تحقیقات تولیدات دامی

سال هشتم/شماره چهارم/زمستان ۱۳۹۸ (۱۸-۹)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

بررسی تنوع ژنتیکی ژن پروتئین پرایون در گوسفندان نژاد مهربان و رومانف

مصطفی هاشمی[۱]، احمد احمدی[۲*]، رامین عبدلی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا

۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا

۳- دانش‌آموخته دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۱/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۱۰)

چکیده

این پژوهش جهت بررسی چندشکلی در اگزون ۳ ژن پروتئین پرایون (*PRNP*) در گوسفندان نژاد مهربان و رومانف انجام شد. از ۱۲۴ رأس گوسفند (۸۵ رأس نژاد مهربان و ۳۹ رأس نژاد رومانف) نمونه‌های خون جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی جهت تکثیر یک قطعه ۱۷۳ جفت بازی از اگزون ۳ ژن پروتئین پرایون بکار گرفته شد. چندشکلی‌های قطعه مورد نظر با استفاده از تکنیک SSCP و تعیین توالی DNA تعیین و مورد ارزیابی قرار گرفتند. در هر دو نژاد مهربان و رومانف، سه الگوی متفاوت باندی (ژنوتیپ‌های AA، AG و GG) همراه با یک چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (g.625A>G) شناسایی شد که منجر به تغییر یک اسید آمینه (p.171 R>Q) می‌شود. سه هاپلوتایپ شامل ARR/ARR، ARR/ARQ و ARQ/ARQ شناسایی شد که بیشترین فراوانی (به ترتیب ۶۱/۲ و ۴۶/۱۵ درصد در نژاد مهربان و رومانف) مربوط به هاپلوتایپ دارای مقاومت بالا به بیماری اسکراپی (ARR/ARR) بود. نتایج پژوهش حاضر با توجه به شباهت چندشکلی‌ها در ژن PRNP نژادهای داخلی و خارجی می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: اسکراپی، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، گوسفند، مقاومت ژنتیکی

* نویسندهٔ مسئول: ahahmady@gmail.com

doi: 10.22124/ar.2019.12995.1401

مقدمه

اسکراپی یا بیماری آنسفالوپاتی‌های اسفنجی شکل قابل انتقال (Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE)) یک بیماری عفونی کشنده گوسفند و بز است که روی سیستم عصبی مرکزی حیوان تاثیر می‌گذارد و تا به حال هیچ روش درمانی برای آن ارایه نشده است (Laurén *et al*., 2009). اسکراپی گوسفندان که برای اولین بار در اروپا شناسایی شد، ابتدا سبب کاهش تولید شیر و ضعیف شدن حیوان شده و در نهایت مرگ حیوان را به دنبال دارد (Oesch *et al*., 1985). در این زمینه، پرایون (prion)، پروتئینی است که به طور عادی در سلول‌های عصبی بیان می‌شود (Goldmann 2008). جهش در ژن این پروتئین باعث تغییر در ساختار آن شده به طوری که پروتئین‌های جهش یافته می‌توانند مجتمع شده و توده‌های پروتئینی را در سلول‌های عصبی ایجاد کنند. این توده‌ها سبب آنسفالوپاتی‌های اسفنجی شکل در مغز می‌شوند. اسکراپی یکی از اعضای انسفالوپاتی‌های اسفنجی مسری، یک بیماری مهلک کشنده و تحلیل‌برنده سیستم اعصاب مرکزی است (Dawson *et al*., 1998). ویژگی‌های زیستی و بیوشیمیایی منحصر به فرد این عامل عفونی و ارتباط آن با بیماری BSE (Bovine spongiform encephalopathies) در گاو و CJD (Creutzfeldt-Jakob disease) در انسان تاکنون توجه زیادی را به خود جلب کرده است. اسکراپی گوسفندان در بیشتر کشورهای اروپایی، کانادا، ایالات متحده، کلمبیا و در بعضی از کشورهای آسیایی گزارش شده است (Boukouvala *et al*., 2018)

ژن پروتئین پرایون (*PRNP* یا Prp) روی کروموزوم شماره ۱۳ گوسفند قرار گرفته و از سه اگزون و دو اینترون تشکیل شده است. تنوع ژنتیکی در ژن *PRNP* در کدون‌های زیادی مشاهده شده است، اما با توجه به مطالعاتی که تاکنون انجام شده است، نشان داده شده که وجود چندشکلی در برخی جایگاه‌های کدونی نادر از اگزون ۳ (کدون‌های ۱۳۶، ۱۵۴ و ۱۷۱) با وقوع اسکراپی مرتبط است (Belt *et al*., 1995; Bossers *et al*., 1996). ORF (Open Reading Frame) اگزون سه این ژن با طول در حدود ۷۶۸ جفت باز که پروتئین پرایون به طول ۲۵۶ اسید آمینه را کد می‌کند، مهم‌ترین بخش این ژن محسوب می‌شود (Oesch *et al*., 1982).

بر اساس چند شکلی‌های شناخته شده در کدون‌های ۱۳۶ (تغییر آلانین A به والین V)، ۱۵۴ (تغییر آرژنین R به هیستیدین H) و ۱۷۱ (تغییر گلوتامین G به آرژنین R و هیستیدین H) در جایگاه ژنی پرایون، گوسفندان را به پنج گروه اصلی به صورت R1-R5، به ترتیب حساسیت این هاپلوژنوتیپ‌ها نسبت به بیماری اسکراپی، تقسیم‌بندی می‌نمایند (گروه‌بندی بر اساس طرح ملی مربوط به کنترل و ریشه‌کنی بیماری اسکراپی در بریتانیا پایه‌گذاری شده است (Dawson *et al*., 1998))، و تاکنون ترکیبات هاپلوژنوتایپی مختلفی شامل ARR، ARH، AHQ، ARQ و VRQ به عنوان عمومی‌ترین ترکیبات هاپلوژنوتایپی در نژادهای مختلف گوسفند گزارش شده است (Belt *et al*., 1995).

به طور کلی برنامه‌های ریشه‌کن کردن این بیماری بر اساس ایجاد محدودیت در استفاده از گوسفندان دارای آلل حساس در ژن‌گاه پروتئین پرایون یا انتخاب گوسفندان با آلل مقاوم یا هر دو روش انجام می‌شود. از آنجایی که در پژوهش‌های متعددی در نژادهای مختلف گوسفند نشان داده شده است که چندشکلی در ژن پروتئین پرایون با میزان حساسیت و مقاومت به این بیماری مرتبط است و با توجه با این‌که چند سالی است گوسفند رومانف به دلیل برخی خصوصیات بارز نژادی (برای مثال صفات باروری بالا) در ایران مورد توجه قرار گرفته و اقدام به واردات این نژاد جهت انجام تلاقی‌گری با نژادهای بومی با هدف بهبود ژنتیکی نموده‌اند، در این پژوهش چندشکلی در اگزون ۳ ژن پروتئین پرایون در گوسفندان نژاد مهربان و رومانف مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: از ۸۵ رأس گوسفند مهربان مزرعه آموزشی دانشگاه بوعلی سینا در استان همدان و ۳۹ رأس گوسفند نژاد رومانف متعلق به یک مرکز خصوصی اصلاح نژاد دام سبک (شرکت توسعه کشت و صنعت آوین ژن در فیروزکوه) با استفاده از ونوجکت‌های حاوی EDTA از سیاهرگ وداجی خون‌گیری شد. نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل

شده و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از کیت DNP^{TM} Kit (شرکت سیناژن) استفاده شد. استخراج DNA در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی گروه علوم دامی دانشگاه بوعلی سینا انجام شد. همچنین، کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز و دستگاه نانودراپ (مدل NanoDrop One، Thermo Scientific) مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR): برای بررسی چندشکلی ژن پروتئین پرایون، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تکثیر یک قطعه ۱۷۳ جفت بازی از باز ۴۹۸ تا ۶۷۰ اگزون سه ژن پروتئین پرایون با شماره بانک ژن XM_001009481.1، با استفاده از یک جفت آغازگر پیشنهاد شده در مطالعه Zhou *et al*. (2005) انجام گرفت. توالی آغازگرها به شکل زیر بودند:

رفت 5’-GGTGGCTACATGCTGGGAAGT-3’

برگشت 5’-GTGATGTTGACACAGTCATGCAC-3’

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل SG51 Life Technologies, A14-5A) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس (دانمارک ,Ampliqon)، یک میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت (با غلظت ۱۰ پیکومول در هر میکرولیتر)، یک میکرولیتر DNA ژنومی و ۷ میکرولیتر آب استریل دوبار تقطیر انجام شد. برنامه تکثیر نیز شامل مراحل زیر بود: واسرشته‌سازی اولیه با دمای ۹۵˚C به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشته‌سازی ثانویه با دمای ۹۵˚C به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۶۲˚C به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله توسعه در دمای ۷۲˚C به مدت یک دقیقه و در پایان چرخه توسعه نهایی در دمای ۷۲˚C به مدت ۱۰ دقیقه (جدول ۱). پس از انجام واکنش PCR، برای اطمینان از عمل تکثیر و صحت و میزان DNA تکثیر شده از الکتروفورز محصولات حاصل از PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده شد.

روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد (SSCP): جهت انجام روش SSCP روی قطعات تکثیر شده، ۵ میکرولیتر از محصول PCR به ۱۰ میکرولیتر بافر مخصوص SSCP (برم‌فنل‌بلو ۰/۰۵ درصد، گزیلن سیانول ۰/۰۵ درصد، فرمامید ۹۵ درصد و EDTA ۲۰ میلی مولار) اضافه و مخلوط شد. در ادامه برای تک‌رشته‌ای کردن محصولات PCR، نمونه‌ها به مدت ۱۲ دقیقه در دمای ۹۷ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند و به سرعت به مدت ۵ دقیقه جهت جلوگیری از دو رشته‌ای شدن دوباره، نمونه‌ها به ظرف حاوی یخ انتقال یافتند. سپس نمونه‌ها با استفاده از الکتروفورز عمودی (مدل PRO-21*22 cm شرکت پایاپژوهش پارس) پلی‌آکریلامید ۱۰ درصد به مدت ۱۴ ساعت با ولتاژ ۱۵۰ ولت در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد تفکیک شدند. در پایان جهت مشاهده باندهای بدست آمده روی ژل پلی‌آکریلامید، از روش رنگ‌آمیزی با نیترات نقره ۰/۱ درصد استفاده شد (Sanguinetti *et al*., 1994).

تعیین توالی DNA: بعد از انجام روش SSCP و مشاهده ژل‌های رنگ‌آمیزی شده و تعیین الگوهای باندی متفاوت در قطعه مورد مطالعه در جمعیت‌ها، از هر کدام از الگوهای مختلف مشاهده شده سه نمونه برای تعیین توالی ارسال شدند. بدین منظور مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR به همراه آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer در کشور کره جنوبی ارسال شدند.

جدول ۱- برنامه دمایی و زمانی PCR جهت تکثیر قطعه ۱۷۳ جفت بازی اگزون ۳ ژن پروتئین پرایون

Table 1. PCR temperature and time program to amplify a 173 bp fragment of the PRNP gene exon 3

Initial denaturation	95°C	1 minute	1 cycle
Denaturation	95°C	1 minute	
Annealing	62°C	45 second	35 cycles
Extention	72°C	1 minute	
Final Extention	72°C	10 minute	1 cycle

بررسی‌های بیوانفورماتیکی، تعیین آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها: نتایج بدست آمده از تعیین توالی الگوهای باندی متفاوت با استفاده از بخش MegAlign موجود در نرم-افزار DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison, WI. USA) با استفاده از روش Clustal W و استفاده از BLAST با توالی مرجع (شماره مرجع بانک ژن استفاده شده پروتئین پرایون XM_012188090.2) موجود در پایگاه اطلاعات ژنی NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) مقایسه شدند. در ادامه با یافتن تغییرات و جهش‌های مربوط به توالی الگوهای مورد نظر، ترجمه آنها به زنجیره اسیدهای آمینه به وسیله نرم افزار translate tool موجود در سایت ExPASy (http://us.expasy.org/translate tool/) انجام شد. در نهایت جهت بررسی وجود تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت‌های مورد بررسی از آزمون کای اسکور استفاده شد.

نتایج

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده و محصول PCR: نتایج حاصل از کیفیت DNA استخراج شده از خون کامل گوسفندان با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ ٪ نشان داد که DNA های بدست آمده دارای کیفیت خوبی بودند (شکل ۱). همچنین، ارزیابی کمّی DNA استخراج شده نشان داد که نمونه‌ها دارای غلظت‌های متفاوتی از ۴۰ تا ۵۱۰ نانوگرم DNA در هر میکرولیتر بودند. تصویر الکتروفورز محصولات تکثیر شده قطعه ۱۷۳ جفت بازی اگزون ۳ ژن پروتئین پرایون روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نیز در شکل ۲ مشاهده می‌شود. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، باندهای ۱۷۳ جفت بازی به طور واضح، روشن و متمایز در تصویر، تکثیر قطعه مورد نظر را تایید می‌کند.

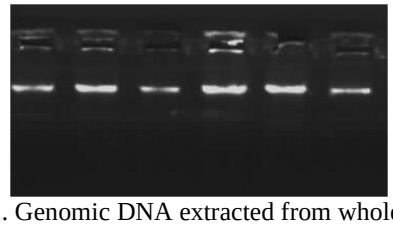

Fig. 1. Genomic DNA extracted from whole blood of the animals

شکل ۱- DNA ژنومی استخراج شده از خون کامل حیوانات

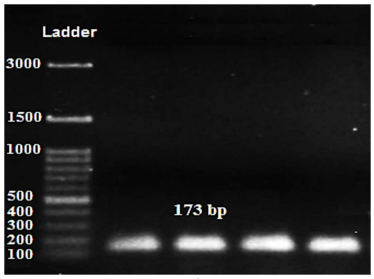

Fig. 2. PCR products of the 173 bp amplified fragment of the *PRNP* gene exon 3

شکل ۲- محصولات PCR قطعه ۱۷۳ جفت بازی اگزون ۳ ژن پروتئین پرایون

الگوهای مشاهده شده SSCP در قطعات ژن مورد بررسی: نتایج بدست آمده از چندشکلی‌های مشاهده شده بر اساس واسرشته‌سازی تک‌رشته‌ای از ساختار فضایی قطعات تکثیر شده از ژن پروتئین پرایون، حاکی از وجود سه الگوی ژنوتیپی متفاوت برای اگزون ۳ این ژن بودند، به طوری که در تحقیق حاضر برای گوسفندان هر دو نژاد مهربان و رومانف الگوهای ژنوتیپی متفاوت در ژن مورد نظر یافت شد که این الگوهای متفاوت مشاهده شده در شکل ۳ نشان داده شده‌اند.

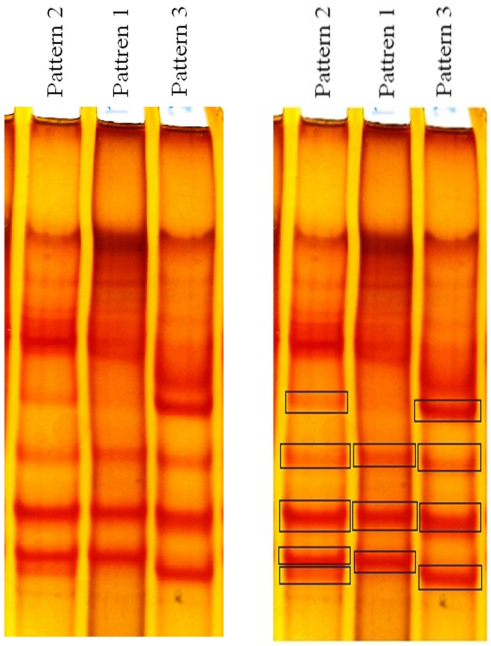

Fig. 3. Three different SSCP patterns of the exon 3 of the *PRNP* gene in Mehraban and Romanov sheep

شکل ۳- سه الگوی متفاوت SSCP اگزون ۳ ژن پروتئین پرایون در گوسفندان مهربان و رومانف

نتایج حاصل از توالی‌یابی و ترجمه الگوهای متفاوت: نتایج حاصل از توالی‌یابی الگوهای متفاوت بدست آمده از ژن مورد نظر، نشان‌دهنده یک جهش تک نوکلئوتیدی در جایگاه ۶۲۵ (g.625A>G) از توالی کامل ژن *PRNP* (جایگاه ۱۲۸ از قطعه ۱۷۳ بازی در مطالعه حاضر) بود، که به صورت هموزیگوت‌های AA و GG و همچنین هتروزیگوت AG در شکل ۴ قابل مشاهده هستند. در ادامه، نتایج توالی‌یابی نمونه‌ها با هم و با توالی مرجع (XM-012188090.2) در نرم‌افزار DNASTAR برهم‌گذاری شدند (شکل ۵). نتایج بدست آمده از ترجمه توالی ژنوتیپ‌های متفاوت آلل‌های مختلف اگزون ۳ ژن پروتئین پرایون نیز نشان‌دهنده یک جایگزینی اسیدآمینه‌ای آرژنین با گلوتامین در جایگاه ۱۷۱ (R171Q) بود، که نتایج برهم‌گذاری آنها همراه با توالی پروتئینی توالی مرجع در شکل ۶ نشان داده شده است.

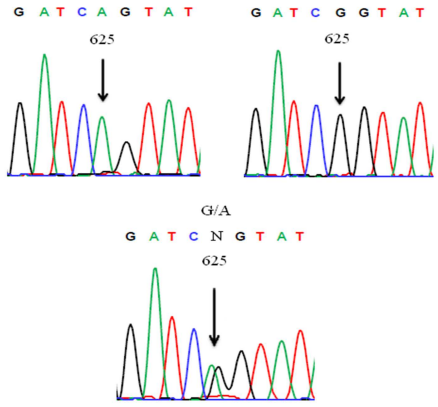

Fig. 4. Chromatogram of single nucleotide mutation at position of 625 of *PRNP* gene exon 3

شکل ۴- کروماتوگرام جهش تک نوکلئوتیدی در جایگاه ۶۲۵ جفت بازی اگزون ۳ ژن پروتئین پرایون

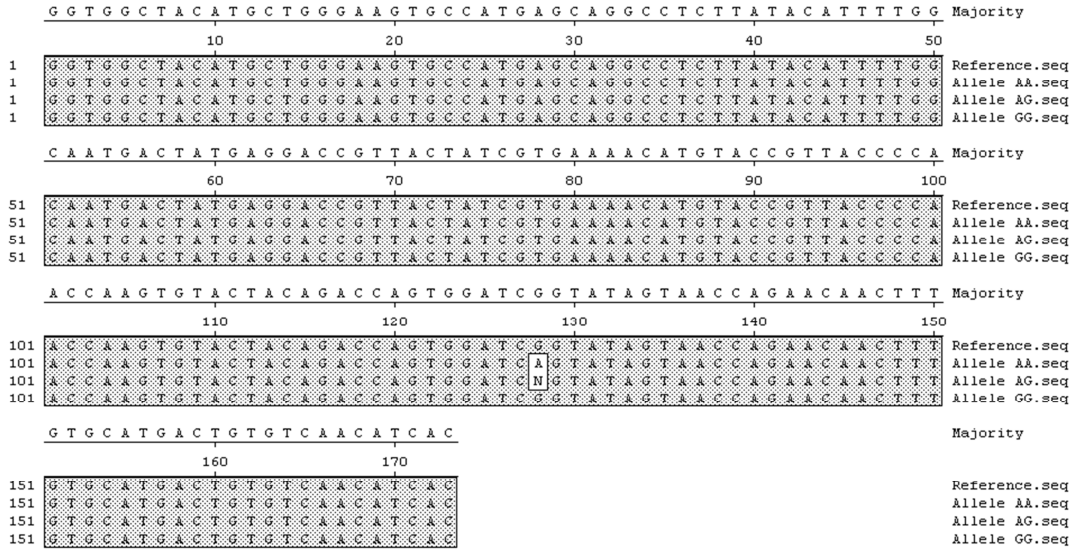

Fig. 5. Alignment of sequencing results of the 173 bp fragment of the *PRNP* gene exon 3 in different patterns and comparing with sequences reported in NCBI databases for sheep (XM_012188090.2). N is abbreviation for heterozygote mutations.

شکل ۵- همردیفی نتایج توالی‌یابی قطعه ۱۷۳ جفت بازی اگزون ۳ ژن پروتئین پرایون در الگوهای مختلف و مقایسه با توالی ثبت شده گوسفند در پایگاه اطلاعاتی NCBI (شماره ثبت ژن بانک XM_012188090.2). N علامت اختصاری برای جهش‌های هتروزیگوت است.

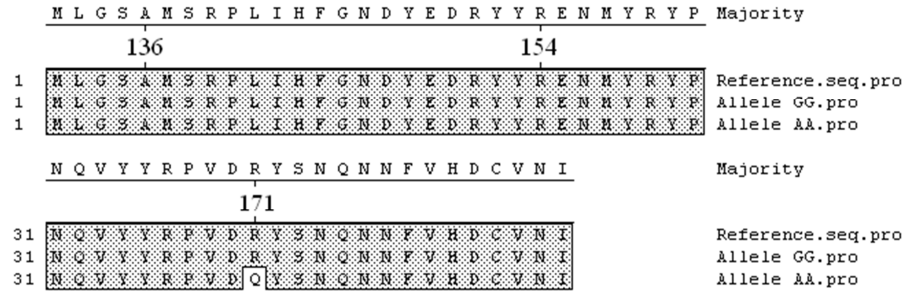

Fig. 6. The codified protein sequence and deduced amino acid exchange (R to Q) of *PRNP* gene exon 3 and comparing with sequences reported in NCBI databases for sheep (XM_012188090.2).

شکل۶- نتایج حاصل از ترجمه توالی اگزون ۳ ژن پروتئین پرایون و تغییر اسید آمینه آرژنین (R) به گلوتامین (Q) و مقایسه با توالی ثبت شده گوسفند در پایگاه اطلاعاتی NCBI (توالی ثبت ژن بانک XM_012188090.2).

جدول ۲- فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی مشاهده شده در اگزون ۳ ژن پروتئین پرایون در نژادهای مهربان و رومانف

Table 2. Genotypic and allelic frequencies observed in *PRNP* gene exon 3 in Mehraban and Romanov breeds

	Number			Frequency (%)	
Genotype	Mehraban	Romanov	Both breeds	Mehraban	Romanov
GG (ARR/ARR)	52	18	70	61.2	46.15
AA (ARQ/ARQ)	21	12	33	24.7	30.75
AG (ARR/ARQ)	12	9	21	14.1	23.1
Total	85	39	124		

جدول ۳- بررسی تعادل یا عدم تعادل فراوانی ژنوتیپ‌ها با آزمون مربع کای

Table 3. Evaluation of equilibrium and disequilibrium of genotypes frequency using chi-square test

Breed / Genotype	AA	AG	GG	$\chi 2$	*P*-Value
Romanov	12	9	18	10.84	$P<0.001$
Mehraban	21	12	52	38.6	$P<0.0001$

فراوانی‌های آللی، ژنوتیپی و آزمون تعادل هاردی- واینبرگ: پس از شناسایی الگوهای مختلف مشاهده شده SSCP برای منطقه مورد مطالعه ژن در همه نمونه‌های نژاد مهربان و نژاد رومانف، تعداد الگوهای مشابه شمارش شده و به صورت فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی برای جهش در جایگاه ۶۲۵ (۱۲۸ قطعه مورد مطالعه) از اگزون ۳ در هر نژاد به صورت مجزا در جدول ۲ ارائه شده است. فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی محاسبه شده برای اگزون ۳ ژن مورد مطالعه در نژادهای مهربان و رومانف با هم متفاوت بودند.

به منظور بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در جایگاه مورد مطالعه در جمعیت‌ها به طور مستقل، از آزمون مربع کای استفاده شد. نتایج بدست آمده نشان داد که هیچ یک از جمعیت‌های نژاد مهربان و رومانف در تعادل نبودند (جدول ۳).

بحث

تاکنون شناسایی چند شکلی در جایگاه ژن پرایون در برخی از نژادهای گوسفند ایرانی (باتوانی و همکاران، ۱۳۹۱؛ دانش و همکاران، ۱۳۹۵) و خارجی (Zheng *et al*., 2004; Luhken *et al*., 2008; Babar *et al*., 2009; Tsunoda *et al*., 2009; Meydan *et al*., 2013) مورد پژوهش قرار گرفته است. با توجه به پژوهش‌های انجام شده قبلی، مشخص شده است که برخی نژادهای بومی ایرانی نسبت به این بیماری در دسته گوسفندان با مقاومت پائین قرار داشته‌اند (دانش و همکاران، ۱۳۹۵)، اما با توجه به نتایج مطالعه حاضر بیشتر نمونه‌های استفاده شده از نژاد مهربان و رومانف در گروه

مقاوم به بیماری قرار گرفتند. به طور کلی، ارزیابی ژنتیکی ژن پرایون در نمونه‌های پژوهش حاضر، چندشکلی را فقط در جایگاه کدون ۱۷۱ (R/Q) نشان داد. جایگاه کدون‌های ۱۳۶ و ۱۵۴ بدون تنوع ژنتیکی و در همه نمونه‌ها به ترتیب به صورت هموزیگوت AA و RR مشاهده شد. بر اساس نوع اسید آمینه مربوط به هر سه جایگاه، دو هاپلوتایپ آللی ARR و ARQ و سه هاپلوژنوتیپ ARR/ARR، ARR/ARQ و ARQ/ARQ مشاهده شد. بر اساس چندشکلی مشاهده شده و مقایسه ژنوتیپ‌ها با جدول تقسیم‌بندی گروه‌های مختلف R1–R5 مرتبط با بیماری اسکراپی (دانش و همکاران، ۱۳۹۵)، جمعیت‌های مورد بررسی، به ترتیب با آثار فنوتیپی مقاومت بالا (R1)، مقاوم (R2) و مقاومت کم (R3) بودند و افراد نیمه حساس (R4) و حساس (R5) در جمعیت مشاهده نشد.

در پژوهشی که به وسیله دانش و همکاران (۱۳۹۵) با عنوان بررسی چندشکلی ژن پروتئین پرایون با استفاده از روش PCR-SSCP و تعیین توالی مستقیم در سه نژاد گوسفندان قزل، هرکی و ماکویی انجام شده بود، دو هاپلوتایپ ARR و ARQ شناسایی شد که بیشترین فراوانی مربوط به هاپلوتایپ با مقاومت کم به اسکراپی (ARQ) بود و بیش از ۹۸ درصد نمونه‌ها با داشتن ژنوتیپ ARQ/ARQ در دسته گوسفندان با مقاومت کم به اسکراپی قرار داشتند. در مطالعه دیگر که روی سه نژاد گوسفند نایینی، بختیاری و زندی جهت شناسایی کدون‌های حساس به اسکراپی انجام شده است (باتوانی و همکاران، ۱۳۹۱) نشان داده شد که ژنوتیپ با مقاومت کم به اسکراپی (A136R154Q171) (ARQ) در دو نژاد نایینی و زندی بیشترین فراوانی‌ها را (به ترتیب ۶۲ و ۷۲ درصد) در بین دیگر ژنوتیپ‌ها به خود اختصاص دادند و در نژاد بختیاری ژنوتیپ A136H154Q171 (AHQ) بیشترین فراوانی (۶۰ درصد) را داشت. این در حالی است که فراوانی ژنوتیپ بسیار حساس V136R154Q171 (VRQ) در نژاد بختیاری صفر بود و در کدون ۱۳۶ و ۱۷۱ چند شکلی نشان نداده و تنها آلل آنها به ترتیب A و Q است. ژنوتیپ کاملاً مقاوم ARR در هیچ کدام از نژادها مشاهده نشد. در مطالعه‌ای که به وسیله Moradi *et al*. (2013) روی دو نژاد گوسفند ایران بلک و آرمان در جایگاه ژنی پروتئین پرایون انجام شد چهار هاپلوتیپ ARR، ARQ، ARH و AHQ مشخص شد. هاپلوتیپ ARQ با میانگین وفور ۷۴/۵ درصد و هاپلوژنوتیپ ARQ/ARQ با میانگین وفور ۵۹ درصد به ترتیب بیشترین فراوانی هاپلوتیپی و هاپلوژنوتیپی را در جمعیت مورد مطالعه نشان دادند. با توجه به نتایج بدست آمده، بیش از ۷۰ درصد از گوسفندان مورد مطالعه در دسته گوسفندان با مقاومت پایین (R3) قرار گرفته‌اند. در پژوهشی دیگر که به وسیله Karami *et al*. (2011) در بین گوسفند نژاد عرب خوزستان روی چندشکلی ژن پروتئین پرایون انجام شد، نشان داده شد که ژنوتیپ دارای مقاومت بالا به اسکراپی (ARR/ARR) در نمونه‌های مورد مطالعه وجود نداشته و بیشترین فراوانی ژنوتیپی به میزان ۴۳/۲ درصد مربوط به ARQ/ARQ بود. همچنین حساس‌ترین ژنوتیپ به بیماری اسکراپی (VRQ/VRQ) در این مطالعه یافت نشد.

در مطالعه‌ای روی پنج نژاد مختلف شامل لری بختیاری، شال و زندی از گوسفندان نژاد ایرانی و همچنین لوسی و موکارامان از گوسفندان نژاد ترکیه‌ای که برای شناسایی چندشکلی در این جایگاه ژنی صورت گرفته بود (Frootan *et al*., 2012) نتایج نشان دادند که در هیچ یک از نژادهای ایرانی آلل 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 ARQ/ARQ با بیشترین وفور در بین همه نمونه‌ها و ژنوتیپ حساس به بیماری VRQ/VRQ فقط در نژاد موکارامان با فراوانی ۲/۷ درصد یافت شد. در پژوهشی که به وسیله Xu *et al*. (2011) روی گوسفند نژاد تن در چین انجام شد، نتایج با شناسایی کدون‌های ۱۳۶، ۱۵۴ و ۱۷۱ همراه بود. همچنین ژنوتیپ ARQ/ARQ به عنوان ژنوتیپ غالب شناسایی شد که از نظر مقاومت نسبت به بیماری اسکراپی در گروه کم مقاومت قرار دارد. در پژوهشی دیگر که به وسیله Boukouvala *et al*. (2018) روی نژاد گوسفند یونانی انجام شد جهشی در کدون ۱۷۱ با ژنوتیپ غالب ARQ/ARQ و دارای مقاومت کم نسبت به بیماری اسکراپی شناسایی شد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق می‌توان چنین برداشت نمود که گوسفندان نژاد مهربان و رومانف مورد مطالعه در مقابل بیماری اسکراپی مقاومت خوبی دارند. همچنین، با توجه به اهمیت ژن پرایون و تاثیر زیاد این ژن بر سلامتی گوسفندان و ارتباط آن با سلامتی جامعه و با توجه به وجود چندشکلی در این ژن، می‌توان به بررسی این ژن پرداخت و اطلاعات ارزشمندی جهت استفاده در برنامه‌های اصلاح نژادی در گوسفندان نژادهای مختلف ایران در راستای حذف حیوانات نامناسب فراهم کرد.

فهرست منابع

باتوانی ر.، ادریس م. ع.، و رحمانی ح. ر. ۱۳۹۱. شناسایی کدون‌های حساس به اسکراپی در سه نژاد گوسفند ایرانی. پنجمین کنگره علوم دامی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحه ۶۳۶-۶۳۴

دانش و.، حافظیان س. ح.، رحیمی میانجی ق.، و فرهادی ا. ۱۳۹۵. چند شکلی ژن پروتیین پرایون (*prp*) با استفاده از تکنیک PCR-SSCP و تعیین توالی مستقیم در گوسفندان نژاد ایرانی قزل، هرکی و ماکویی. بیوتکنولوژی کشاورزی، ۸(۲): ۱۷-۳۰.

Babar M. E., Farid A., Benkel B. F., Ahmad J., Nadeem A. and 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.

Belt P. B., Muileman I. H., Schreuder B. E., Bos-de Ruijter J., Gielkens A. L. and Smits M. A. 1995. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. Journal of General Virology, 76(3): 509-517.

Bossers A., Schreuder B. E., Muileman I. H., Belt P. B. and Smits M. A. 1996. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. Journal of General Virology, 77(10): 2669-2673.

Boukouvala E., Gelasakis A. I., Kanata E., Frangkiadaki E., Giadinisi N., Paklaska V., Christoforiodou S., Sklaviadis T. and Ekateriniadou L. V. 2018. The association between 171 k polymorphism and resistance against scrapie affection Greek dairy sheep. Small Ruminant Research, 161: 51-56.

Dawson M., Hoinville L., Hosie B. D. and Hunter N. 1998. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Veterinary Record, 142: 623-625.

Goldmann W. 2008. PrP genetics in ruminant transmissible encephalopathies. Veterinary Research, 39: 30.

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

Frootan F., Nikbakht G., Özgentürk N. Ö. and Ün C. 2012. Prion protein coding gene (PRNP) variability in sheep from Turkey and Iran. Biochemical Genetics, 50: 277-284.

Laurén J., Gimbel D. A., Nygaard H. B., Gilbert J. W. and Strittmatter S. M. 2009. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-&bgr; oligomers. Nature, 457(7233): 1128-1132.

Luhken G., Lipsky S. H., Peter C. H. and 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. and Yıldız M. 2013. Genetic risk assessment for atypical scrapie in Turkish native sheep breeds. Small Ruminant Research, 111: 16-22.

Oesch B., Westaway D., Wälchli M., McKinley M. P., Kent S. B. H., Aebersold R., Barry R. A., Tempst P., Teplow D. B., Hood L. E., Prusiner S. B. and Weissmann C. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. Cell, 40(4): 735-746.

Sanguinetti C. J., Dias Neto E. and Simpson A. J. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. BioTechniques, 17: 914-921.

Tsunoda K., Namikawa T., Sato K., Hasnath M. A., Nyunt M. M., Rajbandary B. H., Loc C. B., Zanchiv T., Chang H., Sun W. and Dorji T. 2010 Prion protein polymorphisms and estimation of risk of scrapie in East Asian sheep. Biochemical Genetics, 48: 13-25.

Xu L., Zhang Z., Zhou X., Yin X., Yang L. and Zhao D. 2011. Molcular cloning and polymorphism analysis of the prion protein gene in tan sheep of Ningxia, China. Gene, 485(2): 102-105.

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

Zhou H., Hickford J. G. H. and 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.

Animal Production Research

Vol. 8, No. 4, 2019 (9-18)

University of Guilan

Research paper

Evaluation of genetic variations of the *PRNP* gene in Mehraban and Romanov sheep breeds

M. Hashemi[1], A. Ahmadi[2]*, R. Abdoli[3]

1. MSc. Graduated in Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
3. Ph.D Graduated in Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: 14-04-2019 – Accepted: 31-05-2019)

Abstract

This study was conducted to investigate the polymorphisms of the Prion protein gene (*PRNP*) exon 3 in Mehraban and Romanov sheep. Blood samples were collected from 124 sheep (85 Mahraban and 39 Romanov). After DNA extraction, polymerase chain reactions (PCR) were performed to amplify a 173 bp fragment of the *PRNP* gene exon 3 using a specific pair of primers. Polymorphisms of the studied fragments were explored using single strand conformational polymorphism (SSCP) and DNA sequencing analysis. In both Mehraban and Romanov breeds, three different banding patterns (AA, AG and GG genotypes) along with a single nucleotide polymorphism (g.625A>G) were identified, that deduced one amino acid substitution (p.171R>Q). Three haplotypes including ARR/ARR, ARR/ARQ and ARQ/ARQ were identified, which the most frequency (61.2 and 46.15% in Mehraban and Romanov breeds, respectively) was related to the ARR/ARR haplotype with high resistance to scrapie disease. The results of current study regarding the similarity of polymorphism in *PRNP* gene of domestic and foreign breeds could be used in sheep breeding programs.

Keywords: Scrapie, Single nucleotide polymorphism, Sheep, Genetic resistance

*Corresponding author: ahahmady@gmail.com

doi: 10.22124/ar.2019.12995.1401