دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

شناسایی فرم‌های آللی حساس و مقاوم به بیماری اسکراپی در جایگاه ژنی پروتئین پرایون در گوسفندان نژاد ایران بلک و آرمان

نورالدین مرادی[۱]، قدرت رحیمی میانجی[۲] و حمید دلدار[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: moradi.n1985@gmail.com)
۲ و ۳- استاد و استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۱۸

چکیده

زئونوزها یا بیمار های قابل انتقال بین انسان و حیوان هم از جهت اقتصادی و هم بهداشت عمومی از اهمیت بالایی برخوردار هستند. اسکراپی، که یک بیماری کشنده و تحلیل برنده سیستم اعصاب مرکزی است در این دسته جای می‌گیرد. چند شکلی در جایگاه ژنی پروتئین پرایون (prp) در گوسفندان با میزان حساسیت و مقاومت نسبت به این بیماری مرتبط است. هدف از انجام این پژوهش تعیین ژنوتیپ ژن prp در گوسفندان نژاد ایران بلک و آرمان بود. نمونه‌های خون به طور تصادفی از ۱۰۰ راس از گوسفندان نژاد ایران بلک و آرمان تهیه و استخراج DNA با استفاده از روش بهینه یافته نمکی انجام شد. تکثیر یک قطعه ۱۷۳ جفت بازی از اگزون ۳ ژن prp با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی انجام و سپس نمونه‌ها با استفاده از آزمون SSCP و تعیین توالی مورد ارزیابی ژنتیکی قرار گرفتند. در مجموع چهار هاپلوتیپ ARR، ARQ، AHQ و ARH و پنج ترکیب هاپلوژنوتیپی ARQ/ARQ، ARR/ARQ، ARR/ARR، AHQ/ARQ و AHQ/ARH در این مطالعه شناسایی 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 نشان دادند. مقایسه فراوانی هاپلوتیپی و هاپلوژنوتیپی بین دو نژاد ایران بلک وآرمان از نظر آماری معنی‌دار بود. با توجه به نتایج به دست آمده بیش از ۷۰ درصد از گوسفندان مطالعه حاضر در دسته گوسفندان با مقاومت پایین (R_3) قرار گرفتند. لذا اتخاذ استراتژی مناسب در امر انتخاب و برنامه‌های اصلاح نژادی می‌تواند در کاهش میزان خطرات احتمالی ناشی از این بیماری موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: چند شکلی، PCR- SSCP، اسکراپی، آرمان، ایران بلک

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-24]

مقدمه

اسکراپی[1]، نوعی بیماری مخرب سیستم عصبی مرکزی است که باعث حفره حفره شدن بافت مغز در گوسفندان می‌شود (۳۶). اطلاعات بدست آمده حاکی از آن است که چند شکلی‌های موجود در ژن پروتئین پرایون (prp)[2] ارتباط زیادی با میزان حساسیت یا مقاومت نسبت به بیماری اسکراپی در گوسفندان دارند (۷). پرایون یکی از پروتئین‌هایی است که به طور عادی در سلول‌های عصبی بیان می‌شود. جهش در این پروتئین می‌تواند باعث تغییر ساختار این پروتئین شده به فرمی که پروتئین جهش یافته می‌تواند مجتمع شده و پلاک‌های آملوئیدی را در سلول‌های عصبی ایجاد کند. این پلاک‌ها عفونی و قابل انتقال بوده و باعث انسفالوپاتی‌های اسفنجی شکل (TSE)[3] در مغز می‌شوند (۳۵). در سال‌های اخیر بیماری‌های پرایونی مخصوصاً اسکراپی به عنوان موضوع مهمی در سلامت عمومی مورد توجه قرار گرفته است (۲۴). ترس از احتمال انتقال BSE و اسکراپی به انسان موجب ترس و دلهره دانشمندان در کشورهای مختلف شده تا جائی که در قالب پژوهش‌های مختلف میلیون‌ها راس گوسفند از نژادهای مختلف در رابطه با بیماری اسکراپی تست شده و برنامه‌های اصلاحی مناسب به منظور افزایش میزان مقاومت یا کاهش حساسیت به این بیماری ارائه شده است (۲۳).

ژن پروتئین پرایون روی کروموزوم ۱۳ گوسفندی واقع شده (۲۸) که شامل سه اگزون و دو اینترون است. بخشی از اگزون سه به اندازه حدود ۷۶۸ جفت باز مهم‌ترین بخش این جایگاه ژنی به حساب می‌آید. چرا که پروتئین پرایون به طول ۲۵۶ اسید آمینه را کد می کند (۴۰). در پژوهش‌های مختلف چند شکلی‌ها در کدون‌های ۱۳۶ (آلانین (A) یا والین (V))، ۱۵۴ (آرژنین (R) یا هیستیدین (H)) و ۱۷۱ (آرژنین (R)، هیستیدین (H) یا گلوتامین (G)) رخ داده و تا به حال ترکیبات هاپلوتیپی مختلفی شامل ARR، ARH، AHQ، ARQ و VRQ به عنوان ترکیبات معمول در نژادهای مختلف گوسفند گزارش شده است (۵، ۴۱،۲۵). در پژوهش‌های متفاوتی نشان داده شد که گوسفندان با هاپلوژنوتیپ هموزایگوس ARR/ARR بیشترین مقاومت و گوسفندان با هاپلوژنوتیپ VRQ/VRQ بیشترین حساسیت را نسبت به این بیماری از خود نشان می‌دهند (۵، ۷، ۱۳، ۱۷). تا کنون گزارشات معدودی از ابتلا گوسفندان با هاپلوژنوتیپ هموزیگوت ARR/ARR به بیماری اسکراپی به دست آمده است (۱۱، ۲۲، ۲۹). در ضمن مشخص شد که ARQ/ARQ هاپلوژنوتیپ وحشی در این جایگاه ژنی می‌باشد (۱۴). بر اساس چند شکلی در کدون‌های ۱۳۶، ۱۵۴ و ۱۷۱ در جایگاه ژنی پرایون، گوسفندان را به پنج گروه اصلی به صورت (R1-R5)، از باب حساسیت این هاپلوژنوتیپ‌ها نسبت به بیماری اسکراپی تقسیم‌بندی می‌نمایند (۱۰). این گروه‌بندی به عنوان یک شاخص مبنا در طرح‌های ملی مربوط به بیماری اسکراپی که در کشور انگلیس انجام

1- Scrapie 2- Prion protein 3- Transmissible spongiform encephalopathies

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-24]

می‌شود قرار گرفته است (۱۲). این گروه‌بندی هم چنین به عنوان خط مشی اتحادیه اروپا در برنامه‌های کنترل و ریشه کنی بیماری انسفالوپاتی قابل انتقال در کشورهای تحت عضو مورد توجه قرار گرفته است (۱۵). علاوه بر چند شکلی‌های ۳ کدون مذکور، چند شکلی‌های زیاد دیگری نیز در ژن پرایون گوسفندی در کدون‌های ۸۳، ۱۰۱، ۱۱۲، ۱۱۶، ۱۲۷، ۱۳۸، ۱۴۱، ۱۷۲، ۱۷۵، ۱۷۶، ۱۸۰، ۱۸۹، ۱۹۵، ۱۹۶، ۲۱۱، ۲۳۷ و ۲۴۱ مورد شناسایی قرار گرفته است (۵، ۸، ۱۴، ۴۱، ۴۴). میزان ارتباط چند شکلی در این کدون‌ها با بیماری اسکراپی در گوسفندان در اکثر موارد ناشناخته می باشد. بررسی مشاهدات مربوط به تنوع ژنتیکی prp در گونه‌های مختلف می‌تواند در تلاش برای شناخت و کنترل این بیماری با اهمیت باشد. 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. هدف از انجام پژوهش حاضر ارزیابی ژنتیکی ژن پروتئین پرایون در گوسفندان نژاد ایران بلک و آرمان با استفاده از تکنیک PCR-SSCP و تعیین توالی بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و استخراج DNA

برای انجام این پژوهش از ۱۰۰ راس از گوسفندان نژاد ایرن بلک وآرمان (از هر یک به تعداد ۵۰ راس) به طور تصادفی نمونه خون تهیه شد. خون‌گیری از ورید گردنی و در لوله‌های حاوی EDTA (۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر) انجام گرفت. استخراج DNA از ۱/۵ میلی لیتر خون با استفاده از روش نمکی بهینه یافته انجام شد (۳۲). جهت تعیین کیفیت وکمیت DNA استخراج شده از روشهای الکتروفورز روی ژل آگارز و طیف سنجی استفاده شد.

واکنش زنجیره پلی‌مراز

در این بررسی یک قطعه ۱۷۳ جفت بازی از اگزون سه ژن prp جهت تکثیر انتخاب شد. این بخش از ژن با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی با توالی رفت، 5'-GGTGGCTACATGCTGGGAAGT-3' و توالی برگشت 5'-GTGATGTTGACACAGTCATGCAC-3' مورد تکثیر قرار گرفت (۴۶). هر واکنش تکثیر با استفاده از دستگاه PCR (اپلاید بایو سیستم، ABI 2720، آمریکا) و در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر DNA (۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، ۳ میلی مولار MgCl2، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۲۰۰ میکرومولار)، 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، pH: ۸/۴) انجام شد. برنامه دمایی تکثیر این جایگاه شامل ۳۵ چرخه حرارتی به صورت، ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه برای واسرشته شدن اولیه دو رشته DNA، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشته شدن دو رشته DNA در چرخه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-24]

آغازگرهای ژن prp و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه برای تکثیر و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه برای بسط نهایی انجام گرفت. صحت تکثیر محصولات PCR توسط ژل آگارز ۲ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید آزمون و سپس تصویر باند ها با استفاده از دستگاه عکس برداری از ژل (بایورد، آمریکا) ثبت شد.

آنالیز PCR-SSCP

جهت شناسایی هاپلوتیپ‌های مختلف در جایگاه ژنی prp (از نظر ترادف اسیدهای نوکلئیک) از آنالیز SSCP استفاده شد. در آنالیز SSCP مقدار ۲ میکرولیتر محصول PCR به همراه ۸ میکرولیتر بافر بارگذاری SSCP (۹۸٪ فرمامید، ۱۰ میلی مولار EDTA، ۰/۰۲۵ برمو فنول بلو، ۰/۰۲۵ زایلان سیانول) با هم مخلوط و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد واسرشت سازی محصول PCR انجام و نمونه به سرعت روی یخ منتقل شدند. سپس نمونه‌ها روی ژل پلی اکریل آمید ۱۴ درصد (اکریل آمید: بیس اکریل آمید= ۳۷/۵ : ۱) در دمای ۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت با ولتاژ ثابت ۴۰۰ ولت و با استفاده از بافر تانک 1X TBE الکتروفورز شدند. رویت سازی باندها با استفاده از رنگ آمیزی نیترات نقره (۳) انجام و سپس تصویر باندها با استفاده از دستگاه عکس برداری از ژل (بایورد، آمریکا) ثبت و در ادامه ژنوتیپ نمونه‌ها با مشاهده مستقیم باندها از روی ژل تعیین شدند. نمونه‌های مورد بررسی براساس الگوی باندی به گروه‌های مختلف هاپلوژنوتیپی تقسیم و برای آگاهی از توالی این الگوهای باندی خصوصاً در کدون‌های با اهمیت، از هر گروه هاپلوژنوتیپی یک نمونه به عنوان نماینده برای همسانه سازی انتخاب شد.

همسانه سازی ژن

به منظور کسب آگاهی از نوع هاپلو ژنوتیپ‌های نمونه‌های مورد بررسی ابتدا محصول PCR مربوط به هریک از الگوهای باندی منحصر به فرد در آنالیز SSCP، روی ژل ۱ درصد با کمک کیت تجاری QIA quick PCR purification kit (کیا ژن، آمریکا) خالص سازی شدند. سپس هر محصول خالص سازی شده به همراه حامل همسانه سازی pGEM-T easy vector (پرومگا، آمریکا) و آنزیم T_4 لیگاز طبق دستورالعمل شرکت سازنده وارد واکنش اتصال شدند. سپس واکنش انتقال از طریق اضافه کردن ۲ میکرولیتر از محصول اتصال متعلق به هر نمونه به باکتری‌های مستعد E-Coli سویه DH_5 انجام و روی محیط کشت ال بی- آگار کشت شدند. انتخاب کلنی‌های حامل قطعه مورد نظر به روش معمول Blue/White screening انجام شد. صحت انتخاب کلنی‌ها با کمک پرایمرهای اختصاصی و واکنش PCR (پروتکل دمایی و مواد مصرفی مشابه واکنش تکثیر ژن) تائید شد. کلنی‌های تائید شده در محیط کشت مایع با استفاده از انکوباتور شیکر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۲۲۵ دور تکثیر و در انتها با استفاده از کیت تجاری QIA prep Spin Miniprep kit (کیاژن، آمریکا) استخراج پلاسمید انجام شد. پلاسمیدهای استحصال شده به صورت یک

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-24]

طرفه با استفاده از پرایمر رفت M13 تعیین توالی (بایو نیر، کره) شدند.

مقایسه توالی‌ها و دسته بندی 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.

آنالیز آماری

فراوانی هاپلوتیپی و هاپلو ژنوتیپی با شمارش مستقیم و بر مبنای مدل ریاضی ذیل انجام گرفت.

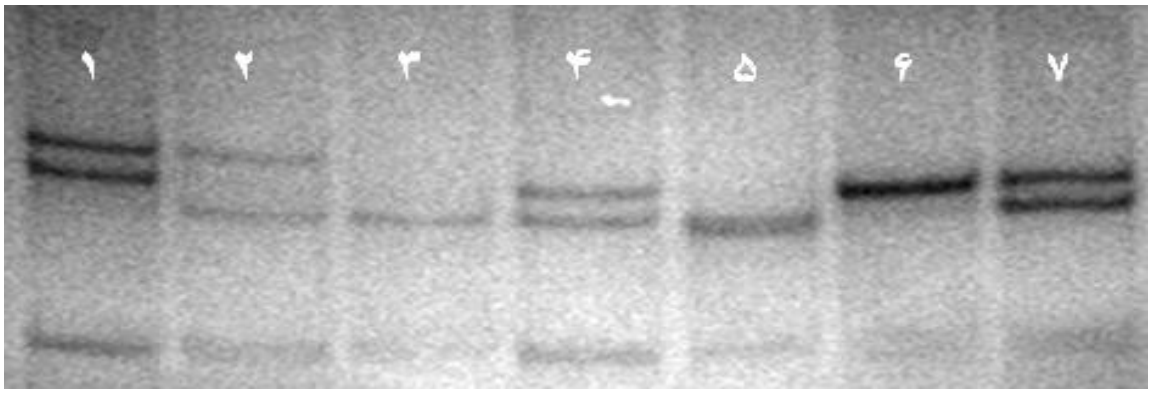
$$P_i = \frac{2f_{ii} + \Sigma f_{ij}}{2} \qquad f_{ij} = \frac{n_{ij}}{N}$$

به طوری‌که در رابطه فوق، nij تعداد حیوانات با ژنوتیپ ij و N تعداد کل افراد تعیین ژنوتیپ شده می‌باشد.

مقایسه وفور آللی و ژنوتیپی بین جمعیت‌ها به ترتیب با ستفاده از آزمون دقیق فیشر و مربع-کای و نیز بررسی تعادل هاردی واینبرگ در هر یک از جمعیت‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ انجام شد (۳۹).

نتایج و بحث

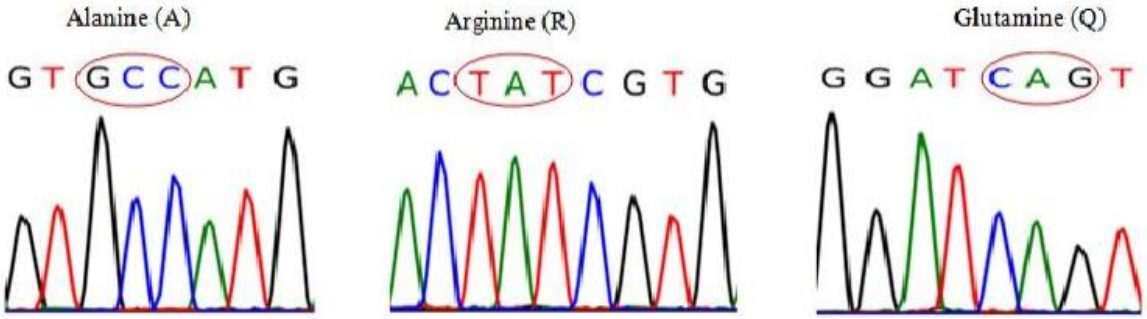
در پژوهش حاضر یک قطعه ۱۷۳ جفت بازی از اگزون ۳ جایگاه ژنی پروتئین پرایون انتخاب و به منظور بررسی چند شکلی در کدون های ۱۳۶، ۱۵۴ و ۱۷۱ (مهم‌ترین کدون‌ها در میزان حساسیت و مقاومت نسبت به بیماری اسکراپی) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر و سپس جهت شناسایی چند شکلی های موجود در نمونه های مورد پژوهش از تکنیک PCR-SSCP (شکل ۱) استفاده شد.



شکل ۱- الکتروفورز محصولات پی سی آر توسط ژل پلی اکریل آمید ۱۴٪. الگوی باندی مربوط به هر چاهک متعلق به یک گروه ژنوتیپی می باشد. چاهک ۱: AHQ/ARH، چاهک ۲: AHQ/ARQ، چاهک‌های ۳ و ۵: ARQ/ARQ، چاهک‌های ۴ و ۷: ARR/ARQ و چاهک ۶: ARR/ARR.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-24]

در مجموع چهار الگوی باندی منحصر به فرد شناسایی (ترکیب هر دو الگو یک ژنوتیپ هتروزیگوت یا هموزیگوت را ایجاد می‌کرد) و هر یک به نمایندگی از یک الگو تعیین توالی شدند (شکل ۲).



شکل ۲- توالی یکی از نمونه های مورد بررسی که نحوه نام گذاری هاپلوتیپ ARQ را نشان می دهد.

ارزیابی ژنتیکی ژن prp در نمونه‌های مورد بررسی نشان داد تنها در جایگاه‌های ۱۵۴ (R/H) و ۱۷۱ (Q/R/H) چند شکلی وجود دارد. جایگاه ۱۳۶ بدون تغییر ژنتیکی بوده و در همه نمونه‌ها به صورت هموزیگوت (AA) مشاهده شد. در مجموع چهار هاپلوتیپ ARR، ARQ، ARH و AHQ و پنج ترکیب هاپلوژنوتیپی ARQ/ARQ، ARR/ARQ، ARR/ARR، AHQ/ARQ، AHQ/ARH و ARH/ARQ در این مطالعه شناسایی شد. فراوانی‌های هاپلوتیپی و هاپلوژنوتیپی در هر یک از ۲ نژاد مورد بررسی به ترتیب در جداول ۱ و ۲ ارائه شده است.

جدول ۱- فراوانی هاپلوتیپی در نژاد های ایران بلک و آرمان

نژادها	فراوانی‌های هاپلوتیپی				P-Value	
	ARQ	ARR	AHQ	ARH	آرمان	ایران بلک
آرمان	۰/۷۸	۰/۲۰	۰/۰۲	-	-	۰/۰۰۴
ایران بلک	۰/۷۱	۰/۱۵	۰/۱۲	۰/۰۲	۰/۰۰۴	-

جدول ۲- فراوانی هاپلوژنوتیپی در نژادهای ایران بلک و آرمان

ژنوتیپ	فراوانی های هاپلوژنوتیپی		P-Value	
	آرمان	ایران بلک	آرمان	ایران بلک
ARQ/ARQ	۰/۶۴	۰/۵۴		۰/۰۵
ARR/ARQ	۰/۲۴	۰/۱۴		
ARR/ARR	۰/۰۸	۰/۰۸		
AHQ/ARQ	۰/۰۴	۰/۲۰		
AHQ/ARH	-	۰/۰۴		

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-24]

هاپلوتیپ ARQ با میانگین ۷۴/۵ درصد بیشترین فراوانی هاپلوتیپی و هاپلوژنوتیپ ARQ/ARQ با میانگین ۵۹ درصد بیشترین فراوانی هاپلوژنوتیپی را به خود اختصاصی داد و فراوان‌ترین هاپلوتایپ در هر دو نژاد مورد بررسی بود. تفاوت فراوانی‌های هاپلوتیپی (P<۰/۰۵) و هاپلوژنوتیپی (P=۰/۰۵) بین دو نژاد مورد مطالعه معنی‌داری بود. پس از ARQ، به ترتیب هاپلوتیپ‌های ARR، AHQ و ARH دارای بیشترین فراوانی (۱۷/۵، ۷ و ۱ درصد) بودند. هاپلوتایپ ARH کمترین فراوانی را در نژاد ایران بلک داشته و در نژاد آرمان مورد شناسایی قرار نگرفت (جدول ۱). هاپلوتیپ VRQ که به عنوان حساس‌ترین هاپلوتیپ نسبت به بیماری اسکراپی شناخته می‌شود در این پژوهش شناسایی نشده است. ۵۹ درصد از افراد جمعیت دارای هاپلوژنوتیپ ARQ/ARQ (آرمان (۰/۶۴) و ایران بلک (۰/۵۴)) و ۳۱ درصد از نمونه‌های مورد بررسی دارای حداقل یک هاپلوتیپ ARQ در ترکیب با هاپلوتیپ‌های ARR و AHQ داشتند. به علاوه ۸ درصد از گوسفندان دارای هاپلوژنوتیپ ARR/ARR (آرمان (۰/۰۸) و ایران بلک (۰/۰۸)) و ۱۹ درصد افراد دارای یک هاپلوتیپ ARR در ترکیب با ARQ بودند (جدول ۲).

زئونوزها یا بیمارهای قابل انتقال بین انسان و حیوان هم از جهت اقتصادی و هم بهداشت عمومی از اهمیت بالایی برخوردار بوده و در بسیاری از کشورهای جهان تلفات و خسارات سنگین ناشی از این بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است. اسکراپی، که یک بیماری مهلک، کشنده و تحلیل برنده سیستم اعصاب مرکزی است در این دسته جای می‌گیرد (۴).

وجود چند شکلی در ژن prp ارتباط نزدیکی با میزان مقاومت و حساسیت نسبت به بیماری اسکراپی دارد. شناسایی چند شکلی در این جایگاه ژنی در بسیاری از نژادهای گوسفند اروپایی مورد پژوهش قرار گرفته است (۵، ۱۳، ۱۸، ۳۰). اطلاعات راجع به تنوع ژنتیکی این جایگاه ژنی در سطح قاره آسیا به نسبت وسعت جغرافیایی ناکافی و تاکنون پژوهش‌های معدودی در این زمینه انجام شده است (۲، ۲۰، ۲۱، ۲۷، ۴۲، ۴۵). با این وجود پژوهش‌های مختلفی تنوع ژنتیکی ژن prp را در نژاد های مختلف ایرانی در سال‌های اخیر مورد ارزیابی قرار داده‌اند (۱۶، ۳۱، ۳۳، ۳۴، ۳۸). این مطالعه اولین تلاش برای تخمین فراوانی‌های هاپلوتیپی و هاپلوژنوتیپی در جایگاه ژنی prp در نژادهای ایران بلک و آرمان می‌باشد که با استفاده از تکنیک PCR-SSCP و تعیین توالی انجام شده است. با توجه به نتایج، چهار هاپلوتیپ ARR، ARQ، ARH و AHQ و پنج ترکیب هاپلوژنوتیپی ARQ/ARQ، ARR/ARQ، ARR/ARR، AHQ/ARQ، AHQ/ARH و ARH/ARQ در این مطالعه شناسایی شده است. هاپلوتیپ ARQ به عنوان هاپلوتیپ حساس نسبت به بیماری اسکراپی بیشترین فراوانی را در هریک از نژاد های مورد بررسی داشته است. در بسیاری از پژوهش‌های انجام شده در نقاط مختلف دنیا این هاپلوتیپ دارای فراوانی بالایی

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-24]

(۱۴، ۱۷، ۱۹، ۴۳) بوده است. بنابراین فرضیه وحشی بودن این هاپلوتیپ با توجه به نتایج پیشین و نیز پژوهش حاضر قوت می‌گیرد. هاپلوژنوتیپ ARQ/ARQ متعلق به گروه R_3 بوده و سبب ایجاد مقاومت پایین در حیوانات می‌شود. این هاپلوژنوتیپ در هر دو نژاد مورد بررسی بالاترین فراوانی هاپلوژنوتیپی را به خود اختصاص داده بود. این وضعیت ممکن است به دلیل وجود همبستگی احتمالی بین این هاپلوژنوتیپ با صفات مطلوب تولید کنندگان باشد و یا این‌که کند بودن روند اصلاح نژاد دلیل بالا بودن فراوانی هاپلوژنوتیپ وحشی در این جمعیت‌ها باشد. مقایسه آماری فراوانی‌های آللی بین این دو نژاد تفاوت معنی‌داری را نشان داد که قابل پیش‌بینی نبود. چرا که این دو نژاد سنتتیک منشا نژادی (نژاد بلوچی) یکسانی داشته و رویه اصلاح نژادی مشابهی در آنها بکار گرفته شده بود. تفاوت بین فراوانی‌های آللی بین این دو نژاد احتمالا بخاطر تفاوت در نژادهای بکار گرفته شده برای سنتز هر یک از این نژادها می‌باشد (ایران بلک= میش های بلوچی × قوچ های کیوسی و آرمان= کیوسی × سافولک × بلوچی × قزل). در بررسی گله‌های گوسفند کشور ایرلند میزان در معرض خطر بودن حیوانات ARQ/ARQ و VRQ/ARQ مشابه هم گزارش شده است. بررسی تنوع ژنتیکی ژن پرایون در گله‌های نژاد راسای اسپانیا نشان داد که ۹۵٪ حیوانات حساس به بیماری اسکراپی دارای هاپلوژنوتیپ ARQ/ARQ بودند و حیوانات VRQ/ARQ بر خلاف هاپلوژنوتیپ ذکر شده به بیماری مقاوم بودند (۱). بررسی‌های مشابه در کشورهایی نظیر آلمان و یونان این نتایج را تایید و در اغلب موارد وفور هاپلوژنوتیپ ARQ/ARQ بالا گزارش شده است (۱، ۲۶).

هاپلوتیپ ARR به عنوان مقاوم‌ترین هاپلوتیپ نسبت به اسکراپی شناخته می‌شود (۹). در مطالعه حاضر این هاپلوتیپ پس از هاپلوتیپ ARQ در هر دو نژاد دارای بیشترین فراوانی بوده است. به طور کلی همه برنامه‌های اصلاح نژادی سعی بر افزایش تدریجی هاپلوتیپ ARR در جمعیت‌های مختلف دارند. با این وجود، همبستگی منفی احتمالی این هاپلوتیپ با صفات تولیدی و تولید مثلی باید بررسی شده و برای اتخاذ استراتژی مناسب اصلاح نژادی مد نظر قرار گیرد. از سوی دیگر، در صورت پایین بودن فراوانی این هاپلوتیپ در جمعیت بهتر است انتخاب به نفع چند هاپلوتیپ که مقاومت نسبی ایجاد می‌کنند انجام گیرد. چرا که انتخاب تنها یک هاپلوتیپ برای مثال ARR، می‌تواند سبب افزایش هموزیگوسیتی و هم خونی در جمعیت شود. فراوانی این هاپلوتیپ در جمعیت‌های مورد مطالعه در این پژوهش نسبتا پایین بوده (۲۴ و ۱۴ درصد) بنابراین توصیه می‌شود که انتخاب به نفع چند هاپلوتیپ انجام شود. هاپلوتیپ AHQ به عنوان سومین هاپلوتیپ با فراوانی بالا، غالبا به صورت ترکیب با هاپلوتیپ ARQ مورد شناسایی قرار گرفته است. به نظر می رسد که هاپلوتیپ AHQ مقاومت نسبی را در گوسفندان با هاپلوژنوتیپ AHQ/ARQ، زمانی که در معرض عوامل عفونی

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-24]

مربوط به بیماری اسکراپی قرار می‌گیرند ایجاد می‌کند. به هر حال، اطلاعات کافی راجع به میزان مقاومت یا حساسیت به بیماری اسکراپی در هاپلوتیپ های AHQ و ARH در دست نیست (۶).

بر اساس چند شکلی در کدون‌های ۱۳۶، ۱۵۴ و ۱۷۱ گوسفندان را به پنج گروه اصلی R_1- R_5، بر اساس میزان در معرض خطر بودن هاپلوژنوتیپ‌ها نسبت به بیماری اسکراپی تقسیم‌بندی کردند (۱۰). به طور میانگین ۷۳ درصد از گوسفندان مورد بررسی در این پژوهش (بیشترین فراوانی) در گروه با مقاومت کم نسبت به بیماری اسکراپی (R_3) جای گرفتند (جدول ۳).

جدول ۳- تقسیم بندی گروه‌های هاپلوژنوتیپی بر اساس میزان مقاومت/ حساسیت به بیماری اسکراپی در نژادهای ایران بلک و آرمان

گروه ها	هاپلوژنوتیپ	آرمان	ایران بلک	کل
R_1	ARR/ARR	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸
R_2	ARR/ARQ	۰/۲۴	۰/۱۴	۰/۱۹
R_3	ARQ/ARQ AHQ/ARQ AHQ/ARH	۰/۶۸	۰/۷۸	۰/۷۳
R_4	-	-	-	-
R_5	-	-	-	-

در این مطالعه اگر چه ۸ درصد از گوسفندان در گروه بسیار مقاوم (R_1) و ۱۹ درصد در گروه مقاوم (R_2) قرار گرفتند اما در مقابل هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی در گروه‌های ژنوتیپی حساس (R_4) و بسیار حساس (R_5) دسته‌بندی نشدند. بنابراین خطر ابتلا به بیماری بخش چشمگیری از حیوانات مورد مطالعه را در صورت مواجه با بیماری تهدید می‌کند. چرا که بیش از ۷۰ درصد افراد وضعیت دفاع ژنتیکی قابل قبولی ندارند. البته باید توجه داشت حضور در گروه هاپلوژنوتیپی مقاوم به معنی عدم تهدید خطر ابتلا به بیماری نمی‌باشد زیرا موارد نادر از ابتلا حیوانات با هاپلوژنوتیپ هموزیگوت ARR/ARR نیز گزارش شده است (۱۱، ۲۲، ۲۹). به علاوه، خصوصیات نژادی نیز می‌تواند در میزان مقاومت و حساسیت هر یک از هاپلوژنوتیپ‌ها موثر باشد (۳۷). به هر حال فقدان اطلاعات راجع به همبستگی هر یک از هاپلوژنوتیپ‌ها و نحوه ظهور آنها (فنوتیپ) در هریک نژاد های مورد مطالعه سبب می‌شود که با قطعیت نتوان یک استراتژی اصلاحی کاربردی به منظور افزایش میزان مقاومت گوسفندان مورد پژوهش در این مطالعه ارائه داد. با این وجود مراقبت از سلامت فرآورده‌های دامی وارداتی و هم‌چنین بررسی عمیق‌تر ژنوتیپ گوسفندان نژادهای خارجی که به منظور آمیخته‌گری با نژادهای بومی وارد کشور می‌شوند می‌تواند مانع ورود هاپلوتیپ‌های بسیار حساسی چون VRQ به کشور شود.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-24]

منابع

1. Acin, C., I. Martin-Burriel, W. Goldmann, J. Lyahyai, M. Monzon and R. Bolea. 2004. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. Journal of General Virology, 85: 2103-2110.
2. Babar, M.E., A. Farid, B.F. Benkel, J. Ahmad, A. Nadeem and M. Imran. 2009. Frequencies of PrP genotypes and their implication for breeding against scrapie susceptibility in nine Pakistani sheep breeds. Molecular Biology Reports, 36: 561-565.
3. Bassam, B.J., G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Annual Review of Biochemistry, 196: 80-83.
4. Baylis, M. and W. Goldmann. 2004. The genetics of scrapie in sheep and goats. Current Molecular Medicine,. 4: 385-396.
5. Belt, P.B.G.M., I.H. Muileman, B.E.C. Schreuder, J. Bos-de Ruijter, A.L.J. Gielkens and M.A. Smits. 1995. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. Journal of General Virology, 76: 509-517.
6. Bossers, A., R. De Vries and M.A. Smits. 2000. Susceptibility of sheep for scrapie as assessed by in vitro conversion of nine naturally occurring variants of prp. Journal of Virology, 74: 1407-1414.
7. Bossers, A., B.E.C. Screuder, J.H. Muileman, P.B.G.M. Belt and M.A. Smits. 1996. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. Journal of General Virology, 77: 2669-2673.
8. Bossers, A., F.L. Harders and M.A. Smits. 1999. PrP genotype frequencies of the most dominant sheep breed in a country free from scrapie. Archives of Virology, 144: 829-834.
9. Clouscard, C., P. Beaudry, J.M. Elsen, D. Milan, M. Dussaucy, C. Bounneau, F. Schelcher, J. Chatelain, J.M. Launay and J.L. Laplanche. 1995. Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. Journal of General Virology, 76: 2097-2101.
10. Dawson, M., L. Hoinville, B.D. Hosie and N. Hunter. 1998. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Veterinary Record, 142: 623-625.
11. De Bosschere, H., S. Roels, P. Dechamps and E. Vanopdenbosch. 2007. TSE detected in a Belgian ARR-homozygous sheep via active surveillance. The Veterinary Journal, 173: 449-451.
12. Department for Environment, Food and Rural Affairs (Defra). 2007. NSP update. Technical Report 9 (Spring/Summer). Defra.
13. Drõgemüller, C., T. Leeb and O. Distl. 2001. PrP genotype frequencies in German breeding sheep and teh potential to breed for resistance to scrapie. Veterinary Record, 149: 349-352.
14. Elsen, J.M., Y. Amigues, F. Schelcher, V. Ducrocq, O. Andréoletti and F. Eychenne. 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.
15. European Commission. 2007. Commission Regulation (EC) No 727/2007 of 26 June 2007 amending annexes I, III, VII and X to regulation (EC) No 999/2001 of the European parliament and of the council laying down rules for the preservation, control

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-24]

and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. Official Journal of the European Union, 165: 8-20.
16. Frootan, F., G. Nikbakht, N. Özdemir Özgentürk and C. Ün. 2012. Prion protein coding gene (PRNP) variability in sheep from Turkey and Iran. Biochemical. Genetics, 50: 277-284.
17. Gama, L.T., M.I. Caroline, M.F. Santos-Silva, J.A. Pimenta and M.S. Costa. 2006. Prion protein genetic polymorhisms and breeding strategies in Portuguese breeds of sheep. Livestock Production Science, 99: 175-184.
18. Garcia-Crespo, D., B. Oporto, N. Gomez, D. Nagore, L. Benedicto, R.A. Juste and A. Hurtado. 2004. PrP polymorphisms in Basque sheep breeds determined by PCR-restriction fragment length polymorphism and real-time PCR. Veterinary Record, 154: 717-722.
19. Goldmann, W. 2008. PrP genetics in ruminant transmissible encephalopathies. Veterinary Research, 39: 30 pp.
20. Gombojav, A., N. Ishiguro, M. Horiuchi, D. Serjmyadag, B. Byambaa and M. Shinagawa. 2003. Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. The Journal of Veterinary Medical Science, 65: 75-81.
21. Gootwine, E., A. Abdulkhaliq, K.I.Z. Jawasreh and A. Valle Zárate. 2008. Screening for allele frequencies at the PrP locus in Awassi and Assaf populations in the Palestinian Authority and Jordan. Small Rumin Research, 77: 80-83.
22. Groschup, M.H., C. Lacroux, A. Buschmann, G. Lühken, J. Mathey and M. Eiden. 2007. Classic scrapie in sheep with ARR/ARR prion genotype in Germany and France. Emerg. The Journal of Infectious Diseases, 13: 1201-1207.
23. Hagenaars, T.J., M.B. Melchior, A. Bossers, A. Davidse, B. Engel and F.G. Van Zijderveld. 2010. Scrapie prevalence in sheep of susceptible genotype is declining in a population subject to breeding for resistance. Veterinary Research, 6: 25 pp.
24. Hunter, N. 2007. Scrapie-Uncertainties, biology and molecular approaches. Biochimica et Biophysica Acta, 1772: 619-628.
25. Hunter, N., D. Cairns, J.D. Foster, G. Smith, W. Goldmann and K. Donnelly. 1997. Is scrapie solely a genetic disease? Nature, 386: 137 pp.
26. Hunter, N., W. Goldmann, G. Benson, J.D. Foster and J. Hope. 1993. Swaledale sheep affected by natural scrapie differ significantly in PrP genotype frequencies from healthy sheep and those selected for reduced incidence of scrapie. Journal of General Virology, 74: 1025-1031.
27. Hussain, A., M.E. Babar, M. Imran, I.U. Haq and M.M. Javed. 2011. Detection of four novel polymorphisms in prp gene of Pakistani sheep (Damani and Hashtnagri) and goats (Kamori and Local Hairy) breeds. Journal of Virology, 8: 246 pp.
28. Iannuzzi, L., R. Palomba. G.P. DiMeo, A. Perucatti and L. Ferrara. 1998. Comparative FISH-mapping of the prion protein gene (PRNP) on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosome. Cytogenetics and Cell Genetics, 81: 202-204.
29. Ikeda, T., M. Horiuchi, N. Ishiguro, Y. Muramatsu, G.D. Kai-Uwe and M. Shinagawa. 1995. Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. Journal of General Virology, 76: 2577-2581.
30. Junghans, F., B. Teufel, A. Buschmann, G. Steng and M.H. Groschup. 1998. Genotyping of German sheep with respect to scrapie susceptibility. Veterinary Record, 143: 340-341.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-24]

31. Karami, M., C. Amirinia, N. Emam Jome Kashan, N. Amirmozafari, M. Chamani and M. H. Banabazi. 2011. Polymorphisms of the prion protein gene Arabi sheep breed in Iran. African Journal of Biotechnology, 10: 15819-15822.
32. Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic. Acids Research, 16: 1215 pp.
33. Moradi, N., G. Rahimi, H. Deldar, M. Najafi and B. Kamjoo. 2011. Genetic evaluation of codons 136, 154 and 171 of exon 3 prion protein gene in Zel sheep. The 7th National Biotechnology Congress of I.R. of Iran. Tehran. Iran. 722 pp.
34. Moradi, N., G. Rahimi, H. Deldar and N. Nazifi. 2012. Identification of susceptible and resistant allelic forms of prion protein gene to scrapie disease in Zel and Naini sheep breeds. The 12th Iranian Genetics Congress. Tehran. Iran.
35. Prusiner, S.B. 2003. Prion biology and diseases. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York Cold, 6: 1-800.
36. Prusiner, S.B. 1998. Prions. PNAS. 95: 13363-13383.
37. Prusiner, S.B., D.C. Bolton, D.F. Groth, K.A. Bowman, P. Cochran and M.P. McKinley. 1982. Further purification and characterization of scrapie prions. Biochemistry, 21: 6942-6950.
38. Salami, S., R. Ashrafi zadeh, D. Omrani, F. ramezani and A. Amniattalab. 2011. Allelic frequency and genotypes of prion protein at codon 136 and 171 in Iranian Ghezel sheep breeds. Prion, 5: 1-4.
39. SAS, SAS/STAT. 2006. User's Guide (Version 9.1). SAS Inst. Inc., Cary, NC.
40. Tranulis, M.A. 2002. Influence of the prion protein gene, Prnp, on scrapie susceptibility in sheep. APMIS. 110: 33-43.
41. Tranulis, M.A., A. Osland, B. Bratberg and M.J. Ulvand. 1999. Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. Journal of General Virology, 80: 1073-1077.
42. Tsunoda, K., T. Namikawa, K. Sato, M.A. Hasnath, M.M. Nyunt, B.H. Rajbandary, C.B. Loc, T. Zanchiv, H. Chang, W. Sun and T. Dorji. 2010. Prion protein polymorphisms and estimation of risk of scrapie in East Asian sheep. Biochemical Genetics, 48: 13-25.
43. Un, C., K. Oztabak, N. Ozdemir, I. Akıs and A. Mengi. 2008. Genotyping of PrP gene in native Turkish sheep breeds. Small Ruminant Research, 74: 260-264.
44. Vaccari, G., R. Petraroli, U. Agrimi, C. Eleni, M.G. Perfetti and M.A. DiBari. 2001. PrP genotypes in Sarda breed sheep and its relevance for scrapie. Archives of Virology, 146: 2029-2037.
45. Zheng, L., N. Li, B. Fan, M. Fang and W. Xu. 2004. PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds. Animal Genetics, 35: 457-461.
46. Zhou, H., J.G. Hickford and Q. Fang. 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.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-24]

Detection of Susceptible and Resistant Allelic forms to Scrapie Disease in Prion Protein Locus in Iran Black and Arman Sheep Breeds

Nouredin Moradi[1], Ghodrat Rahimi Mianji[2] and Hamid Deldar[3]

1- Former MSc Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Corresponding author: Moradi.n1985@gmail.com)
2 and 3- Professor and Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
Received: January 18, 2013 Accepted: May 8, 2013

Abstract

Zoonotic diseases or transmittable diseases between humans and animals, both for economic and public health are very important. Scrapie is a deadly degenerative central nervous system disease that takes place in this category. Polymorphisms in sheep PrP gene are related to scrapie resistance and susceptibility. The aim of this study was to genotype the PrP locus in Iran Black and Arman sheep breeds. Blood samples were collected from 100 Iran Black and Arman sheep and DNA was extracted using the modified salting out method. A DNA fragment with the length of 173 bp from exon 3 of PrP gene was amplified with a specific primer pairs. Then the obtained genotypes for each sample were genetically evaluated by means of PCR-SSCP and sequencing techniques. In overall, four haplotype alleles of ARR, ARQ, AHQ, and ARH and five haplogenotype combinations of ARQ/ARQ, ARR/ARQ, ARR/ARR, ARQ/AHQ, and AHQ/ARH were detected in studied populations. The ARQ with the mean frequency of 74.5 percent and the ARQ/ARQ with the mean frequency of 59 percent were the most frequent haplotype allele and haplogenotype, respectively. The comparison of allele and genotype frequency between Iran Black and Arman sheep breeds were statistically significant ($P<0.05$). Based on the obtained results more than seventy percent of sheep genotyped in the present study was categorized in low resistant group (R3). Therefore, adopting the appropriate strategy in the selection and breeding programs can be effective to reduce the risk of the disease.

Keywords: Polymorphism, PCR- SSCP, Scrapie, Arman, Iran Black

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-24]