نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 3، پاییز 1395، ص. 510-502

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 3, Fall 2016, p. 502-511

شناسایی واریانت‌های آللی مختلف ژن پرایون مؤثر بر بیماری اسکراپی در بُزهای نژاد نائینی

مجتبی نجفی[1*]- سیدحسن حافظیان[2]- محمدعلی روحی[3]- محسن گودرزی[3]

تاریخ دریافت: 1394/05/19
تاریخ پذیرش: 1394/11/27

چکیده

فرم پیچش غیر نرمال پروتئین پرایون باعث وجود بیماری های بیشماری در پستانداران از قبیل انسفالوپاتی اسفنجی گاوی (بیماری جنون گاوی) در گاو، بیماری کرتزفلد- جاکوب در انسان و بیماری اسکراپی در بز وگوسفند می شود. تمام این بیماری ها روی ساختار مغز و سیستم عصبی اثر گذاشته و تا به حال هیچ روش درمانی برای آن ها ارایه نشده است و در نهایت باعث مرگ دام می شود. با بررسی های بیشتر مشخص شد که حیوانات بر اساس تنوع ژنتیکی در ژن پرایون در گروه های مختلف از لحاظ حساسیت و مقاومت به بیماری قرار می گیرند. به منظور شناسایی فرم‌های مختلف اللی ژن پرایون در بُز نژاد نائینی، از تعداد 120 رأس بُز نژاد نائینی نمونه خون تهیه شد. بعد از استخراج DNA با استفاده از روش نمکی بهینه یافته، قطعه مورد نظر تکثیر و با استفاده از روش های PCR-SSCP و تعیین توالی تعیین ژنوتیپ شدند. در پژوهش حاضر، نتایج تعیین ژنوتیپ با روش PCR-SSCP 9 الگوی باندی را نشان داد که در نهایت آنالیز ژنتیکی از نواحی کُدکننده ژن پرایون، یک چندشکلی جدید را در کدون 186 (T- M or K) نشان‌داد. علاوه بَر این، دو جهش خاموش نیز در کدون‌های 138 و 143 مشاهده شد. با توجه به آنالیز ژنتیکی کدون‌های 136، 154 و 171 تمامی بُزهای نائینی مورد مطالعه دارای هاپلوتیپ ARQ بوده و احتمالا فراوانی بالای این هاپلوتیپ می تواند به علت همبستگی این آلل با صفات مهم و اقتصادی باشد و با توجه به پژوهش‌های پیشین احتمالاً این نژاد مقاومت کمی نسبت به بیماری اسکراپی دارد.

واژه‌های کلیدی: بُز نائینی، تعیین توالی مستقیم، فرم‌های مختلف آللی، PCR-SSCP.

مقدمه

پرورش بُز در ایران از دیرباز به‌عنوان یکی از مشاغل مهم تولیدی سنتی حائز اهمیت بوده است. بز شرایط آب‌وهوایی متغیر و خشک را تحمل می‌کند و در مقایسه با سایر دام‌ها به جیره نگه‌داری کمتری احتیاج دارد و بیشتر غذایی را که مصرف می‌کند صرف تولید و رشدونمو خود می‌نماید (25). بُز به‌طور کلی یک دام چند هدفی برای پرورش می‌باشد و به‌خصوص از نظر تولید گوشت، پشم، پوست و شیر موردتوجه قرار گرفته است. جمعیت کل بُزهای جهان در طی سال‌های 1995 تا 2000 از 667 میلیون به 720 میلیون رأس افزایش یافت و تا سال 2011 به 879 میلیون رأس رسید (16). بیشتر از 27 میلیون بُز در ایران وجود دارد (28) که در حدود یک میلیون آن را نژاد نائینی شامل می‌شود (25). هم‌چنین پیش‌بینی شده است که تعداد گوسفند و بُز تا سال 2030 در سرتاسر جهان به 2309 میلیون رأس برسد که در حدود 1856 میلیون رأس ان در کشورهای در حال توسعه می‌باشد (16). بز نائینی بومی منطقه مرکزی ایران می‌باشد. از مشخصات ظاهری این نژاد بدن سیاه‌رنگ با خطوط سفیدرنگ یا خرمایی در طول صورت که ازبالا به پایین کشیده شده که این رنگ در زیر شکم بین دو پای بُز نیز دیده می‌شود. هم‌چنین دست و پا، دور پوزه سفید می‌باشد (5). با توجه به موارد بالا، اهمیت بهبود این صنعت کاملاً روشن می‌باشد. یکی از مواردی که باعث بهبود کارایی و راندمان صنعت پرورش گوسفند و بُز می‌شود، کنترل و ریشه‌کنی بیماری‌های بدون درمان می‌باشد. در پستانداران، عامل بروز بیماری‌هایی از قبیل انسفالوپاتی اسفنجی گاوی (بیماری جنون گاوی) در گاو، بیماری کرتزفلد- جاکوب در انسان و بیماری اسکراپی در گوسفند و بُز فرم پیچش غیرطبیعی پروتئین پرایون می‌باشد. این بیماری روی ساختار مغز و سیستم عصبی تأثیر گذاشته و در نهایت باعث مرگ دام می‌شود. لازم به‌ذکر است تا به‌حال هیچ روش درمانی برای آن‌ها ارایه نشده است (23). اسکراپی اولین بار در دو گله گوسفندی در جزیره قبرس گزارش شد (29 و 30)، متعاقباً در سال 1981 این بیماری در بُزهای همان گله‌ها مشاهده شد (31). از آن

1- دانشجوی دکتری رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
2- دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
3- دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و اصلاح دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.
(*- نویسنده مسئول: (Email: Mojtaba_najafy@yahoo.com
DOI: 10.22067/ijasr.v0i0.49027

پس، اسکراپی به‌عنوان یک مشکل مهم برای مزارع (دامداری‌ها) مطرح و منجر به کاهش جمعیت بُز و گوسفند در گله‌های مبتلا به این بیماری شد. جایگاه ژنی پرایون در بُز و گوسفند دارای سه اگزون و دو اینترون است که روی کروموزوم 13 قرار دارد و به‌دلیل شروع چارچوب خواندن این ژن از روی اگزون سه با طول در حدود 768 جفت‌باز، این ناحیه مهم‌ترین بخش این ژن محسوب می‌شود. در تمام موارد بیماری های ارثی حاصل از پرایون، حداقل یک جهش در این جایگاه ژنی مشخص شده است (26). با مروری بر مطالعات پیشین می‌توان نتیجه گرفت که بروز جهش‌های گوناگون در این جایگاه ژنی، احتمالاً باعث تبدیل خود به خودی فرم نرمال (PrPc به فرم غیر نرمال (PrPSc پروتئین پرایون می‌شوند.

سه چند شکلی تک‌نوکلئوتیدی موجود دراگزون سه ژن پرایون گوسفندی، هم‌بستگی معنی‌داری را با مقاومت و حساسیت نسبت به این بیماری نشان دادند که این چندشکلی‌ها در کدون های 136 (آلانین به والین)، 154 (آرژنین به هیستیدین) و 171 (گلوتامین به آرژنین و هیستیدین) قرار دارند (7، 10، 20، 22). مطالعات نشان‌داده‌اند که گوسفندان دارای آلل ARR حساسیت کمی به بیماری اسکراپی داشته و هم‌چنین حضور آرژنین در کدون 171 با مقاومت بالا به این بیماری، رابطه مستقیم دارد (2، 3، 6). در نژادهایی که وفور VRQ بالا یا وفور ARQ کم باشد، حساسیت به بیماری بالا خواهد بود، ولی ARR باعث مقاومت به بیماری می‌شود (8). بنابراین در برنامه‌های اصلاح نژادی هدف این است که بُزها و گوسفندان دارای هاپلوتایپ VRQ حذف و ژنوتیپ ARR/ARR افزایش یابد (11). تا به‌حال در بُزها چندشکلی‌هایی در کدون‌های 21 (V –A)، 23 (L-P)، 49 (G-S)، 102 (W-G)، 110 (T-P)، 127 (G-S)،142 (I-M)، 146 (N-S)143 (H-R)،154 (R-H)، 168 (P-S) و Q)، 211 (R-Q)220 (Q-H)، 222 (Q-K)، 240 (S-P) موتاسیون‌های خاموش یا خنثی در کدون 42 (a-g)، 107 ،(g-a) 138 (c-t) و 207 (g-a) در ژن پرایون شناسایی شده است (1، 9، 18، 21) که برخی از این واریانت‌ها با حساسیت به این بیماری در بُزهای یونانی هم‌بسته بوده‌اند. علاوه‌بَر این، دو شکلی در کدون 142 هم‌بستگی معنی‌داری با تغییر دوره نهفتگی بیماری را نشان داد (18). اگرچه بیماری اسکراپی از مدت‌ها قبل کشف شده است (14) و سبب کاهش جمعیت گوسفند و بُز در چندین کشور شده است (13)، اما بررسی تنوع ژنتیکی ژن پرایون در بُزهای نژاد ایرانی هنوز موردِ بررسی قرار نگرفته است. لازم به‌ذکر می‌باشد که اگرچه تاکنون گزارش رسمی از این بیماری در ایران منتشر نشده ولی احتمال وجود این بیماری در کشور وجود دارد. از سوی دیگر با بررسی سوابق این بیماری و ضررهای وارده به صنعت دامپروری ناشی از این بیماریِ این امر حیاتی می‌باشد که گوسفندان و بُزهای نژادهای ایرانی از نظر حساسیت و مقاومت موردِ بررسی قرار گیرند، زیرا تاکنون هیچ روش درمانی برای این بیماری یافت نشده و می‌تواند خسارات جبران‌ناپذیری را به این صنعت وارد سازد. به‌کارگیری استراتژی‌های مناسب در برنامه‌های انتخاب و به‌نژادی می‌تواند در کاهش میزان خطرات احتمالی ناشی از بیماری مفید واقع شود. لذا با توجه به اهمیت این جایگاه و از سوی دیگر اهمیت پرورش جمعیت بُز و گوسفند که یکی از بخش‌های مهم دام‌پروری در ایران می‌باشد، انجام این قبیل پژوهش‌ها کاملاً ضروری به‌نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های خون، استخراج DNA و انجام PCR

نمونه های خون از 120 رأس بز نژاد نائینی (20رأس بُز نَر و 100رأس بُز ماده) که متعلق به دو گله مجزا (گله اول 50 رأس، گله دوم 70 رأس) بودند جمع‌آوری و استخراج DNA با استفاده از روش نمکی بهینه‌یافته صورت گرفت (25). برای تعیین ویژگی‌های کمی و کیفی DNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. در این مطالعه بخشی از اگزون سه جایگاه ژنی پرایون انتخاب و با یک جفت آغازگر اختصاصی قطعه‌ای به‌طول 198 جفت‌باز تکثیر شد. توالی آغازگرهای ژن پرایون شامل توالی رفت F: 5′- GCAGCTGGAGCAGTGGTAGG-3′ و توالی برگشت R: 5′- GATGTTGACACAGTCATGCAC -3′ بود (17). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم 20میکرولیتر شامل 10میکرولیتر مِسترمیکس PCR(2X) از شرکت آریاطوس (cat.no:C101081)، 100 نانوگرم DNA ژنومی و یک میکرولیتر از هر دو پرایمر رفت و برگشت (10pmol) و 5/6 میکرولیتر آب انجام گرفت. سپس چرخه‌های PCR با برنامه حرارتی شامل: 95 درجه سانتی گراد جهت واسرشته‌سازی اولیه DNA به مدت 300 ثانیه، واسرشت ثانویه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 30 ثانیه، دمای 58 درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگرها به‌مدت 30 ثانیه، دمای 72 درجه سانتی گراد جهت بسط آغازگرها به مدت 30 ثانیه به تعداد 35 چرخه و بسط نهایی به مدت 600 ثانیه در 72 درجه سانتی گراد انجام شد. برای آزمون صحت قطعه به‌دست آمده و هم چنین تعیین کمیت و کیفیت محصول PCR از ژل آگارز یک درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید به‌همراه نشانگر وزنی M100 شرکت فرمنتاز[1] استفاده شد.

تعیین ژنوتیپ با استفاده از روش PCR-SSCP

برای تعیین ژنوتیپ هر حیوان از تکنیک PCR-SSCP و الکتروفورز آن روی ژل پلی‌آکریل‌آمید استفاده شد. برای تک رشته‌سازی، پنج میکرولیتر از محصول PCR را با هشت میکرولیتر از بافر بارگذاری

1- Fermentas

مخصوص ژل آکریل‌آمید (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.025% bromophenol blue, and 0.025% xylene-cyanol) مخلوط و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر به‌مدت شش دقیقه با دمای 96درجه سانتی گراد حرارت داده شد. در این پژوهش از ژل آکریل‌آمید 14 درصد (5/38 : 1) استفاده شد. بعد از انجام الکترفورز محصولات PCR روی ژل آکریل‌آمید، از نیترات نقره برای رنگ‌آمیزی استفاده شد (12). در این پژوهش تعیین ژنوتیپ مستقیماً از روی ژل انجام و با شمارش مستقیم الگوهای باندی، فراوانی آللی و ژنوتیپی برآورد شد.

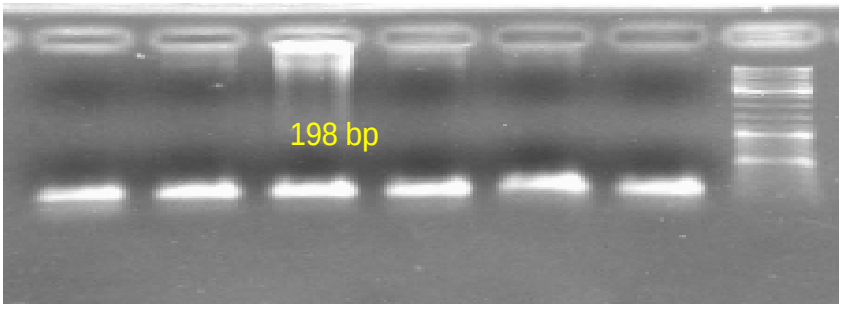
تعیین توالی قطعه تکثیری

جهت تأیید صحت الگوهای باندی حاصل از روش PCR-SSCP و هم‌چنین مشخص نمودن تنوع نوکلئوتیدی موجود در این جمعیت از هر ژنوتیپ یک نمونه برای تعیین توالی انتخاب و بعد از تکثیر این قطعات توسط واکنش زنجیره پلی‌مراز، توسط کیت تخلیص DNA شرکت Bioneer (Cat. No.: K-3034) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده خالص‌سازی صورت گرفت و برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره ارسال شد. توالی‌های به دست آمده از روش تعیین توالی مستقیم با استفاده از نرم‌افزارهای Chromas Pro و BioEdit مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای آنالیز توالی اسیدآمینه‌ای نیز از سایت Expasy (http://web.expasy.org/translate/) استفاده شد. برای بررسی آنالیز تعادل هاردی–واینبرگ نیز از آزمون کای دو در نرم‌افزار SAS 9.1 استفاده شد.

نتایج و بحث

تکثیر قطعه موردنظر و تعیین ژنوتیپ

در این پژوهش با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی، قطعه موردنظر از اگزون 3 جایگاه ژن پرایون به طول 198 جفت‌باز تکثیر شد. نمونه‌ای از محصولات PCR تکثیر شده در شکل 1 آمده است.



شکل 1- الگو باندی حاصل از تکثیر ژن پرایون از DNA ژنومی بُز
Figure 1- Amplification of PrP gene from goat genomic DNA

تعیین ژنوتیپ با استفاده از روش PCR-SSCP

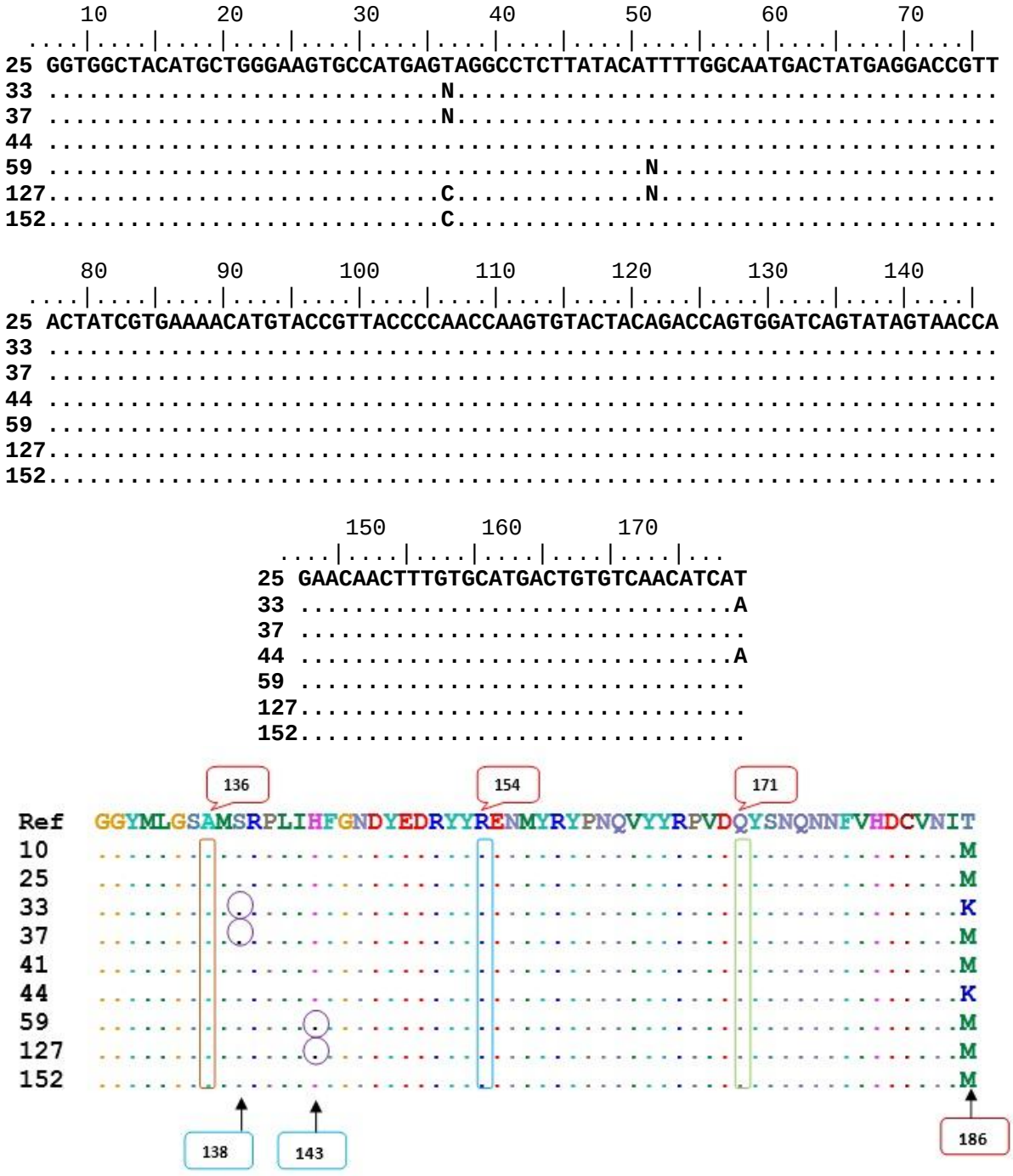
نتایج حاصل از آنالیز PCR-SSCP در جمعیت موردِ بررسی 9 الگوی باندی متفاوت را نشان داد که در ادامه، با روش تعیین توالی مستقیم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. هم‌چنین نتایج آزمون تعادل هاردی-واینبرگ نشان‌داد که جمعیت موردِ بررسی در تعادل هاردی-واینبرگ قرار ندارد که با توجه به وجود چندشکلی‌های به‌دست آمده نتایج این آزمون مورد تأیید قرار می‌گیرد، زیرا وجود جهش یکی از دلایل برهم‌زننده تعادل می‌باشد.

تعیین ژنوتیپ با استفاده از توالی‌یابی

برای تأیید و بررسی الگوهای به دست آمده از آنالیز PCR-SSCP، نمونه‌های دارای ژنوتیپ‌های متفاوت با استفاده از روش تعیین توالی مستقیم موردِ بررسی قرار گرفتند. سپس با استفاده از نرم‌افزارهای Chromas Pro و BioEdit توالی‌های به‌دست آمده مورد تجزیه و تحلیل و با کمک سایت Expasy (http://web.expasy.org/translate/) توالی زنجیره پروتئینی نیز به‌دست آمد.

در این پژوهش 9 الگوی باندی مختلف با استفاده از آنالیز PCR-SSCP مشاهده شد که نمایان‌گر چندشکلی در نوکلئوتیدهای 30 (c-t/c)، 45 (t-t/c) و 173 (c- a or t) بود. این چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی متناظر با کدون‌های 138 (موتاسیون خاموش،A-A)، کدون 143 (موتاسیون خاموش، S-S) و در نهایت کدون 186 یک تغییر اسیدآمینه ترئونین (Thr) به متیونین (M) یا لیزین (K) می‌باشد. لازم به‌ذکر است که نتایج تعیین توالی ژنوتیپ های 10 و 25 و 41 مشابه بود. در مطالعه پاپاساوا و همکاران (2007) در مجموع نه الگوی باندی مشاهده شد که ناشی از وجود چندشکلی در کدون های 146، 151، 154 و 168 بود. هم‌چنین، در کدون 146 دو چندشکلی جدید شناسایی شد که اولی باعث یک جانشینی در اسیدآمینه (N-D) و

دومی نیز باعث تغییر در توالی اسیدآمینه‌ای (N-S) شد.



شکل 2- نتایج آنالیز هم‌ترازی توالی DNA و پروتئینی جایگاه اگزون3 ژن پرایون در بُزهای نائینی

Figure 2- DNA and Protein Alignments of exon 3 in PrP gene in Naeinian goats

در مطالعه مذکور اسکراپی در بُزها با حضور اسیدآمینه‌های آسپارژین، آرژنین، آرژنین و پرولین به ترتیب در کدون های 146، 151، 154 و 168 هم‌بستگی معنی‌داری داشت (NN146RR151RR154PP168) (27).

مقاومت یا حساسیت به بیماری شدیداً به تغییرات در کدون‌های 136 (آلانین یا والین)، 154 (آرژنین یا هیستیدین) و 171 (آرژنین یا

گلوتامین یا هیستیدین) بستگی دارد (19). با توجه به اهمیت این جایگاه و هم‌چنین اثبات ارتباط این چندشکلی ها با میزان حساسیت یا مقاومت نسبت به بیماری اسکراپی در مطالعات گذشته، بررسی تمامی نوکلئوتیدها در این ناحیه بسیار مهم می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان‌داد که در جایگاه‌های 136، 154 و 171 تغییری در توالی اسیدآمینه‌ای صورت نگرفته و تنها هاپلوتیپ ARQ شناسایی شد. در مطالعه مرادی و همکاران (1390) که روی همین ناحیه (اگزون3 ژن پرایون) در گوسفند نژاد نائینی صورت گرفت در مجموع چهار هاپلوتیپ ARH، ARQ، ARR و AHQ و نه ترکیب ژنتیکی شامل ARR/AHQ، ARR/ARR، ARR/ARQ، ARQ/ARQ، AHQ/ARQ، AHQ/ARH، ARH/ARH، ARH/ARQ، ARQ/ARK شناسایی شد (24).

چندشکلی در جایگاه‌های H143H و (S138S) قبلاً گزارش شده است، اما چندشکلی در جایگاه (T186M or K) برای اولین بار در این پژوهش شناسایی شده است. در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی در کدون های 112، 136، 141، 154، 171، 231 و 241 ژن پرایون در 9 نژاد مختلف گوسفندان پاکستانی مورد آزمون قرار گرفت (4). نتایج مطالعه مذکور نشان‌داد که کدون‌های 112 (M-T)، 154(R-H) ، 171 (Q-R or H) و 231 (نوکلئوتید A یا C) چندشکل ولی کدون‌های 136 (A)، 141(L) و 241 (P) مونومورف بودند و در مجموع شش هاپلوتایپ و 18 ژنوتیپ شناسایی شد. هم‌چنین محققان بیان کردند که ژنوتیپ M112 A136 L141 R154 Q171 Ra231 P241 به‌دلیل این‌که در تمامی نژادها بیش‌ترین فراوانی را داشت، احتمالاً هاپلوتایپ اجدادی ژن پرایون می‌باشد که با نتایج پژوهش حاضر در کدون‌های 136، 141، 154 و 171 کاملاً مطابقت دارد (4) و در پژوهش حاضر تمامی نمونه‌ها، این ژنوتیپ مذکور را نشان دادند. آنالیز تنوع ژنتیکی ژن پرایون در بُزهای ایتالیایی وجود چندشکلی در کدون های G37V، T110P، H143R، R154H، Q222K و P240S و هم‌چنین موتاسیون‌های خاموشی را در کدون‌های 42، 138، 219 و 232 را نشان‌داد (32). تا به‌حال، چندشکلی R154H در بُزها گزارش شده است (9)، ولی هیچ تنوعی در کدون‌های 136 و 171 در این گونه ثبت نشده است. نتایج حاصل از تکثیر ژن PRP در جایگاه 136 با نتایج مطالعات گذشته کاملاً مطابقت دارد (33) و جایگاه 136 بدون تغییر ژنتیکی بوده و در همه نمونه‌ها به‌صورت هموزیگوت (AA) بود. براساس چندشکلی در کدون‌های 136، 154 و 171 (15) گوسفندان را به پنج گروه اصلی(R1-R5) NSP1-5، با توجه به مقاومت و حساسیت این ژنوتیپ‌ها نسبت به بیماری اسکراپی تقسیم‌بندی کردند. این گروه‌بندی به‌عنوان یک اصل کلی در طرح‌های ملی مربوط به کنترل و ریشه‌کنی بیماری اسکراپی در بریتانیا موردتوجه قرار می‌گیرد.

جدول 1- مقایسه گروه‌های ژنوتیپی جایگاه موردمطالعه در ژن پروتئین پرایون و عملکرد آن‌ها

Table 1- comparison of genotype groups in PrP gene and their functions

گروه ها Groups	ژنوتیپ‌ها Genotypes	عملکرد Function
NSP1	ARR/ARR	مقاومت بالا High Resistance
NSP2	ARR/AHQ, ARR/ARH, ARR/ARQ	مقاوم Resistance
NSP3	ARQ/ARH,ARQ/AHQ, AHQ/AHQ, ARH/ARH, AHQ/ARH, ARQ/ARQ	مقاومت کم Low Resistance
NSP4	ARR/VRQ	حساس Susceptible
NSP5	AHQ/VRQ, ARH,VRQ, ARQ/VRQ, VRQ/VRQ	حساسیت بالا High Susceptible

با توجه به نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ بُزهای موردِ بررسی در پژوهش حاضر (ARQ/ARQ)، به لحاظ پتانسیل ژنتیکی مقاومت کمی به بیماری دارند (NSP3) (جدول 1). تاکنون گزارش رسمی از مشاهده این بیماری در نژادهای ایرانی منتشر نشده است. نتایج پژوهش حاضر در مقایسه با سایر تحقیقات انجام شده تفاوت زیادی نداشته و هاپلوژنوتیپ (ARQ/ARQ) و هاپلوتیپ (ARQ) بالاترین وفور را داشته‌اند. از دلایل احتمالی فراوانی بالای این هاپلوتیپ و هاپلوژنوتیپ، می‌توان به هم‌بستگی این آلل با صفات مهم و اقتصادی اشاره کرد. براساس پژوهش‌های قبلی که در کشورهای مختلف انجام شده است، آلل ARQ به‌علت فراوانی زیاد به‌عنوان آلل وحشی پیشنهاد شد که این فرضیه با نتایج به‌دست آمده از این مطالعه قوت می‌گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

هر چند در مطالعه حاضر فرم‌های مختلف آللی در این جایگاه شناسایی شد، ولی جهت ارتباط این چند شکلی‌ها به‌ویژه چندشکلی جدید در کدون 186 نیازمند مطالعات بیشتری می‌باشد، زیرا فقدان

اطلاعات و دانش در ارتباط با تنوع ژنتیکی در این ژن و هم‌چنین هم‌بستگی این چندشکلی‌ها با بیماری پرایون در نژاد نائینی سبب می‌شود که با قطعیت نتوان یک استراتژی اصلاحی کاربردی در جهت افزایش میزان مقاومت بُزهای نژاد ایرانی ارائه داد و اقدامات مراقبتی و پیش‌گیرانه از سلامت فراورده‌ها و بُزهای نژادهای خارجی وادراتی و آمیخته‌گری این نژادها با بُزهای ایرانی می‌تواند خطر ابتلا به این بیماری را کاهش و از ورود ژنوتیپ‌های حساس به کشور جلوگیری کند.

منابع

1- Agrimi, U., M. Conte, L. Morelli, M. Di Bari, G. Di Guardo, C. Ligios, G. Antonucci, G. Aufiero, N. Pozzato, and F. Mutinelli. 2003. Animal transmissible spongiform encephalopathies and genetics. Veterinary research communications, 27(1):31-38.
2- Animal Health Australia. 2001. the National Animal Health Information System (NAHIS) Scrapie. http://www. Aahc.Com. au/nahis/disease/ dislist asp.
3- Arsac, J. N., O. Andreoletti, J. M. Bilheude, C. Lacroux, S. L. Benestad and T. Baron. 2007. Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. Emerging infectious diseases, 13(1):58.
4- Babar, M., A. Farid, B. Benkel, J. Ahmad, I. Sajid, M. Imran, T. Hussain and A. Nadeem. 2008. Genetic variability at seven codons of the prion protein gene in nine Pakistani sheep breeds. Journal of genetics, 87(2):187.
5- Baneh, H., M. Najafi and G. Rahimi. 2012. Genetic parameter estimates for early growth traits in Naeini goat. Animal Production Science, 52(11):1046-1051.
6- Baylis, M. and W. Goldmann. 2004. The genetics of scrapie in sheep and goats. Current molecular medicine 4(4):385-396.
7- Belt, P. B., I. H. Muileman, B. E. Schreuder, J. Bos-de Ruijter, A. L. 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(3):509-517.
8- Benestad, S., P. Sarradin, B. Thu, J. Schönheit, M. Tranulis and B. Bratberg. 2003. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. The Veterinary Record, 153(7):202-208.
9- Billinis, C., C. H. Panagiotidis, V. Psychas, S. Argyroudis, A. Nicolaou, S. Leontides, O. Papadopoulos and T. Sklaviadis. 2002. Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. Journal of General Virology, 83(3):713-721.
10- Bossers, A., B. E. Schreuder, I. H. Muileman, P. B. Belt and M. A. Smits. 1996. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. Journal of General Virology, 77(10):2669-2673.
11- Buschmann, A., G. Lühken, J. Schultz, G. Erhardt and M. H. Groschup. 2004. Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). Journal of General Virology, 85(9):2727-2733.
12- Byun, S., Q. Fang, H. Zhou and J. Hickford. 2009. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, 385(1):174-175.
13- Capucchio, M., F. Guarda, M. Isaia, S. Caracappa and V. d. Marco. 1998. Natural occurrence of scrapie in goats in Italy. Veterinary Record, 143(16):452-453.
14- Chelle, P. L. 1942. A case of trembling in the goat. Bull Acad Vet France, 15:294-295.
15- Dawson, M., L. Hoinville, B. Hosie and N. Hunter. 1998. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Veterinary Record, 142(23):623-625.
16- FAO. 2011. Statistical database, http://www.fao.org.
17- French, D. J., D. Jones, D. G. McDowell, J. A. Thomson and P. G. Debenham. 2007. Analysis of multiple single nucleotide polymorphisms closelypositioned in the ovine PRNP gene using linear fluorescent probes and melting curve analysis. BMC infectious diseases, 7(1):90.
18- Goldmann, W., T. Martin, J. Foster, S. Hughes, G. Smith, K. Hughes, M. Dawson and N. Hunter. 1996. Novel polymorphisms in thecaprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period. Journal of General Virology, 77(11): 2885-2891.
19- Hunter, N., J. Foster, W. Goldmann, M. Stear, J. Hope and C. Bostock. 1996. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheepoccurs only in specific PrP genotypes. Archives of virology, 141(5):809-824.
20- Hunter, N., W. Goldmann, G. Smith and J. Hope. 1994. The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. Archives of virology, 137(1-2): 171-177.
21- Kurosaki, Y., N. Ishiguro, M. Horiuchih and M. Shinagawa. 2005. Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan. Journal of veterinary medical science, 67(3): 321-323.
22- Laplanche, J., J. Chatelain, D. Westaway, S. Thomas, M. Dussaucy, J. Brugere-Picoux and J. Launay. 1993. PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis.

Genomics, 15(1): 30-37.
23- Laurén, J., D. A. Gimbel, H. B. Nygaard, J. W. Gilbert and S. M. Strittmatter. 2009. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-&bgr; oligomers. Nature, 457(7233): 1128-1132.
24- Moradi, N. 2012. the identification of polymorphisms in PrP gene by PCR-SSCP in Baluchi, Naieni and Zel sheep. . Dissertation, Sari agricultural science and natural resources University, Iran. (In Persian).
25- Najafi, M. 2012 Comparative analysis of gene structure in promoter site of alpha-s1 casein gene in naeinian goat and sheep breed. . MSc Thesis. Department of Animal Science, Sari Agricultural science and Natural Resources University, Iran, (In Persian).
26- Oesch, B., D. Westaway, M. Wälchli, M. P. McKinley, S. B. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow and L. E. Hood. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. Cell, 40(4):735-746.
27- Papasavva-Stylianou, P., M. Kleanthous, P. Toumazos, P. Mavrikiou and P. Loucaides. 2007. Novel polymorphisms at codons 146 and 151 in the prion protein gene of Cyprus goats, and their association with natural scrapie. The Veterinary Journal, 173(2):459-462.
28- Rashidi, A., S. Bishop and O. Matika. 2011. Genetic parameter estimates for pre-weaning performance and reproduction traits in Markhoz goats. Small Ruminant Research, 100(2):100-106.
29- Toumazos, P. 1988. First report of ovine scrapie in Cyprus. British Veterinary Journal, 144(1):98-100.
30- Toumazos, P. 1991. Scrapie in Cyprus. British Veterinary Journal, 147(2):147-154.
31- Toumazos, P. and M. Alley. 1989. Scrapie in goats in Cyprus. New Zealand veterinary journal, 37(4):160-162.
32- Vaccari, G., M. A. Di Bari, L. Morelli, R. Nonno, B. Chiappini, G. Antonucci, S. Marcon, E. Esposito, P. Fazzi and N. Palazzini. 2006. Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie. Journal of General Virology, 87(5):1395-1402.
33- Zhou, H., J. Hickford and Q. Fang. 2005. Technical Note: Determination of alleles of the ovine gene using PCR–single-strand conformational polymorphism analysis. Journal of animal science, 83(4):745-749.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 3, Fall 2016, p. 502-511

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 3، پاییز 1395، ص. 510-502

Identification of Different Allelic Variants of PrP Gene Effective on Scrapie in Naeinian Goats Breed

M. Najafi[1*]- S. H. Hafezian[2]- M. A. Rouhi[3]- M. Godarzi[3]

Received: 10-08-2015
Accepted: 08-02-2016

Introduction The accumulation of improperly folded forms of host-encoded cellular prion protein (PrPc) in the central nervous system (CNS) lead to a fatal neurodegenerative disease in sheep and goats, namely Scrapie. The application of genetic breeding programs to eradicate transmissible spongiform encephalopathies in goats is an important aim for reasons of animal welfare as well as human food safety and food security. Scrapie and scrapie-like diseases are associated with polymorphisms and mutations of the gene coding for PrP, a host neuronal membrane glycoprotein which is found in an aggregated form (scrapie-associated fibrils) in extracts of brain tissues from all mammals affected by these diseases. The different allelic forms of PrP gene have been shown to make animals variably susceptible to this disease. It has been established that presence of abnormal forms of the prion protein (PrP) is associated with scrapie. Several amino acid polymorphisms caprine PrP encoding genes have been reported to be associated with scrapie susceptibility. Sheep exposed to Scrapie have been shown to gain highest scrapie resistance in the presence of Q171R polymorphism and maximum scrapie susceptibility in the presence of A136V polymorphism. Based on A136V, R154H and Q171R/H polymorphisms and their five alleles (ARQ, VRQ, AHQ, ARR and ARH) sheep and goats can be classified into five groups (R1-R5). The most resistant genotype (R1) is ARR/ARR and the most susceptible genotypes (R5) are VRQ/VRQ, VRQ/ARQ, VRQ/ARH and VRQ/AHQ. Additionally, other caprine PrP polymorphisms I142M, H143R, N146S/D, R154H, R211Q and Q222K have been shown to be associated with low scrapie risk. Although scrapie is an animal health issue, its presence has not been investigated in Iranian goat breeds, where sheep and goats are major livestock species. Based on the positive impact of PrP genetics on sheep scrapie in Europe in the past decade, we have established caprine PrP gene variation in 120 Naeinian goats from the Isfahan, Iran to evaluation of genetic variation in this important region of PrP gene.

Material and Methods The DNA was extracted from 120 blood samples of Naeinian goats from Isfahan province using modified salting out method. After amplification of the desired fragment by polymerase chain reaction (PCR), genotyping of samples was carried out by PCR-SSCP Analysis (Single-Strand conformation Polymorphism). In the following, direct sequencing method was used to confirm the genotyping results. Obtained sequences were analyzed by Chromas Pro and BioEdit. In order to evaluate the amino acid polymorphisms caprine PrP encoding gene was used from Expasy server site. In addition, to evaluate the Hardy-Weinberg equilibrium, we used the chi square test in SAS 9.1 software. All statistical tests were considered significant with a level of $P \leq 0.05$.

Results and Discussion The results of the present study showed that nine binding patterns were observed at PrP locus in studied goat population. The results of direct sequencing were confirmed the PCR-SSCP analysis results. Genetic analysis on protein sequences revealed an amino acid polymorphism in codon 186 (T- M or K) and two silent polymorphisms in codons 138 and 143. Based on codons 136, 154 and 171, all goats showed ARQ haplotype and there is no variation in these three codons. Additionally, the results of Hardy-Weinberg test confirmed that this population was not compatible with the HWE ($P < 0.05$).

Conclusion It is noticed that all of polymorphisms in exon 3 of PrP gene are important and can be used to improve the breeding programs. According to three codon system (codons 136, 154 and 171), all of the studied goats had shown ARQ haplotype and based on previous studies, Naeinian goats probably have categorized in low resistance group (R3). Although, in this study was identified the allelic different forms in the mentioned region, association study between these polymorphisms, especially in 186 codon, with scrapie disease need to more investigation. Due to lack of information and knowledge about genetic variation in this gene and association of its polymorphisms with Scrapie disease could cause suggest an appropriate strategy for increase of

1 - PhD student in Animal Breeding and Genetic, SANRU, Iran,
2 - Associate professor in Animal Breeding and Genetic, SANRU, Iran,
3 - MSc Student in Animal Breeding and Genetic, SANRU, Iran.
(*Corresponding Author Email: Mojtaba_najafy@yahoo.com)

resistance in Iranian goat breeds, therefore, applying the appropriate strategy in the selection and breeding programs could be effective to reduce the risk of the disease and consequences events.

Keywords: Different Allelic Forms, Direct Sequencing, Naeinian goat, PCR-SSCP.