



## 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<sup>۱\*</sup>، سید حسن حافظیان<sup>۲</sup>، قدرت الله رحیمی میانجی<sup>۳</sup>، ایوب فرهادی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

<sup>۳</sup> استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

<sup>۴</sup> استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۰۴

### 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 آگزون سه ژن پروتئین پرایون تکثیر شد. با استفاده از تکنیک PCR-SSCP الگوی بانندی برای هر یک از نمونه ها در جمعیت مورد مطالعه شناسایی و بعد از توالی یابی چند شکلی های مشاهده شده در کدون های ۱۳۶، ۱۵۴ 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 L173 برای 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 ( $P < 0.05$ ). 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.

مقدمه

نگهداری و پرورش گوسفند در ایران به منظور تامین گوشت، شیر، پوست و یاف پشمی انجام می شود (Sajadi Zarjani *et al.*, 2015). در گوسفنداری برای افزایش راندمان تولید، اصلاح دام نقش اساسی از جمله در کنترل بیماری ها ایفا می کند. به منظور به حداقل رساندن سرمایه گذاری و افزایش بازدهی، در برنامه های اصلاح نژادی می توان از روش های جدید ژنتیک مولکولی بهره گرفت. تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به عنوان یکی از اجزای مهم پروژه های اصلاحی می باشند. چراکه یک گونه بدون تنوع ژنتیکی کافی قادر به سازگاری با تغییرات محیطی و مبارزه با انگل ها و رقیب ها 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 اخیراً محققین با استفاده از روش های جدید ژنتیک مولکولی توانسته اند به نتایج خوبی در اصلاح و کنترل گله نسبت به این نوع بیماری برسند. تمام بیماری های پرایونی شناخته شده در مجموع انسفالوپاتی های اسفنجی شکل قابل انتقال (TSEs)<sup>۱</sup> نامیده می شوند که در انسان و حیوانات رخ داده و غیر قابل درمان و کشنده اند. این

بیماری در انسان به نام بیماری کروتزفلد یاکوب (CJD)<sup>۲</sup> در گاو انسفالوپاتی اسفنجی شکل گاوی (BSE)<sup>۳</sup> و در گوسفند به نام بیماری اسکرایی معروف شده است (Dalsgaard, 2002).

اسکرایی 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. اسکرایی 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 اسکرایی استفاده شود باعث بیماری BSE یا جنون گاوی در حیوان شده و از آن طریق به انسان منتقل می شود. ژن پرایون به طول ۳۱۴۱۲ باز جفت روی کروموزوم ۱۳ گوسفند قرار گرفته و از ۳ آگزون و ۲ اینترون تشکیل شده است. بخشی از آگزون سه به اندازه حدود ۷۶۸ جفت باز مهمترین بخش این جایگاه ژنی در ارتباط با این بیماری به حساب می آید. چرا که در ۳۵ کدون متفاوت از این آگزون بیش از ۵۰ موتاسیون (SNP) مشاهده شده است (Alvarez *et al.*, 2011). اما اعتقاد بر این است که موتاسیون در کدون های ۱۳۶، ۱۵۴ و ۱۷۱ باعث حساسیت و یا مقاومت حیوان به اسکرایی می شود. در هر

<sup>۲</sup> Creutzfeldt-Jakob Disease

<sup>۳</sup> Bovine Spongiform Encephalopathy

<sup>۱</sup> Transmissible Spongiform Encephalopathies

بیماری شامل TRQ, AHR, VRR, و ARK  
 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 اسکرابی حساسیت های متفاوتی را نشان می‌دهند. به همین دلیل میزان حساسیت گوسفندان به اسکرابی را به پنج گروه به صورت R1-R5 تقسیم بندی می کنند. این گروه بندی در طرح های ملی مربوط به بیماری اسکرابی که در کشور انگلیس انجام شد، به عنوان یک شاخص مبنای قرار گرفته است. به کمک این تقسیم بندی انتخاب به منظور مقاومت به اسکرابی 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 اسکرابی در قالب شناسایی چند شکلی در جایگاه ژنی پروتئین پرایون در ۳ کدون ۱۳۶، ۱۵۴ 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 اسکرابی، باعث شده که برنامه های

یک از کدون های ۱۳۶ اسید های آمینه آلانین (A) و یا والین (V)، کدون ۱۵۴ 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 ۱۳۶، آرژنین در کدون ۱۵۴ و آرژنین در کدون ۱۷۱) مقاوم به اسکرابی 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 ۱۳۶، آرژنین در کدون ۱۵۴ و گلوتامین در کدون ۱۷۱) آسیب پذیر بوده و گوسفندان حامل هاپلو ژنوتیپ هموزایگوس VRQ/VRQ حساسیت بالای نسبت به اسکرابی دارند (Hunter *et al.*, 1994). چند شکلی در کدون ۱۵۴ و ارتباط آن با بیماری اسکرابی 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 ۵ آلل ذکر شده تعدادی آلل نادر نیز در ارتباط با این

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 پلیمرز

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 مرز با استفاده از دستگاه PCR (ABI 2720، آمریکا) و حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر (۱۵۰ نانوگرم) DNA، ۳ میلی مولار MgCl<sub>2</sub>، ۰/۵ میکرولیتر (۵۰ پیکومول) از هر یک از آغازگرها، ۰/۵ میکرولیتر (۱۰۰ میلی مولار) dNTPs، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR با غلظت ۱X (۱۰ میلی مولار تریس، ۵۰ میلی مولار کلرید پتاسیم، ۰/۱٪ ژلاتین، ۸/۴ 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

اصلاحی در جهت افزایش فراروانی 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 محسوب 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 روش ها

##### 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.

ژنوتیپ نمونه‌ها با مشاهده مستقیم باندها از روی ژل و محاسبه نسبت آنها از کل و فراوانی‌های مورد انتظار با استفاده از نسبت‌های تعادل هاردی-واینبرگ محاسبه شد. نمونه‌های مورد بررسی بر اساس الگوی باندها به گروه‌های مختلف هاپلوژنوتیپی تقسیم و برای آگاهی از توالی این الگوهای باندها خصوصاً در کدون‌های با اهمیت، از هر گروه هاپلوژنوتیپی 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 توالی‌ها و دسته‌بندی هاپلوتیپ‌ها

توالی‌ها 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 هاپلوتیپ‌های متناظر با هر یک از گروه‌های هاپلوژنوتیپی نام گذاری شدند.

#### نتایج و بحث

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

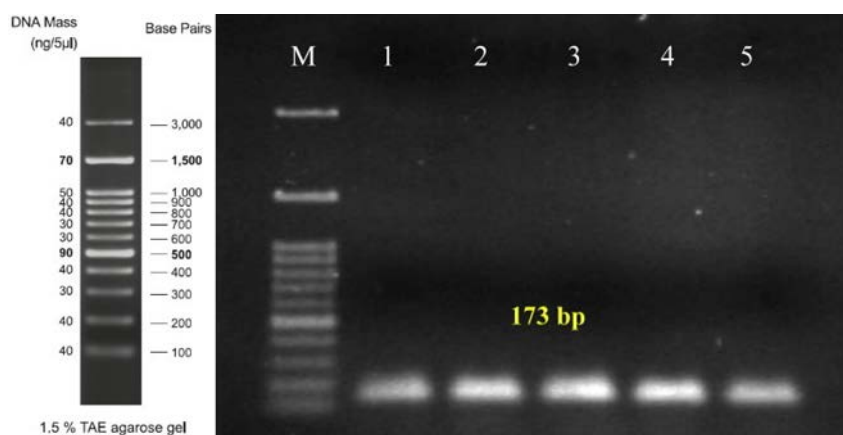
مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشته شدن دو رشته DNA در چرخه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال آغازگرها و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه برای تکثیر و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه برای بسط نهایی انجام گرفت. صحت تکثیر محصولات PCR توسط ژل آگارز ۲ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید آزمون و سپس تصویر باندها با استفاده از دستگاه عکس برداری از ژل ثبت شد.

#### تعیین ژنوتیپ

از آنالیز SSCP برای شناسایی هاپلوتیپ‌های 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 واسرشته سازی محصول PCR انجام و نمونه به سرعت روی یخ منتقل شدند. سپس نمونه‌ها روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲ درصد (اکریل آمید: بیس اکریل آمید = ۳۸/۵ : ۱) در دمای ۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت با ولتاژ ثابت ۳۰۰ ولت و با استفاده از بافر تانک TBE 1X الکتروفورز شدند. رنگ آمیزی نترات نقره انجام و سپس تصویر باندها با استفاده از دستگاه عکس برداری از ژل ثبت شد (Byun et al., 2009). در ادامه

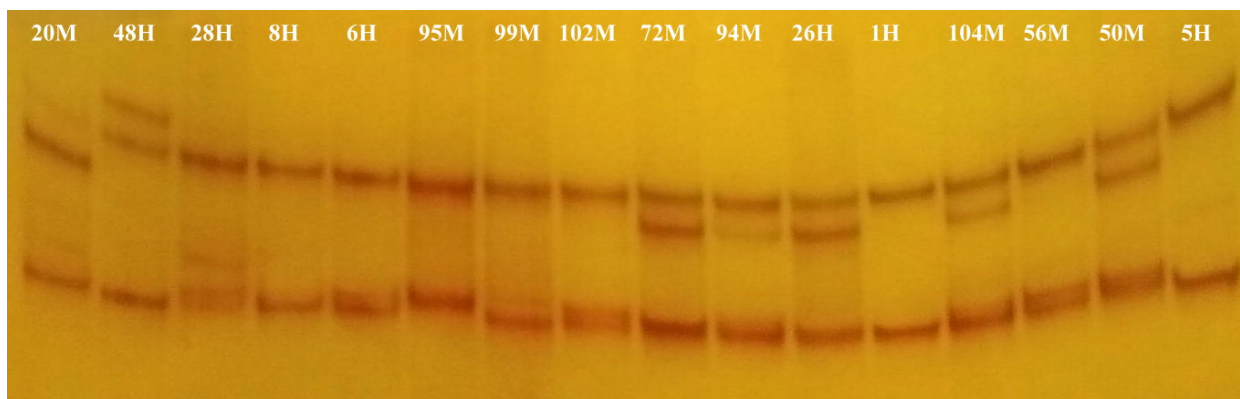
جهت شناسایی چند شکلی در بین نژادهای مورد پژوهش از تکنیک PCR-SSCP استفاده شد. نتایج حاصل ۸ الگوی بانندی منحصر به فرد را نشان داد. از هر الگوی بانندی یک نمونه به عنوان نماینده جهت تعیین توالی فرستاده شد (شکل ۲).

شکلی در مهمترین کدون ها در میزان حساسیت یا مقاومت نسبت به بیماری اسکرابی (کدون های ۱۳۶، ۱۵۴ و ۱۷۱) تکثیر داده شد. نمونه ای از تکثیر پس از الکتروفورز در ژل آگارز در شکل ۱ نشان داده شده است.



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 بانندی 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 ۱۳۶ و ۱۵۴ 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 ۱۳۶، ۱۵۴ و ۱۷۱ ژن پرایون بدست آمد. بر اساس چند شکلی در کدون های ۱۳۶، ۱۵۴ و ۱۷۱ گوسفندان را بر اساس میزان در خطر بودن هاپلو ژنوتیپ ها نسبت به بیماری اسکرابی 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 اسکرابی که در بریتانیا (NSP, DEFRA.2007) پایه گذاری شده است، مورد توجه قرار گرفته است.

هاپلوژنوتیپ های 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

اسکرابی 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 اسکرابی 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 اسکرابی (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 اسکرابی را در صورت مواجهه با این بیماری دارند. باید توجه داشت که ژنوتیپ های مقاوم به اسکرابی نیز همیشه مقاوم به اسکرابی 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 اسکرابی

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

گروه ها Groups	هاپلو ژنوتیپ ها Haplogenotype	عملکرد Function
R <sub>1</sub>	ARR/ARR	مقاومت بالا High Resistance
R <sub>2</sub>	ARR/AHQ, ARR/ARH, ARR/ARQ	مقاوم Resistant
R <sub>3</sub>	ARQ/ARH, ARQ/AHQ, AHQ/AHQ, ARH/ARH, AHQ/ARH, ARQ/ARQ	مقاومت کم Low Resistance
R <sub>4</sub>	ARR/VRQ	حساس Susceptibility
R <sub>5</sub>	AHQ/VRQ, ARH, VRQ, ARQ/VRQ, VRQ/VRQ	حساسیت بالا High Susceptibility

(Moradi *et al.*, 2013). در پژوهش دیگری سه نژاد ایرانی زل، نائینی و بلوچی مطالعه شده که هاپلو تیپ ARQ با میانگین ۰/۵۳ بیشترین فراوانی هاپلو تیپی و هاپلو ژنوتیپ ARQ/ARQ با میانگین ۳۶ 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 اسکرابی (ARR/ARR) در نمونه های مورد مطالعه یافت نشده و بیشترین فرکانس ژنوتیپی به میزان ۴۳/۲

در مطالعه جایگاه ژنی پروتئین پرایون در دو نژاد گوسفند ایرانی بلک و آرمان چهار هاپلو تیپ ARR, ARH, AHQ, ARQ مشخص شد. هاپلو تیپ ARQ با میانگین وفور ۷۴/۵ درصد و هاپلو ژنوتیپ ARQ/ARQ با میانگین وفور ۵۹ درصد به ترتیب بیشترین فراوانی هاپلو تیپی 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



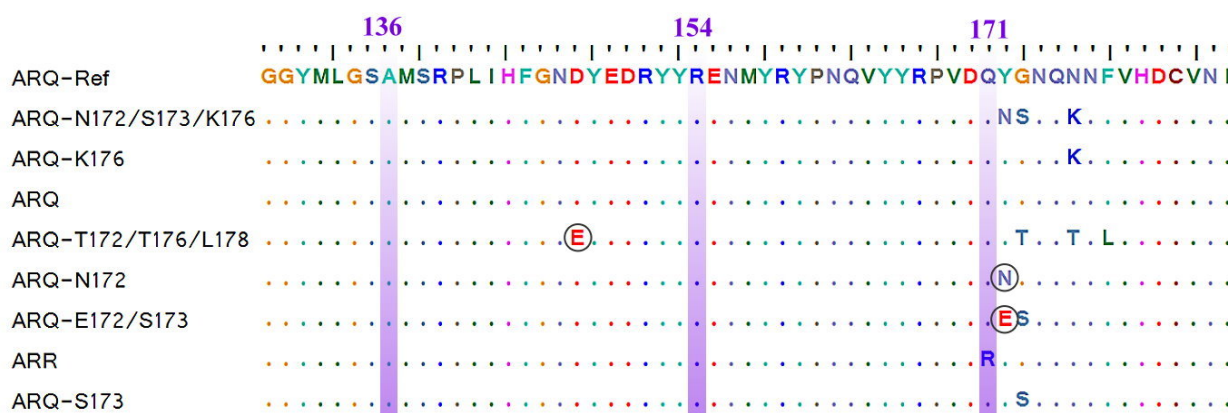
پژوهش چندشکلی جدید بوده که در مطالعات قبلی گزارش نشده است. در ضمن در نمونه ARQ-N172 و ARQ-E172/S173 در جایگاه ۱۷۲ و ARQ-T172/T176/L178 در جایگاه ۱۴۷ (در شکل با علامت  $\circ$  مشخص شده) دارای ژنوتیپ هتروزیگوت می‌باشند.

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 ARQ/ARQ, ARR/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 هر یک 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

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 اسکارپی 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 اسکارپی 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 شکلی های 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 (۱۷۵، ۱۷۲، ۱۴۱، ۱۳۸، ۱۲۷، ۱۱۶، ۱۱۲، ۳۴، ۸۳، ۱۷۶، ۱۸۰، ۱۸۹، ۱۹۵، ۱۹۶، ۲۱۱، ۲۳۷، ۲۴۱) در جایگاه آگزون 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 L173 و L178, E147 شناسایی شده در این

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.

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



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/A RQ- N172- S173- K176	ARQ/A RQ- N172	ARQ/A RQ- E172- S173	ARQAR Q-K176	ARQ/A RQ- S176	ARR/A RQ	ARQ/A RQ	ARQ/ARQ -T172- T176-L178
فزل Ghezel	0.5	0.02	0.27	0.2	0.01	-	-	-
ماکویی Makoe i	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 در ۳ نژاد								
Total haplogenotype frequency in 3 sheep breeds								
	0.46	0.15	0.16	0.2	0.0066	0.01	0.0034	0.0034

- 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 Fozzi 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.\*<sup>1</sup>, Hafeziyan S.H.<sup>2</sup>, Rahimi Mianji G.<sup>3</sup>, Farhadi A.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Ph.D. Student of Genetics and Animal Breeding, Agriculture Sciences and Natural Resources University of Sari, Mazandran, Iran.

<sup>2</sup> Associate Professor, Faculty of Animal Science and Fisheries, Agriculture Sciences and Natural Resources University of Sari, Mazandran, Iran.

<sup>3</sup> Professor, Faculty of Animal Science and Fisheries, Agriculture Sciences and Natural Resources University of Sari, Mazandran, Iran.

<sup>4</sup> 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](mailto:v.danesh@yahoo.com)