاح نژادی می توان از روش‌های جدید ژنتیک مولکولی بهره گرفت. تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به عنوان یکی از اجزای مهم پروژه‌های اصلاحی می‌باشند. چراکه یک گونه بدون تنوع ژنتیکی کافی قادر به سازگاری با تغییرات محیطی و مبارزه با انگل‌ها و رقیب‌ها نیست (Askari *et al*., 2011). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Shojaei *et al*., 2010). بیماری پرایون از بیماری های مهمی است که اخیرا محققین با استفاده از روش های جدید ژنتیک مولکولی توانسته اند به نتایج خوبی در اصلاح وکنترل گله نسبت به این نوع بیماری برسند. تمام بیماری‌های پرایونی شناخته شده در مجموع انسفالوپاتی‌های اسفنجی شکل قابل انتقال (TSEs)[1] نامیده می‌شوند که در انسان و حیوانات رخ داده و غیر قابل درمان و کشنده اند. این بیماری در انسان به نام بیماری کروتزفلد یاکوب (CJD)[2] در گاو انسفالوپاتی اسفنجی شکل گاوی (BSE)[3] و در گوسفند به نام بیماری اسکراپی معروف شده است (Dalsgaard, 2002).

اسکراپی بیماری کشنده ای است که روی سیستم اعصاب مرکزی تاثیر می گذارد و برای اولین بار در اروپا شناسایی شد (Prusiner, 1982). در گوسفند مبتلا به این بیماری در سیستم اعصاب مرکزی حیوان حالت ایزوفرم پروتئین پرایون که در حالت عادی یافت نمی شود تجمع می یابد. اسکراپی در گوسفندان ابتدا باعث کاهش تولید شیر و ضعیف شدن حیوان شده و سپس مرگ حیوان را به دنبال دارد. اگر در تغذیه نشخوارکنندگان از بافت های گوسفندان مبتلا به اسکراپی استفاده شود باعث بیماری BSE یا جنون گاوی در حیوان شده و از آن طریق به انسان منتقل می شود. ژن پرایون به طول ۳۱٤۱۲ باز جفت روی کروموزوم ۱۳ گوسفند قرار گرفته و از ۳ اگزون و ۲ اینترون تشکیل شده است. بخشی از اگزون سه به اندازه حدود ۷٦۸ جفت باز مهمترین بخش این جایگاه ژنی در ارتباط با این بیماری به حساب می آید. چرا که در ۳۵ کدون متفاوت از این اگزون بیش از ۵۰ موتاسیون (SNP) مشاهده شده است (Alvarez *et al*., 2011). اما اعتقاد بر این است که موتاسیون در کدون های ۱۳٦، ۱۵٤ و ۱۷۱ باعث حساسیت و یا مقاومت حیوان به اسکراپی می شود. در هر

[1] Transmissible Spongiform Encephalopathies

[2] Creutzfeldt-Jakob Disease

[3] Bovine Spongiform Encephalopathy

یک از کدون های ۱۳٦ اسید های آمینه آلانین (A) و یا والین (V)، کدون ۱٥٤ آرژنین (R)، هیستیدین (H) و یا تریپتوفان (W) و در کدون ۱۷۱ آرژنین (R)، هیستیدین (H) و یا گلوتامین (Q) مشاهده شده است. ترکیبات متفاوت این اسید آمینه ها هاپلوتیپ های مختلفی شامل (ARR, ARQ, AHQ, ARH, VRQ) را به عنوان ترکیبات معمول در نژادهای مختلف گوسفند به وجود می آورد(Dawson *et al.*, 1998; Hunter, 2007). اگر چه بین نژادهای مختلف تفاوت وجود دارد ولی به طور کلی پذیرفته شده است که هاپلوتیپ ARR (آلانین در کدون ۱۳٦، آرژنین در کدون ۱٥٤ و آرژنین در کدون ۱۷۱) مقاوم به اسکراپی بوده و گوسفندان با هاپلو ژنوتیپ هموزایگوس ARR/ARR نسبت به این بیماری مقاومت بالایی دارند (Hunter *et al.*, 1994). هاپلوتیپ VRQ (والین در کدون ۱۳٦، آرژنین در کدون ۱٥٤ و گلوتامین در کدون ۱۷۱) آسیب پذیر بوده و گوسفندان حامل هاپلو ژنوتیپ هموزایگوس VRQ/VRQ حساسیت بالای نسبت به اسکراپی دارند (Hunter *et al.*, 1994). چند شکلی در کدون ۱٥٤ و ارتباط آن با بیماری اسکراپی در بعضی از کشورها از جمله در آمریکا زیاد مورد توجه نبوده اگر چه نقش آن در رشد و پیشرفت این بیماری به وضوح مشخص شده است (Baylis & McIntyre, 2004). در مطالعات انجام شده علاوه بر ٥ آلل ذکر شده تعدادی آلل نادر نیز در ارتباط با این بیماری شامل ARK و TRQ, AHR, VRR, ALQ شناسایی شده اند (Alvarez *et al.*, 2006; Billinis *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2003; Gombojav *et al.*, 2003; Luhken *et al.*, 2008). نقش این نوع از آلل ها و ارتباط آنها در حساسیت یا مقاومت به بیماری هنوز به طور کامل مشخص نشده است (Ekateriniadou *et al.*, 2007). ژنوتیپ‌های متفاوت نسبت به اسکراپی حساسیت های متفاوتی را نشان می-دهند. به همین دلیل میزان حساسیت گوسفندان به اسکراپی را به پنج گروه به صورت R1-R5 تقسیم بندی می کنند. این گروه بندی در طرح های ملی مربوط به بیماری اسکراپی که در کشور انگلیس انجام شد، به عنوان یک شاخص مبنا قرار گرفته است. به کمک این تقسیم بندی انتخاب به منظور مقاومت به اسکراپی در گله های گوسفند انجام می یابد. به همین دلیل تا به حال در کشورهای مختلف تحقیقات زیادی به منظور ارزیابی مقاومت گوسفندان بومی به اسکراپی در قالب شناسایی چند شکلی در جایگاه ژنی پروتئین پرایون در ۳ کدون ۱٥٤،۱۳٦ و ۱۷۱ انجام گرفته است (Dawson *et al.*, 1998). با توجه به این که در مطالعات انجام شده هیچ ارتباطی بین ژن عامل بیماری پرایون و ژن هایی که در تولید و عملکرد حیوان نقش دارند یافت نشده است (Sweeney & Hanrahan, 2008) و نیز به دلیل مشخص شدن ارتباط بین آلل های جایگاه ژنی پروتئین پرایون (PRNP) و حساسیت به بیماری اسکراپی، باعث شده که برنامه های

اصلاحی در جهت افزایش فراوانی هاپلوتیپ مقاوم ARR و کاهش هاپلوتیپ حساس VRQ در گله های گوسفندان به کار برده شود (Dawson *et al*., 1998; European Commission, 2003). بنابراین، انتخاب حیواناتی که بیشترین مقاومت را نسبت به این بیماری از خود نشان میدهند میتواند ما را در رسیدن به این هدف یاری کند. نژادهای بومی در هر کشور به عنوان یک سرمایه ملی و محصولی استراتژیک در اقتصاد و رونق آن کشور محصوب می شود (Vajed Ebrahimi *et al*., 2015). با توجه به اینکه مطالعات زیادی در ارتباط با شناسایی چند شکلی ژن PRNP در گوسفندان نژاد بومی ایران انجام نشده است، هدف ما در این پژوهش ارزیابی ژنتیکی ژن پروتئین پرایون در سه نژاد گوسفند بومی هرکی، قزل و ماکویی ایران با استفاده از نشانگر PCR-SSCP و تعیین توالی بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه خون و استخراج DNA

در این پژوهش در مجموع از ۳۰۰ گوسفند نژادهای ماکویی، قزل و هرکی (از هر نژاد ۱۰۰ راس) نمونه خون به طور تصادفی جمع آوری شد. نمونه خون های ماکویی و قزل از ایستگاه های اصلاح نژاد ماکویی و قزل استان اذربایجان غربی و هرکی از روستاهای اطراف شهرستان های ارومیه و اشنویه جمع آوری شد. خونگیری از ناحیه ورید گردن و با استفاده از لوله های خلاء حاوی ماده ضد انعقاد خون (EDTA) انجام گرفت. با استفاده از روش نمکی بهینه یافته DNA استخراج شد (Miller *et al*., 1988) و از روش الکتروفورز روی ژل آگارز جهت تعیین کیفیت و کمیت DNA های استخراجی استفاده شد.

واکنش زنجیره پلیمراز

در این پژوهش از اگزون ۳ جایگاه ژنی پرایون یک قطعه ۱۷۳ جفت بازی جهت تکثیر انتخاب شد. این بخش با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی با توالی رفت، 5'-GGTGGCTACATGCTGGGAAGT-3' و توالی برگشت، 5'-GTGATGTTGACACAGTCATGCAC-3' مورد تکثیر قرار گرفت (Zhou *et al*., 2005). واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از دستگاه PCR (ABI 2720، آمریکا) و حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر (۱۵۰ نانوگرم) DNA، ۳ میلی مولار MgCl2، ۰/۵ میکرولیتر (۵۰ پیکومول) از هریک از آغازگرها، ۰/۵ میکرولیتر (۱۰۰ میلی مولار) dNTPs، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR با غلظت 1X (۱۰ میلی مولار تریس، ۵۰ میلی مولار کلرید پتاسیم، ۰/۱ ٪ ژلاتین، ۸/٤ :pH) انجام شد.. برنامه دمایی تکثیر این جایگاه شامل ۳۵ چرخه حرارتی به صورت، ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشته شدن اولیه دو رشته DNA، ۹۵ درجه سانتیگراد به

مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشته شدن دو رشته DNA در چرخه، ٦۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال آغازگرها و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ٤٥ ثانیه برای تکثیر و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه برای بسط نهایی انجام گرفت. صحت تکثیر محصولات PCR توسط ژل آگارز ۲ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید آزمون و سپس تصویر باندها با استفاده از دستگاه عکس برداری از ژل ثبت شد.

تعیین ژنوتیپ

از آنالیز SSCP برای شناسایی هاپلوتیپ-های مختلف در جایگاه ژنی پرایون (از نظر ترادف اسیدهای نوکلئیک) استفاده شد. در این آنالیز مقدار ۳ میکرولیتر محصول PCR به همراه ۷ میکرولیتر بافر بارگذاری SSCP (۹۸ ٪ فرمامید، ۱۰ میلی مولار EDTA، ۰/۰۲۵ برمو فنول بلو، زایلان سیانول) با هم مخلوط و در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه واسرشت سازی محصول PCR انجام و نمونه به سرعت روی یخ منتقل شدند. سپس نمونه ها روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد (اکریل آمید: بیس اکریل آمید= ۳۸/۵ : ۱) در دمای ۵ درجه سانتی گراد به مدت ١٦ ساعت با ولتاژ ثابت ۳۰۰ ولت و با استفاده از بافر تانک TBE 1X الکتروفورز شدند. رنگ آمیزی نیترات نقره انجام و سپس تصویر باندها با استفاده از دستگاه عکس برداری از ژل ثبت شد (Byun *et al.*, 2009). در ادامه ژنوتیپ نمونه ها با مشاهده مستقیم باندها از روی ژل و محاسبه نسبت آنها از کل و فراوانی های مورد انتظار با استفاده از نسبت های تعادل هاردی – واینبرگ محاسبه شد. نمونه های مورد بررسی بر اساس الگوی باندی به گروه های مختلف هاپلو ژنوتیپی تقسیم و برای آگاهی از توالی این الگوهای باندی خصوصا در کدون های با اهمیت، از هر گروه هاپلو ژنوتیپی یک نمونه به عنوان نماینده و جهت تایید صحت و همچنین مشخص نمودن تنوع موجود در این جمعیت برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره ارسال شد. در مقایسه فراوانی آللی و ژنوتیپی جایگاه ژنی پرایون در بین سه نژاد به ترتیب از آزمون دقیق فیشر و روش مربع کای استفاده شد. همه مقایسات ذکر شده با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گرفت (SAS, SAS/STAT. 2006).

مقایسه توالی ها و دسته بندی هاپلوتیپ ها

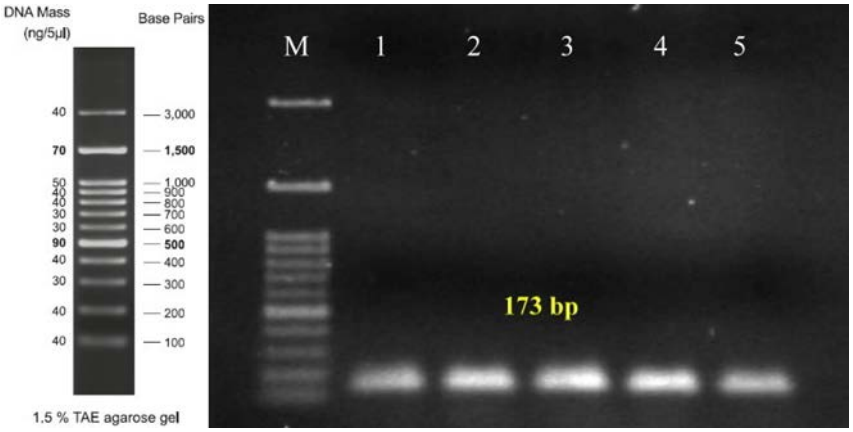
توالی ها با کمک نرم افزار BioEdit نسخه ۷/۰/۹/۰ مورد ارزیابی و مقایسه چند تایی با استفاده از رویه CLUSTALW انجام شد و سپس هاپلوتیپ های متناظر با هر یک از گروه های هاپلو ژنوتیپی نام گذاری شدند.

نتایج و بحث

در پژوهش حاضر یک قطعه ۱۷۳ جفت بازی از اگزون ۳ جایگاه ژنی پرایون با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی جهت بررسی چند

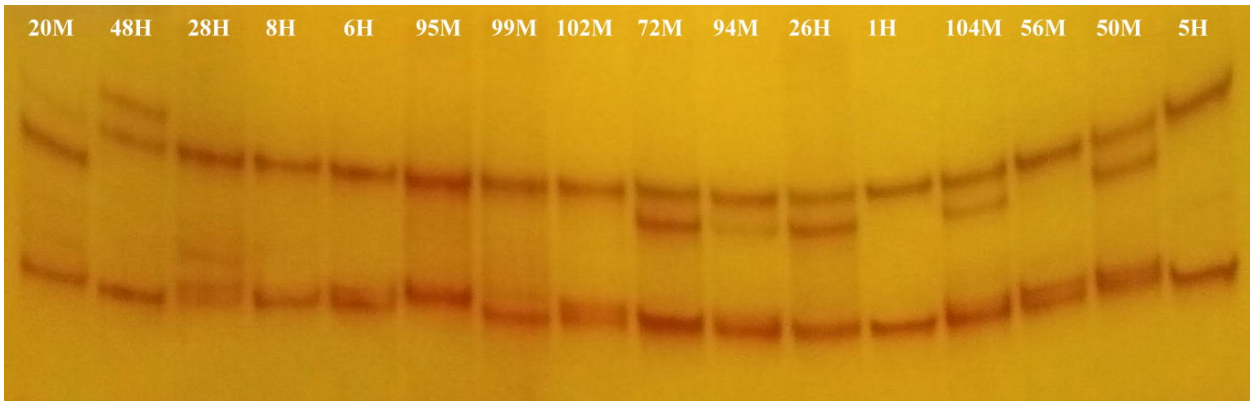
شکلی در مهمترین کدون ها در میزان حساسیت یا مقاومت نسبت به بیماری اسکراپی (کدون های ۱۳٦، ۱٥٤ و ۱۷۱) تکثیر داده شد. نمونه ای از تکثیر پس از الکتروفورز در ژل آگارز در شکل ۱ نشان داده شده است.

جهت شناسایی چند شکلی در بین نژادهای مورد پژوهش از تکنیک PCR-SSCP استفاده شد. نتایج حاصل ۸ الگوی باندی منحصر به فرد را نشان داد. از هر الگوی باندی یک نمونه به عنوان نماینده جهت تعیین توالی فرستاده شد (شکل ۲).



شکل ۱- تکثیر اگزون ۳ جایگاه ژنی پرایون در گوسفندان نژاد ماکویی، قزل و هرکی.

Figure 1- Amplification exon 3 prion locus in Ghezel, Harki and Makoei sheep breeds.



شکل ۲- الگوی باندی حاصل از آنالیز SSCP در گوسفندان نژاد ماکویی، قزل و هرکی.

Figure 2- SSCP banding pattern analysis in Ghezel, Harki and Makoei sheep breeds.

ارزیابی ژنتیکی ژن پرایون در نمونه های پژوهش حاضر، چند شکلی را فقط در جایگاه ۱۷۱ (R/Q) نشان داد. جایگاه ۱۳٦ و ۱٥٤ بدون تغییر ژنتیکی و در همه نمونه ها به ترتیب به صورت هموزیگوت AA و RR مشاهده شد. در مجموع دو آلل ARR و ARQ و ۲ هاپلو ژنوتیپ ARR/ARQ و ARQ/ARQ مشاهده شد. در محاسبه فراوانی ها، وفور آلل ARR با میانگین تقریبی ۲ درصد و ARQ با میانگین ۹۸ درصد و نیز فراوانی هاپلو ژنوتیپ ARR/ARQ با ۱/۵ درصد و ARQ/ARQ با ۹۸/۵ درصد در ۳ جایگاه ژنی ۱۳٦، ۱٥٤ و ۱۷۱ ژن پرایون بدست آمد. بر اساس چند شکلی در کدون های ۱۳٦، ۱٥٤ و ۱۷۱ گوسفندان را بر اساس میزان در خطر بودن هاپلو ژنوتیپ ها نسبت به بیماری اسکراپی به ۵ گروه اصلی R_5 –R_1 تقسیم بندی کردند (Dawson *et al*., 1998). این گروه بندی به عنوان پایه ای در طرح های ملی مربوط به کنترل و ریشه کنی بیماری اسکراپی که در بریتانیا (NSP, DEFRA.2007) پایه گذاری شده است، مورد توجه قرار گرفته است.

هاپلوژنوتیپ‌های بدست آمده از این پژوهش با گروه های جدول ۱ مقایسه شد. از دو هاپلو ژنوتیپ مشخص شده در این پژوهش (ARR/ARQ, ARQ/ARQ) هاپلو ژنوتیپ ARQ/ARQ با فراوانی ۹۸/۵ درصد در گروه R_3 جدول قرار گرفت که این گروه نسبت به بیماری اسکراپی مقاومت کمی دارند. با توجه به این مقایسه، می توان نتیجه گرفت که گوسفندان نژاد هرکی، قزل و ماکویی نسبت به این بیماری مقاومت کمی دارند. هاپلو ژنوتیپ ARR/ARQ که در گروه مقاوم نسبت به بیماری اسکراپی است با فراوانی ۱/۵ در دو نژاد ماکویی و قزل شناسایی شد. نژاد هرکی در بین نمونه های مورد مطالعه در این پژوهش فاقد هاپلو ژنوتیپ مقاوم به اسکراپی (ARR/ARQ) بود. با توجه به این که ۹۸/۵ درصد از نمونه ها ژنوتیپ ARQ/ARQ داشتند، می توان گفت درصد خیلی بالایی از این نمونه ها خطر ابتلا به بیماری اسکراپی را در صورت مواجه با این بیماری دارند. باید توجه داشت که ژنوتیپ های مقاوم به اسکراپی نیز همیشه مقاوم به اسکراپی گزارش نشده است. در موارد خیلی نادر در حیوانات با ژنوتیپ ARR/ARR نیز ابتلا به بیماری گزارش شده است (Alvarez *et al*., 2011; Groschup *et al*., 2007). شناسایی چند شکلی در جایگاه ژن پرایون در بسیاری از نژاد های گوسفند ایرانی و خارجی مورد پژوهش قرار گرفته است (Babar *et al*., 2009; Luhken *et al*., 2008; Meydan *et al*., 2013; Tsunoda *et al*., 2009; Zheng *et al*., 2004). تا به حال با توجه به پژوهش های انجام شده قبلی و مطالعه اخیر مشخص شده که نژاد های بومی ایرانی نسبت به این بیماری مقاومت کمتری دارند. در بیشتر پژوهش های انجام شده در این جایگاه، مشابه پژوهش ما

بیشترین وفور ژنوتیپی را ARQ/ARQ گزارش داده اند. ژنوتیپ ARR/ARQ نیز در مطالعات قبلی همانند پژوهش مورد مطالعه ما با وفور کم تر نسبت به ژنوتیپ ARQ/ARQ گزارش شده است.

جدول ۱- تقسیم بندی گروه های هاپلو ژنوتیپی در ژن پروتئین پرایون بر اساس میزان مقاومت / حساسیت به بیماری اسکراپی

Table 1- Haplogenotype classification in the prion protein gene based on resistance / susceptibility to scrapie disease.

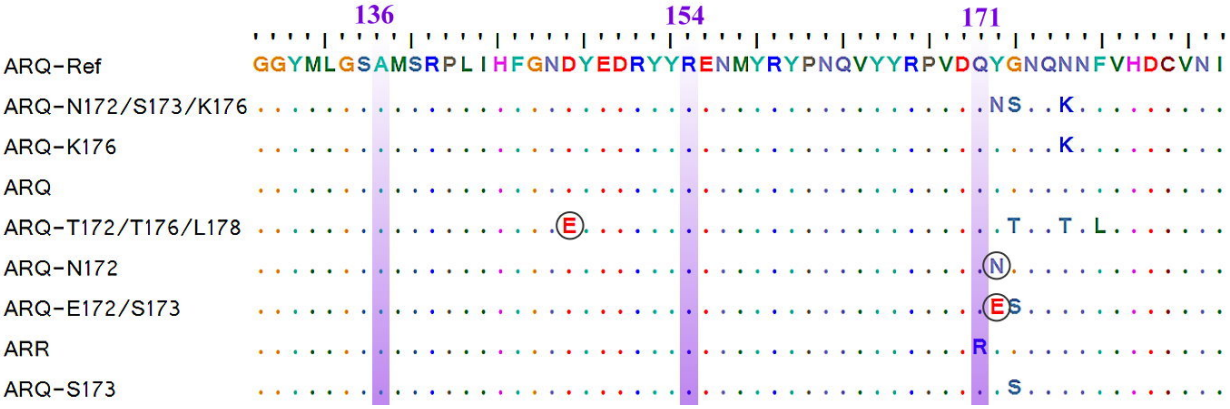
Groups گروه ها	Haplogenotype هاپلو ژنوتیپ ها	Function عملکرد
R_1	ARR/ARR	مقاومت بالا High Resistance
R_2	ARR/AHQ, ARR/ARH, ARR/ARQ	مقاوم Resistant
R_3	ARQ/ARH,ARQ/AHQ, AHQ/AHQ, ARH/ARH, AHQ/ARH, ARQ/ARQ	مقاومت کم Low Resistance
R_4	ARR/VRQ	حساس Susceptibility
R_5	AHQ/VRQ, ARH,VRQ, ARQ/VRQ, VRQ/VRQ	حساسیت بالا High Susceptibility

در مطالعه جایگاه ژنی پروتئین پرایون در دو نژاد گوسفند ایرانی بلک و آرمان چهار هاپلوتیپ ARR, ARH, AHQ, ARQ مشخص شد. هاپلوتیپ ARQ با میانگین وفور ۷٤/۵ درصد و هاپلو ژنوتیپ ARQ/ARQ با میانگین وفور ۵۹ درصد به ترتیب بیشترین فراوانی هاپلوتیپی و هاپلو ژنوتیپی را در جمعیت مورد مطالعه نشان دادند. با توجه به نتایج به دست آمده بیش از ۷۰ درصد از گوسفندان مورد مطالعه در دسته گوسفندان با مقاومت پایین (R3) قرار گرفته اند (Moradi *et al*., 2013). در پژوهش دیگری سه نژاد ایرانی زل، نائینی و بلوچی مطالعه شده که هاپلوتیپ ARQ با میانگین ۰/۵۳ بیشترین فراوانی هاپلوتیپی و هاپلو ژنوتیپ ARQ/ARQ با میانگین ۳٦ درصد بیشترین فراوانی هاپلو ژنوتیپی را داشت (Moradi, 2012). مطالعه چند شکلی ژن پروتئین پرایون بین گوسفند نژاد عرب خوزستان نشان داده که ژنوتیپ مقاوم به اسکراپی (ARR/ARR) در نمونه های مورد مطالعه یافت نشده و بیشترین فرکانس ژنوتیپی به میزان ٤۳/۲

درصد مربوط به ARQ/ARQ بوده است. همچنین حساسترین ژنوتیپ به بیماری اسکارپی(VRQ/VRQ) در این تحقیق یافت نشد (Karami *et al.*, 2011). در پژوهشی که از ۵ نژاد شامل لری بختیاری، شال و زندی از ایران، لوسی و موکارامان از ترکیه برای شناسایی چند شکلی در این جایگاه ژنی استفاده شد، در هیچ یک از نژادهای ایرانی آلل های ARK و VRQ یافت نشد و آلل مقاوم به اسکراپی ARR در همه نژادها مشاهده شد. آلل نادر ARK در هر دو نژاد ترکیه و آلل ARL تنها در نژاد زندی ایرانی مشاهده شد. ژنوتیپ مقاوم به اسکراپی ARR/ARR در هیچ کدام از نژادها مشاهده نشد ژنوتیپ ARQ/ARQ با بیشترین وفور در بین همه نمونه ها و ژنوتیپ حساس به بیماری VRQ/VRQ فقط در نژاد موکارامان با فرکانس ۲/۷ درصد یافت شده بود (Frootan *et al.*, 2011). در این پژوهش علاوه بر چند شکلی‌های شرح داده شده ۸ چند شکلی (N172, S173, K176, E172, E147, T172, T176, L178) نیز مشاهده شد (شکل ۳). علاوه بر چند شکلی های ۳ کدون مذکور، چند شکلی های زیاد دیگری نیز (۸۳، ۳٤، ۱۱۲، ۱۱٦، ۱۲۷، ۱۳۸، ۱٤۱، ۱۷۲، ۱۷۵، ۱۷٦، ۱۸۰، ۱۸۹، ۱۹۵، ۱۹٦، ۲۱۱، ۲۳۷، ۲٤۱) در جایگاه اگزون ۳ ژن پرایون مورد شناسایی قرار گرفته است (Belt *et al.*, 1995; Bossers *et al.*, 1999; Elsen *et al.*, 1999; Tranulis *et al.*, 1999; Vaccari *et al.*, 2001). سه چند شکلی L178, E147 و L173 شناسایی شده در این پژوهش چندشکلی جدید بوده که در مطالعات قبلی گزارش نشده است. در ضمن در نمونه ARQ-E172/S173 و ARQ-N172 در جایگاه ۱۷۲ و ARQ-T172/T176/L178 در جایگاه ۱٤۷ (در شکل با علامت ○ مشخص شده) دارای ژنوتیپ هتروزیگوت می‌باشند.

ژنوتیپ ARQ/ARQ-S176 هم در نژاد ماکویی و هم نژاد قزل کمترین فراوانی را (۰/۰۱) داشت. در نژاد ماکویی این ژنوتیپ شناسایی نشد. سه ژنوتیپ ARR/ARQ, ARQ/ARQ و ARQ/ARQ-T172-T176-L178 در نژاد های ماکویی و قزل مشاهده نشد ولی در نژاد هرکی به ترتیب با نسبت های ۰/۰۳، ۰/۰۱ و ۰/۰۱ شناسایی شد. در بین گوسفندان قزل و هرکی ژنوتیپ ARQ/ARQ-N172-S173-K176 بیشترین فراوانی را داشتند. در نژاد ماکویی بیشترین فراوانی مشاهده شده مربوط به ژنوتیپ ARQ/ARQ-N172 بوده است. مقایسه فراوانی در هریک از جایگاه های شناسایی شده با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد (جدول ۲). نتایج نشان داد که وفور هاپلو ژنوتیپی بین گوسفندان ماکویی با قزل و ماکویی با هرکی تفاوت معنی داری وجود دارد ($P<0/0001$)، در صورتی که این مقایسه در بین گوسفندان نژاد هرکی و قزل ($P<0/13$) معنی دار نبود. در سال‌های اخیر روی چند نژاد ایرانی نیز پژوهش هایی انجام شده است. به خاطر واگیردار بودن و انتقال این بیماری به انسان و دام های دیگر و نیز تلفات زیادی که

تا کنون از این بیماری گزارش شده است لازم است تا اهمیت زیادی به پژوهش، کنترل و اصلاح این بیماری با حذف هاپلو ژنوتیپ های حساس به بیماری در بین نژاد های ایرانی انجام شود (Moradi *et al*., 2013; Moradi, 2012; Karami *et al*., 2011; Frootan *et al*., 2011). از آنجایی که بیشتر نمونه خون های استفاده شده در این مطالعه از مرکز اصلاح نژاد گرفته شد، پایین بودن تنوع ژنتیکی در این پژوهش، نسبت به مطالعات قبلی شاید به خاطر بالا بودن میزان هم خونی در این نمونه ها بوده است. لذا پیشنهاد می شود در مطالعات آتی ضمن افزایش تعداد نمونه ها توزیع جغرافیایی نمونه ها نیز مورد توجه قرار گیرد.



شکل ۳- نتایج آنالیز توالی پروتئینی ژن پرایون گوسفندی در جایگاه اگزون ۳.

Figure 3- The results of protein sequence analysis of sheep's prion gene in locus of exon 3.

جدول ۲- مقایسه فراوانی هاپلوژنوتیپی در بین نژاد ها در جایگاه ژنی PRNP.

Table 2- Compare haplogenotype frequency between the breeds of the PRNP locus.

نژاد Breeds	ARQ/ARQ-N172-S173-K176	ARQ/ARQ-N172	ARQ/ARQ-E172-S173	ARQARQ-K176	ARQ/ARQ-S176	ARR/ARQ	ARQ/ARQ	ARQ/ARQ-T172-T176-L178
قزل Ghezel	0.5	0.02	0.27	0.2	0.01	–	–	–
ماکویی Makoei	0.28	0.41	0.05	0.25	0.01	–	–	–
هرکی Harki	0.61	0.02	0.17	0.15	–	0.03	0.01	0.01
مجموع فراوانی هاپلوژنوتیپی در۳ نژاد Total haplogenotype frequency in 3 sheep breeds	0.46	0.15	0.16	0.2	0.0066	0.01	0.0034	0.0034

منابع

Alvarez L, Arranz JJ, San Primitivo F (2006). Identification of a new leucine haplotype (ALQ) at codon 154 in the ovine prion protein gene in Spanish sheep. Journal of Animal Science 84: 259–265.

Alvarez L, Gutierrez-Gil B, Uzun M, San Primitivo F, Arranz JJ (2011). Genetic variability in the prion protein gene in five indigenous Turkish sheep breeds. Small Ruminant Research 99: 93–98.

Askari N, Abadi MRM, Baghizadeh A (2011). ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iranian Journal of Biotechnology 9: 222-229.

Babar ME, Farid A, Benkel BF, Ahmad J, Nadeem A, Imran M (2009). Frequencies of PrP genotypes and their implication for breeding against scrapie susceptibility in nine Pakistani sheep breeds. Molecular Biology Reports 36: 561-565.

Baylis M, McIntyre KM (2004). Transmissible spongiform encephalopathies: scrapie control under new strain. Nature 432: 810–811.

Belt PB, Muileman IH, Schreuder BE, Bos-de Ruijter J. Gielkens AL, Smits MA (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. Journal of General Virology 76: 509-517.

Billinis C, Psychas V, Leontides L, Spyrou V, Argyroudis S, Vlemmas I, Leontides S, Sklaviadis T, Papadopoulos O (2004). Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. Journal of General Virology 85: 547–554.

Bossers A, Harders FL, Smits MA (1999). PrP genotype frequencies of the most dominant sheep breed in a country free from scrapie. Archives of Virology 144: 829-834.

Byun SO, Fang Q, Zhou H, Hickford JGH (2009). An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 385:174–175.

Dalsgaard NJ (2002). Prion diseases. An overview. Acta Pathologica, Microbiologica and Immunologica Scandinavica 110: 3–13.

Dawson M, Hoinville LJ, Hosie BD, Hunter N (1998). Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group. Veterinary Record 142: 623–625.

Ekateriniadou LV, Kanata E, Panagiotidis C, Nikolaou A, Koutsoukou E, Lymberopoulos AG, Sklaviadis T (2007). PrP genotypes in scrapie-affected sheep in Greece. The contribution of the AHQ 1 polymorphism. Small Ruminant Research 73: 142–149.

Elsen JM, Amigues Y, Schelcher F, Ducrocq V, Andréoletti O, Eychenne F (1999). Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. Archives of Virology 144: 431-445.

European Commission (2003). 2003/100/EC Commission decision laying down minimum requirements for the establishment of breeding programs for resistance to transmissible spongiform encephalopathies in sheep. Official Journal L041: 41–45.

Frootan F, Nikbakht GH, Özdemir Özgentürk N, Ün C (2011). Prion protein coding gene (PRNP) variability in sheep from Turkey and Iran. Biochem genet 50:277-284.

Gombojav A, Ishiguro N, Horiuchi M, Serjmyadag D, Byambaa B, Shinagawa M (2003). Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. Journal of Veterinary Medical Science 65: 75–81.

Groschup MH, Lacroux C, Buschmann A, Lühken G, Mathey J, Eiden M (2007). Classic scrapie in sheep with ARR/ARR prion genotype in Germany and France. Emerging Infectious Diseases journal 13: 1201-1207.

Guo X, Kupfer DM, Fitch GQ, Roe BA, Desilva U (2003). Identification of a novel lysine-171 allele in the ovine prion protein (PRNP) gene. Archives of Virology 34: 303–305.

Hunter N (2007). Scrapie: Uncertainties, biology and molecular approaches. Biochimica et Biophysica Acta 1772: 619–628.

Hunter N, Goldmann W, Foster JD, Cairns D, Smith G (1997). Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. Veterinary Record 141: 137–140.

Hunter N, Goldmann W, Smith G, Hope J (1994). The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. Archives of Virology 137: 171–177.

Karami M, Amirinia C, Emam Jome Kashan N, Amirmozafari N, Chamani M, Banabazi MH (2011). Polymorphisms of the prion protein gene Arabi sheep breed in Iran. African Journal of Biotechnology 10: 15819-15822.

Luhken G, Lipsky SH, Peter CH, Erhardt G (2008). Prion protein polymorphisms in autochthonous European sheep breeds in respect to scrapie eradication in affected flocks. Small ruminant research 75: 43–47.

Meydan H, Özkan M, Yıldız M (2013). Genetic risk assessment for atypical scrapie in Turkish native sheep breeds. Small Ruminant Research 111: 16– 22.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16: 1215.

Moradi N (2012). Identification of susceptible and resistant allelic forms of prion protein gene to scrapie disease in Zel, Naini and baluchi sheep breeds. MSc Thesis. Agriculture Sciences and Natural Resources University of Sari. Mazandran, Iran.

Moradi N, Rahimi G, Deldar H (2013). Detection of susceptible and resistant allelic forms to scrapie disease in prion protein locus in iran black and arman sheep breeds. Research on Animal Production 8: 78-90.

Prusiner SB (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science 216: 136-144.

Sajadi zanjani S, Bahreini behzadi MR, Fardaei M (2015). Sequencing of third exon of IGF1 gene in sheep. Journal of Agricultural Biotechnology 7: 83-96.

SAS, SAS/STAT (2006). User's Guide (Version 9.1). SAS Inst. Inc., Cary, NC. 8484.

Shojaei M, Mohammad Abadi M.R, Asadi Fozi M, Dayani O, Khezri A, Akhondi M (2010). Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. Journal of Cell and Molecular Research 2: 67-73.

Sweeney T, Hanrahan JP (2008). The evidence of associations between prion protein genotype and production, reproduction, and health traits in sheep. Veterinary Research 39: 28–45.

Tranulis MA, Osland A, Bratberg B, Ulvand MJ (1999). Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and in Norway. Healthy controls Journal of General Virology 80: 1073-1077.

Tsunoda K, Namikawa T, Sato K, Hasnath MA, Nyunt MM, Rajbandary BH, Loc CB, Zanchiv T, Chang H, Sun W, Dorji T (2009). Prion protein polymorphisms and estimation of risk of scrapie in East Asian sheep. Biochemical Genetics 48: 13-25.

Vaccari G, Petraroli R, Agrimi U, Eleni C, Perfetti MG, DiBari MA (2001). PrP genotypes in Sarda breed sheep and its relevance for scrapie. Archives of Virology 146: 2029-2037.

Vajed Ebrahimi MT, Mohammad Abadi MR, Esmailizadeh AK (2015). Analysis of genetic diversity in five Iranian sheep population using microsatellites markers. Journal of Agricultural Biotechnology 7: 143-158.

Zhou H, Hickford JG, Fang Q (2005). Technical Note: Determination of alleles of the ovine PRNP gene using PCR-single-strand conformational polymorphism analysis. Journal of Animal Science 83: 745-749.

Zheng L, Li N, Fan B, Fang M, Xu W (2004). PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds. Animal Genetics 35: 457-461.

Prion Protein Gene (Prp) Polymorphism in Iranian Ghezel, Harki and Makoei Sheep Breeds Using PCR-SSCP Technique and Sequencing

Danesh V.*[1], Hafeziyan S.H.[2], Rahimi Mianji G.[3], Farhadi A.[4]

[1] Ph.D. Student of Genetics and Animal Breeding, Agriculture Sciences and Natural Resources University of Sari, Mazandran, Iran.
[2] Associate Professor, Faculty of Animal Science and Fisheries, Agriculture Sciences and Natural Resources University of Sari, Mazandran, Iran.
[3] Professor, Faculty of Animal Science and Fisheries, Agriculture Sciences and Natural Resources University of Sari, Mazandran, Iran.
[4] Assistant Professor, Faculty of Animal Science and Fisheries, Agriculture Sciences and Natural Resources University of Sari, Mazandran, Iran.

Abstract

Scrapie or transmissible spongiform encephalopathy (TSE), is an infectious fatal disease of sheep and goats which affects the central nervous system. In the present study, 300 blood samples were collected from three breeds of Iranian indigenous Ghezel, Harki and Makoei sheep breeds. A DNA fragment with the length of 173 bp from exon 3 of PrP gene was amplified with specific primer pairs. The banding pattern of each sample in the study population was identified by means of PCR-SSCP. Then, after sequencing, comparison and analysis of the observed polymorphism between different breeds were performed at codons: 136, 154 and 171. In the present study, tow haplotypes of ARR and ARQ were identified and the wild type scrapie-susceptible ARQ was the most frequent haplotype. In this study more than 98% of animals were with the genotype ARQ/ARQ which was classified as low resistance to this disease. Three novel alleles (L178, E147 and L173) were observed for the first time in this study. The comparison of genotype frequency between Makoei–Ghezel and Makoei–Harki sheep breeds were statistically significant ($P<0.05$).The data from the current study may help to establish a breeding program for controlling of scrapie in Iranian sheep population.

Keywords: *Native sheep breeds, scrapie, prion protein gene, polymorphism, PCR- SSCP.*

* Corresponding Author: Danesh V. Tel: +989143436104 Email: v.danesh@yahoo.com