شناسایی پلی مورفیسم تک نوکلوتیدی (SNP) در سه جایگاه ژن پریون prp در میان جمعیت‌های گوسفندان مغانی و سنجابی به روشReal time PCR

کوروش جمعه خالدی*[1]، محمد حسین بنابازی[2]

۱. استادیار ژنتیک جانوری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرری
۲. استادیار بیوتکنولوژی، دانشکده بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

مکان انجام تحقیق: گروه بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، حیدر آباد کرج
مسئول مکاتبات: دکتر کوروش جمعه خالدی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر ری، پست الکترونیکی: k_khaledi2000@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۶ تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۲۷

چکیده

بیماری اسکراپی در گوسفندان، یک بیماری تحلیل‌برنده عصبی حاصل از ذرات پریونی است که علاوه بر اهمیت آن در ایجاد خسارات اقتصادی در صنعت گوسفندداری به واسطه مشابهت زیاد عامل آن با عامل بیماری‌های مشابه از جمله جنون گاوی، در سلامت عمومی جامعه از اهمیت خاصی بر خوردار است. از آنجایی که اثر چند شکلی در سه موقعیت (کدون ۱۳۶، ۱۵۴ و ۱۷۱) در داخل ژن پروتئین پریون بر روی میزان حساسیت به این بیماری به اثبات رسیده است، می‌توان ژنوتیپ‌های مقاوم‌تر به این بیماری را انتخاب و ژنوتیپ‌های حساس‌تر را حذف نمود. در این آزمایش، ۱۰ راس گوسفند مغانی و ۲۰ راس گوسفند سنجابی، مورد خون‌گیری قرار گرفت و از آن‌ها DNA استخراج گردید. با استفاده از روش Realtime PCR ، ژنوتیپ‌ها شناسایی گردید. نتایج آزمایش‌ها بیانگر آن است که در هر دو جمعیت مغانی و سنجابی در جایگاه‌های ۱۳۶ و ۱۵۴ هر کدام یک الل جدید و در جایگاه ۱۷۱ دو الل جدید مشاهده شده است. در جایگاه ۱۳۶ ، سه ژنوتیپ ممکن (AA, AV, VV) در هر دو جمعیت مشاهده شد. در صورتی که در جایگاه ۱۵۴، دو ژنوتیپ (RH, HH) در مغانی و هر سه ژنوتیپ ممکن (RR, RH, HH) در سنجابی مشاهده گردیده و همچنین در جایگاه ۱۷۱ از شش ژنوتیپ ممکن (RR, HH, QQ, RH, RQ, QH) ژنوتیپ‌های RR و QH در جمعیت مغانی و ژنوتیپ QH در جمعیت سنجابی مشاهده نگردیدند. همچنین نتایج بیانگر آن است که هاپلوتیپ‌های AHR, ARR, ARQ, AHR, AHQ, VRR, AHH, AHQ, VRQ, VHR, VHH, VHQ در جمعیت مغانی و هاپلوتیپ‌های VRH, VRQ, VHH, VHQ در جمعیت سنجانی مشاهده گردیده است. اگر چه بعضی از گروه‌های ژنوتیپی مانند VRQ/VRQ بعنوان گروه‌های هاپلوتیپی بسیار حساس به بیماری اسکرپی بر مبنای طرح ملی اسکراپی بریتانیا در جمعیت سنجابی دیده شده است، ولی برای ارائه نتایج دقیق‌تر، همه هاپلوتیپ‌ها را باید در معرض پاتوژن قرار داد و میزان مقاومت را اندازه‌گیری نمود.

واژه‌های کلیدی: پلی مورفیسم، ژن پریون، گوسفند مغانی، سنجابی، Realtime PCR

مقدمه

پرورش گوسفند و استفاده از فرآورده‌های متنوع آن در ایران به دلایل مختلف، از جمله موقعیت منطقه‌ای و شرایط آب و هوایی و وجود مراتع با درجات مختلف و توجه مردم به این حیوان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. شناسایی و

کنترل بیماری‌های گوسفند، به ویژه بیماری‌های مشترک با انسان و بیماری‌هایی که در سلامت عمومی جامعه نقش دارند، بخش مهمی از مدیریت پرورش دام را شامل می‌شود. بیماری اسکراپی، نوعی بیماری تحلیل‌برنده عصبی حاصل از ذرات پریونی است که می‌تواند علاوه بر خسارت به گله‌های مبتلا، زمینه شیوع بیماری‌های مشابه از جمله جنون گاوی را در دام‌های بزرگ فراهم آورد. منابع مختلف، تمام نقاط دنیا به جز استرالیا و نیوزلند را آلوده به این بیماری می‌دانند، ولی هیچ آمار دقیقی از شیوع و ابتلا به این بیماری در ایران وجود ندارد. تصور می‌شود با توجه به مشابهت علایم این بیماری با بیماری‌های شایع‌تر، مواردی از این بیماری به اشتباه گزارش داده می‌شود. همچنین، تشخیص تکمیلی و تایید تشخیص این بیماری به تست‌های پاتولوژیکی گران، دشوار و زمان‌بر نیاز دارد که با توجه به عدم دسترسی اکثر گوسفندداران ایرانی به چنین تست‌هایی، امکان انجام این تست‌ها در اکثر نقاط ایران وجود ندارد. بیشتر محققین معتقدند که عامل ایجادکننده اسکراپی، یک شکل غیرطبیعی از پروتئین پریون طبیعی سلولی است که به عنوان PrP اسکراپی شناخته می‌شود (۱، ۲). پروتئین پرایون سلولی طبیعی یا PrP سلولی، در تمام بافت‌ها یافت می‌شود. Stanly Prusiner به خاطر مطالعاتش در جهت تأیید این تئوری، جایزه نوبل دریافت نمود (۳). مبنای این تئوری آن است که یک پروتئین پریون که به‌طور غیرطبیعی تغییر یافته است (PrPsc) به‌عنوان الگو برای تغییر شکل هندسی پروتئین پریونی طبیعی سلولی (PrPsc) ممکن است در سیستم عصبی، طحال، گره‌ای لنفاوی، جفت، روده، خون، لوزالمعده، تخمدان و کبد گوسفند مبتلا یافت شود. در یک جمع‌بندی می‌توان گفت اسکراپی، نوعی بیماری عفونی است. یک دام حساس بایستی در تماس با عامل بیماری باشد تا مبتلا شود. اسکراپی در هر گوسفندی و با هر ژنوتیپی، در صورتی که در معرض عامل عفونی نباشد، روی نمی‌دهد. ولی وقتی گوسفند در معرض عامل قرار می‌گیرد، آنگاه ژنوتیپ حیوان بر سرنوشت آن مؤثر خواهد بود (۴). چندشکلی‌های مختلفی تاکنون در ژن پریون شناسایی شده‌اند که بر حساسیت به اسکراپی نیز تأثیر دارند (۸-۵). اگرچه عموما چندشکلی‌های ژنی بر روی پروتئین‌ها اثر کوچکی خواهند داشت، ولی چندشکلی پروتئین پریون طبیعی اثری عمیق بر حساسیت به اسکراپی نشان داده است (۹).

با توجه به رابطه اثر چندشکلی در ژن پروتئین پریون با میزان حساسیت به این بیماری، می‌توان ژنوتیپ‌های مقاوم‌تر به این بیماری را انتخاب و ژنوتیپ‌های حساس‌تر را حذف نمود. بررسی چندشکلی در داخل ژن پروتئین پریون به کمک روش‌های ژنتیک مولکولی امکان‌پذیر است. این روش-ها علاوه بر این که ارزان‌تر و دقیق‌تر از روش‌های تشخیص و مبارزه با بیماری اسکراپی هستند، امکان شناسایی و حذف زود هنگام ژنوتیپ‌های حساس را نیز فراهم می‌سازند و از این رو، به ریشه‌کنی سریع‌تر، ارزان‌تر و آسان‌تر بیماری کمک می‌کنند. ژنی که پروتئین پریون طبیعی را کُد می‌کند در کدون‌های ۱۳۶، ۱۵۴و ۱۷۱ چندشکلی دارد (۱۰). تا این زمان، هیچ چندشکلی در بز شناسایی نشده است. بنابراین، فرض بر آن است که تمامی بزها حساسیت یکسان دارند (۱۱). کدون ۱۳۶، اسید آمینه والین (V) و یا آلانین (A) را کد می‌کند (۱۲، ۱۳). کدون ۱۵۴ ، اسید آمینه هیستیدین (H) و یا آرژنین (R) را کُد می‌کند (۱۴). کدون ۱۷۱ ، گلوتامین (Q)، آرژنین (R)، لیزین (K) یا هیستیدین (H) را کُد می‌کند (۱۵).

در بعضی کشورهای پیشرفته از جمله ایالات متحده و اتحادیه اروپا، اقدام به طراحی و اجرای برنامه‌های ریشه‌کنی اسکراپی در مدت زمان‌های کوتاه بر مبنای شناسایی و انتخاب به نفع ژنوتیپ‌های مقاوم‌تر نموده‌اند. انتخاب ژنتیکی، به‌عنوان ابزاری اولیه برای کنترل اسکراپی در هلند و انگلستان مورد استفاده قرار می‌گیرد. در ایالات متحده برای تعیین این که کدام حیوانات در معرض خطر بایستی حذف شوند یا در گله‌های تحت‌تأثیر محدود شوند و کدام‌ها آزادند تا بدون محدودیت حرکت نمایند، از آزمون ژنتیکی استفاده می‌شود (۱۶).

از آنجایی که آمار دقیقی از موارد ابتلا به اسکراپی در نژادهای ایرانی گزارش نشده است و نیز امکان ایجاد این بیماری در شرایط آزمایشی و سنجش میزان مقاومت حیوانات وجود ندارد، تحقیق حاضر نظر دارد چند شکلی‌هایی را که ارتباط آن‌ها با حساسیت به اسکلراپی به

اثبات رسیده است، در نژادهای مغانی و سنجابی مورد بررسی قرار دهد تا در صورت مشاهده الل‌های مختلف این ژن در آینده با طراحی برنامه‌های انتخاب ژنتیکی برای مقابله با بیماری اسکراپی در کشور اقدام گردد و تکثیر الل-های حساس، کنترل گردد.

مواد و روش‌ها

با توجه به فراوانی و اهمیت دو نژاد سنجابی و مغانی در کشور، از دو جنس مختلف این دو نژاد، ۱۰ راس از جمعیت مغانی و ۲۰ راس از جمعیت سنجابی انتخاب شدند و نمونه-های خون کامل از سیاهرگ وداج و با استفاده از لولهٔ خلاء ۷ میلی‌لیتری حاوی ماده ضد انعقاد EDTA تهیه گردید. سپس نمونه‌های خون کامل بلافاصله در داخل یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل، به روش بهینه‌شده و تغییریافته استخراج نمکی انجام شده است. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری سنجیده گردید. در این مطالعه با استفاده از آزمایش‌های انجام شده در جمعیت‌های مختلف گوسفندان (۱۲) یک جفت آغازگر در آزمایش مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱) و با روش Realtime PCR (۱۳) یک قطعه ۱۸۰ جفت بازی از اگزون ۳ ژن PrP شامل کدون‌های ۱۳۶، ۱۵۴ و ۱۷۱، با استفاده از ترکیبات جداول ۲ و ۳ تکثیر گردید و سپس چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی در محل کدون‌های مذکور با استفاده از ۷ کاوشگر TaqMan® اختصاصی نشاندار شده فلورسنتی (جدول ۴) بررسی و تعیین ژنوتیپ گردید. تمامی TaqMan® ها از طریق کروماتوگرافی مایع با قابلیت بالا (HPLC) خالص گردیده‌اند.

جدول ۱ - توالی آغازگرها قطعه ۱۸۰ جفت بازی اگزون ۳ ژن پریون.

آغازگر	توالی (5' →3')	طول (bp)
Forward primer	GCCTTGGTGGCTACATG	17
Reverse primer	CTGTGATGTTGACACAGTCAT	21

جدول ۲- شرایط بهینه شده برای واکنش‌های PCR.

اجزای واکنش	غلظت نهایی
PCR بافر	X۱
$MgCl_2$	۳ میلی مولار
هر یک از آغازگرها و کاوشگرها	۰/۴ میکرومولار
dNTPs	۸۰۰ میکرومولار
آنزیم تک پلیمراز	۰/۳۷۵ واحد
الگو DNA	تقریبا ۱۵۰ نانوگرم
حجم نهایی واکنش	۱۵ میکرولیتر

جدول۳- برنامه حرارتی بهینه PCR

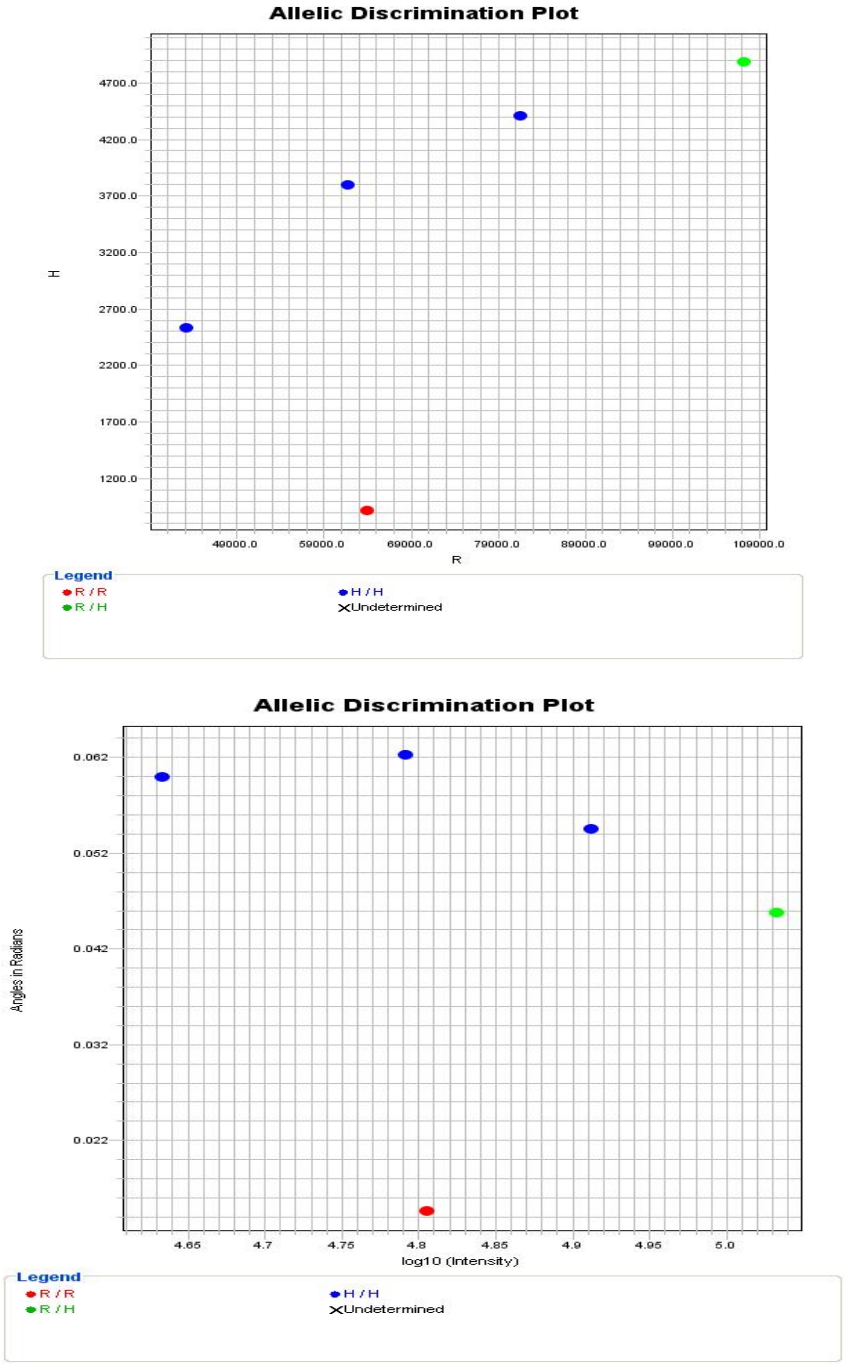
	مراحل PCR	درجه حرارت ($^{\circ}C$)	زمان
۱	واسرشته سازی اولیه	۹۵	۳ دقیقه
۲	واسرشته سازی	۹۵	۲۰ ثانیه
۳	اتصال آغازگر و کاوشگر و بسطAnnealing-Elongation	۶۲	۴۰ ثانیه

توضیح: مراحل ۲ و ۳، چهل بار تکرار می شود.

جدول ۴- توالی کاوشگرهای TaqMan® نشاندار شده فلورسنتی جهت شناسایی چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی در محل کدون‌های ۱۳۶، ۱۵۴و ۱۷۱ از ژن PrP گوسفند.

کاوشگر	توالی (5' → 3')	طول (bp)
A136-probe	FAM- TGCTCATGGCACTTCCCA - TAMRA	18
V136-probe	VIC- CTGCTCATGACACTTCCCAG - TAMRA	20
R154-probe	FAM- CCGTTACTATCGTGAAAACATGTAC - TAMRA	25
H154-probe	VIC- CCGTTACTATCATGAAAACATGTACC - TAMRA	26
R171-probe	FAM- CCAGTGGATCGGTATAGTAACCA - TAMRA	23
H171-probe	HEX- AGACCAGTGGATCATTATAGTAACCA - TAMRA	26
Q171-probe	Cy5- CCAGTGGATCAGTATAGTAACCAGA - TAMRA	25

استفاده از دستگاه ABI 7500 (Applied Biosystems, USA)، سه واکنش Real-time PCR (به ازای هر کدون مورد نظر یک واکنش) به ترتیب با شرایط و چرخه‌های دمایی تنظیم شده انجام گردید. میزان فلورسنس حاصل از تخریب کاوشگرهای دوطرف نشاندار در هر سیکل در پایان مرحله اتصال اندازه‌گیری شد. نمودارهای تکثیر توسط نرم‌افزار دستگاه، ترسیم گردید. ژنوتیپ هر فرد به طور خودکار توسط دستگاه تعیین شد. همچنین، هر ژنوتیپ از روی نمودار مربوط به هر یک از دو آلل تایید گردید. با توجه به وجود ۳ آلل متفاوت در کدون ۱۷۱ (آلل-های R, H و Q) و از آن جایی که برنامه تعیین ژنوتیپ تعبیه شده در نرم‌افزار دستگاه تنها امکان تعیین ژنوتیپ‌های احتمالی برای یک جایگاه با دو آلل را دارد می‌بایست پس از انجام یک واکنش Realtime PCR شامل هر سه کاوشگر به طور هم‌زمان، تعیین ژنوتیپ سه بار (برای انواع ترکیبات دو به دوی سه آلل مذکور شامل R با H، R با Q و H با Q) صورت می‌گرفت. به منظور تایید نتایج تعیین ژنوتیپ خودکار به روش Realtime PCR، با استفاده از یکی از آغازگرهای به کار رفته در واکنش‌های Realtime PCR (آغازگر پیش‌رو یا پس‌رو) به طور تصادفی برخی از نمونه‌ها به روش توالی‌یابی مستقیم و با استفاده از دستگاه Genetic Analyzer ABI 3130 مجددا تعیین ژنوتیپ شدند. فراوانی آللی (انواع جابه جایی بازهای آلی در هر کدون)، فراوانی ژنوتیپی (ترکیب آللی هر فرد در هر کدون)، فراوانی هاپلوتیپی (ترکیب نوکلئوتیدی هر فرد به ازای هر ۳ جایگاه) و فراوانی گروه هاپلوتیپی (ترکیب هاپلوتیپی هر فرد) از طریق شمارش، محاسبه گردید. در نمودار ۱ نمونه‌ای از گزارش مربوط به تعیین ژنوتیپ خودکار برای کدون ۱۵۴ در ۵ فرد از جمعیت گوسفندان نشان داده شده است.



نمودار ۱- نمونه‌ای از گزارش مربوط به تعیین ژنوتیپ خودکار برای کدون ۱۵۴ در ۵ فرد از جمعیت گوسفندان.

نتایج

پس از آن که تک‌تک افراد مورد مطالعه برای جایگاه‌های (کدون‌ها) مورد بررسی به‌طور جداگانه ژنوتیپ‌یابی شدند، فراوانی آللی (انواع جابه‌جایی بازهای آلی در هر کدون)، فراوانی ژنوتیپی (ترکیب آللی هر فرد در هر کدون)، فراوانی هاپلوتیپی (ترکیب نوکلئوتیدی هر فرد به ازای هر ۳ جایگاه) و فراوانی گروه هاپلوتیپی (ترکیب هاپلوتیپی هر فرد) از طریق شمارش مستقیم، محاسبه گردید.

نتایج تحقیق نشان می‌دهد که در کدون ۱۳۶، یک تغییر تک‌نوکلوتیدی که منجر به تغییر اسیدآمینه آلانین به

والین می‌شود (۱۴) در هر دو جمعیت سنجابی و مغانی دیده می‌شود و همچنین در جایگاه کدون ۱۵۴، یک تغییر تک نوکلوتیدی که منجر به تغییر اسیدآمینه آرژنین به هیستیدین می‌شود (۱۱) در هر دو جمعیت مشاهده می‌شود و در مورد جایگاه ۱۷۱ نیز دو تغییر تک‌نوکلئوتیدی که باعث تغییر کدون گلوتامین به لیزین و یا هیستیدین می‌گردد (۱۵) در هر دو جمعیت سنجابی و مغانی مشاهده گردید (جدول ۵).

جدول ۵- تعداد و فراوانی آللی به ازای هر کدون.

	کدون ۱۳۶		کدون ۱۵۴		کدون ۱۷۱		
	A	V	R	H	R	Q	H
سنجابی	۱۶	۲۴	۱۷	۲۳	۱۲	۲۰	۸
	(۰/۴۰۰)	(۰/۶۰۰)	(۰/۴۲۵)	(۰/۵۷۵)	(۰/۳۰۰)	(۰/۵۰۰)	(۰/۲۰۰)
مغانی	۵	۱۵	۳	۱۷	۳	۱۰	۷
	(۰/۲۵۰)	(۰/۷۵۰)	(۰/۱۵۰)	(۰/۸۵۰)	(۰/۱۵۰)	(۰/۵۰۰)	(۰/۳۵۰)

جدول ۶- تعداد و فراوانی ژنوتیپی به ازای هر کدون (ژنوتیپ در هر جایگاه).

	کدون ۱۳۶			کدون ۱۵۴			کدون ۱۷۱					
	AA	AV	VV	RR	RH	HH	RR	HH	QQ	RH	RQ	QH
سنجابی	۷ (۰/۳۵۰۰)	۲ (۰/۱۰۰۰)	۱۱ (۰/۵۵۰۰)	۴ (۰/۲۰۰۰)	۹ (۰/۴۵۰۰)	۷ (۰/۳۵۰۰)	۴ (۰/۲۰۰۰)	۳ (۰/۱۵۰۰)	۹ (۰/۴۵۰۰)	۲ (۰/۱۰۰۰)	۲ (۰/۱۰۰۰)	۰
مغانی	۱ (۰/۱۰۰۰)	۳ (۰/۳۰۰۰)	۶ (۰/۶۰۰۰)	۰	۳ (۰/۳۰۰۰)	۷ (۰/۷۰۰۰)	۰	۳ (۰/۳۰۰۰)	۴ (۰/۴۰۰۰)	۱ (۰/۱۰۰۰)	۲ (۰/۲۰۰۰)	۰

جدول ۷- تعداد و فراوانی هاپلوتیپی (آللی).

	ARR	ARH	ARQ	AHR	AHH	AHQ	VRR	VRH	VRQ	VHR	VHH	VHQ
سنجابی	۳ (۰/۰۷۵۰)	۰	۳ (۰/۰۷۵۰)	۳ (۰/۰۷۵۰)	۰	۷ (۰/۱۷۵۰)	۳ (۰/۰۷۵۰)	۵ (۰/۱۲۵۰)	۶ (۰/۱۵۰۰)	۰	۶ (۰/۱۵۰۰)	۴ (۰/۱۰۰۰)
مغانی	۰	۰	۰	۲ (۰/۱۰۰۰)	۱ (۰/۰۵۰۰)	۲ (۰/۱۰۰۰)	۰	۰	۱ (۰/۰۵۰۰)	۳ (۰/۱۵۰۰)	۴ (۰/۲۰۰۰)	۷ (۰/۳۵۰۰)

جدول ۸- تعداد و فراوانی گروه‌های هاپلوتیپی (ژنوتیپی).

	AHQ/AHQ	ARQ/AHQ	VRQ/VHQ	VHQ/VHQ	AHH/VHH	AHR/AHQ	ARR/VRR	AHR/AHR	VHH/VHH	VHR/VHQ	VRQ/VRQ
سنجابی	۱ (۰/۰۵)	۳ (۰/۱۵)	۲ (۰/۱۰)	۱ (۰/۰۵)	۰	۱ (۰/۰۵)	۱ (۰/۰۵)	۱ (۰/۰۵)	۲ (۰/۱۰)	۰	۲ (۰/۱۰)
مغانی	۱ (۰/۱۰)	۰	۱ (۰/۱۰)	۲ (۰/۲۰)	۱ (۰/۱۰)	۰	۰	۰	۰	۲ (۰/۲۰)	۰

	ARR/AHQ	VRH/VHH	ARH/VHH	ARR/VRR
سنجابی	۱ (۰/۰۵)	۲ (۰/۱۰)	۰	۱ (۰/۰۵)
مغانی	۰	۱ (۰/۱۰)	۲ (۰/۲۰)	۰

بحث

با وجود روش‌های متفاوت شناسایی چندشکلی در جایگاه‌های مختلف توالی ژن‌ها، استفاده از روش Realtime PCR از سرعت و دقت بالایی برخوردار است. تاکنون مطالعه و تحقیقی بر روی بیماری اسکراپی در گوسفندان ایرانی گزارش نشده است و نتایج این تحقیق می‌تواند به عنوان اولین مطالعه مرتبط با این بیماری باشد که بر روی ژن پریون در دو جمعیت از گوسفندان ایرانی انجام شده است. از آن جایی که رابطه ژنوتیپ جایگاه ژن prp با حساسیت به این بیماری، تایید شده است (۱۶) نتایج این گونه تحقیقات می‌تواند در برنامه‌های پیش‌گیری و کنترل بیماری در آینده مورد استفاده قرار گیرد. از سوی دیگر، به علت بالا بودن هزینه‌های آزمایش‌های مولکولی، رعایت تعداد مناسب آزمایش‌هایی که نتایج دقیق داشته باشند، از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا، اگر چه تعداد نمونه‌ها در این آزمایش کم بوده است، ولی از آن جایی که در هر دو نژاد سنجابی و مغانی، هر هفت نوع الل برای مجموع سه جایگاه دیده شده است، احتمال مشاهده تمام انواع ژنوتیپ‌ها برای هر جایگاه و همچنین هاپلوتیپ‌های مختلف هر دام برای مجموع سه جایگاه وجود دارد. اگر چه ژنوتیپ RR برای کدون ۱۵۴ و ژنوتیپ RR و QH برای کدون ۱۷۱ در جمعیت مغانی و همچنین QH کدون ۱۷۱ در جمعیت سنجابی مشاهده نشده است، بدون شک اگر تعداد نمونه‌های آزمایشی افزایش داده شود، شانس مشاهده این ژنوتیپ‌ها افزایش خواهد یافت.

در مقایسه گروه‌های هاپلوتیپی در دو جمعیت دام‌های مورد آزمایش با ژنوتیپ‌های معرفی شده مقاوم به اسکراپی و یا حساس به بیماری (۱۷) ژنوتیپ‌های مقاوم در بین دو جمعیت مشاهده نگردید، ولی بعضی از ژنوتیپ‌های کمیاب مانند AHQ/AHQ در هر دو جمعیت مشاهده شد، از طرفی، ژنوتیپ بسیار حساس VRQ/VRQ نیز در جمعیت سنجابی مشاهده گردید. به طور کلی با توجه به مشاهده همه الل‌های مورد نظر در سه جایگاه، مشاهده انواع ژنوتیپ‌های مقاوم، حساس و یا بسیار حساس در بین جمعیت این نژادها غیرممکن به نظر نمی‌رسد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود اولا برنامه‌هایی برای اصلاح نژاد با هدف حداقل‌نمودن خطر اسکراپی و جنون گاوی احتمالی، از طریق انتخاب ژنوتیپی در بین این دو نژاد اجرا شود. ثانیاً، برای مشاهده همه انواع ژنوتیپ‌های احتمالی، تعداد نمونه-های آزمایشی افزایش یابد. ثالثاً، برای سنجش دقیق میزان مقاومت ژنوتیپ‌ها بعد از شناسایی آن‌ها از روش‌های پاتولوژیک (Challenging) استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان، از شورای پژوهشی دانشگاه آزاد شهرری جهت تامین بودجه پژوهش و از زحمات بی‌دریغ اعضای هیات علمی و کارشناسان موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، به ویژه بخش بیوتکنولوژی موسسه، نهایت تشکر و امتنان را دارند.

منابع مورد استفاده

1. Drogemuller, C., Leeb, T., Distl, O., 2001. PrP genotype frequencies in German breeding sheep and the potential to breed for resistance to scrapie. Veterinary Record 149: 349–352.
2. Gombojav, A., Ishiguro, N., Horiuchi, M., Shinagawa, M., 2004. Unique Amino Acid Polymorphisms of PrP Genes in Mongolian Sheep Breeds. Journal of Veterinary Medical Science 66: 1293–1295.
3. Hagenarrs, H. T., Melchior, B. M., Bossers, A., Davidse, A., Engel, B., Zijderveld, G. F., 2010. Scrapie prevalence in sheep of susceptible genotype is declining in a population subject to breeding for resistance. BMC Veterinary Research 6: 25-31.
4. Hunter, N., 2000. Transmissible spongiform encephalopathies. In Breeding for Disease Resistance in Farm Animals, pp. 325–339. Edited by R.F.E. Axford, S.C. Bishop, F.W. Nicholas and J.B. Owen. Wallingford, UK, CAB International.
5. Hunter, N., Moore, L., Hosie, B. D., Dingswall, W. S., Greig, A., 1997. Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. Veterinary Record 140: 59-63.

6. Johnson, M. L., Evoniuk, J. M., Stoltenow, C. L., O'Rourke, K. I., Redmer, D. A., 2007. Development of an assay to determine single nucleotide polymorphisms in the prion gene for the genetic diagnosis of relative susceptibility to classical scrapie in sheep. J Vet Diagn Invest 19: 73–77.
7. L'Homme, Y., Leboeuf, A., Cameron, J., 2008. PrP genotype frequencies of Quebec sheep breeds determined by real-time PCR and molecular beacons. The Canadian Journal of Veterinary Research 72: 320–324.
8. Loftus, B., Monks, E., Hanlon, J., Weavers, E., Rogers, M., 1999. Prion protein genotypes of Suffolk-type sheep representative of natural scrapie in Ireland. Irish Vetetrinary Journal 52: 81-85.
9. Van, M., Poucke, J., Vandesompele, M., Van, A., Zeveren, S., Luc, J., Peelman, F., 2005. A dual fluorescent multiprobe assay for prion protein genotyping in sheep. BMC Infectious Diseases 11: 5-13.
10. McKay, J. T., Brigner, T. A., Caplin, B. E., McCurdy, K. S., Forde, R. L., 2008. A real-time polymerase chain reaction assay to detect single nucleotide polymorphisms at codon 171 in the prion gene for the genotyping of scrapie susceptibility in sheep. J Vet Diagn Invest 20: 209–212.
11. O'Doherty, E., Aherne, M., Ennis, S., Weavers, E., Hunter, N., Roche, J. F., Sweeney, T., 2000. Detection of polymorphisms in the prion protein gene in a population of Irish Suffolk sheep. Veterinary Record 146: 335-338.
12. Prusiner, S. B., Scott, M. R., Deamond S. J., Cohen, F., 1998. Prion protein biology. Cell 93: 337–348.
13. Smits, M. A., Bossers, A., Schreuder, B., 1997. Prion protein and scrapie susceptibility. Veterinary Quarterly 19: 101-105.
14. Stephens, A., Wansg, S., Holyoak, G. R., Timofeevskaia, O., Shay, T. L., Vernon, W., Ellis, S., Beever, J., Cockett, N., 1998. Characterization of the Prion Protein (PrP) Gene in Ten Breeds of Sheep. Proceedings of the Plant and Animal Genome VI Conference, 18–22 January.
15. Thorgeirsdottir, S., Sigurdarson, S., Thorisson, H. M., Georgsson, G., Palsdottir, A., 1999. PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. Journal of General Viroogyl 80: 2527–2534.
16. Van, M., Vandesompele, M., Mattheeuws, A., Zeveren, S., Peelman, L. J., 2005. A dual fluorescent multiprobe assay for prion protein genotyping in sheep. BMC Infectious Diseases 5: 13-20.
17. Yuzbasiyan-Gurkan, V., Krehbiel, J. D., Cao, Y., Venta, P. J., 1999. Development and usefulness of new polymerase chain reaction-based test for detection of different alleles at codons 136 and 171 of theovine prion protein gene. American Journal of Veterinary Research 60: 884–887.