

بررسی پلی مورفیسم کدون ۱۳۶ (A-V) و کدون ۱۷۱ (H-Q-R) برای ارزیابی ابتلای به اسکرپی در گوسفندان اکوتیپ ماکویی

سیامک سلامی^{۱*}، رضا اشرفی زاده^۲، حسین قهرمانی^۳ و امیر امنیت طلب^۴

^۱ دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

^۲ دانش آموخته دکترای حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران

^۳ دانش آموخته دکترای تخصصی بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

^۴ دانشیار، گروه آسیب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران

پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۳۰

دریافت: ۱۳۹۹/۳/۳

چکیده

بیماری‌های پریونی در دام می‌توانند خطر بالقوه‌ای برای انسان محسوب شوند. نژاد ماکویی از منابع مهم پروتئین در کشور می‌باشد. در این مطالعه وضعیت پلی مورفیسم کدون‌های ۱۳۶ و ۱۷۱ پروتئین‌های پریونی و ژنوتیپ‌های حاصل از آن در گوسفندان اکوتیپ ماکویی بررسی شد. از ۶۰ گوسفند ماکویی نمونه‌ی خون وریدی تهیه و DNA استخراج شد. پلی مورفیسم کدون ۱۳۶ (A-V) و کدون ۱۷۱ (H-Q-R) به طریق PCR با پرایمر اختصاصی بررسی گردید. نتایج نشان داد که در کدون ۱۳۶ آلل A (۶۵ درصد) به شکل معنی‌داری بیشتر از آلل V (۳۵ درصد) است. ژنوتیپ AA (۴۶٪/۶۷) نیز شایع‌ترین ژنوتیپ مشاهده شده بود. در کدون ۱۷۱ نیز آلل‌های Q و R به شکل معنی‌داری بیشتر از آلل H می‌باشد. به علاوه آلل R نیز به صورت معنی‌داری کمتر از آلل Q است. آلل Q (۵۸٪/۳۳) و ژنوتیپ QQ (۴۰ درصد) شایع‌ترین آلل و ژنوتیپ بودند. در مجموع می‌توان نتیجه‌گیری کرد که برنامه‌ریزی کنترل مؤثر اصلاح نژاد و ریشه‌کنی موفقیت-آمیز ژنوتیپ‌های مستعد به بیماری اسکرپی در نژاد گوسفندان اکوتیپ ماکویی ایرانی امکان‌پذیر نخواهد بود مگر این که حساسیت ژنوتیپ‌های مختلف در نژادهای گوسفند ماکویی مشخص شود.

کلمات کلیدی: بیماری پریونی، اسکرپی، اکوتیپ ماکویی، پروتئین مقاوم به پروتئاز، ژنوتیپ

مقدمه

انواعی از اختلالات کشنده سیستم عصبی مرکزی می‌شوند. شکل جهش یافته‌ی پروتئین پریون (PrP^{sc}) قادر است که پروتئین طبیعی پریونی (PrP^c) را وادار سازد تا به شکل غیرطبیعی در آمده و به فرم بیماری‌زا مبدل شوند (Pandeya et al., 2010; Scheckel & Aguzzi, 2018;)

پریون‌ها یا ذرات پروتئینی عفونی، فرم تغییر یافته و غیرطبیعی نوعی پروتئین در غشای سلول‌های مغزی هستند. این اجزای پروتئینی به دو فرم طبیعی (PrP^c) و جهش یافته (PrP^{sc}) دیده می‌شوند. عملکرد طبیعی این پروتئین‌ها هنوز مشخص نیست ولی در فرم جهش یافته (PrP^{sc}) باعث

*نویسنده مسئول: سیامک سلامی، دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

E-mail: salami.si@sbm.ac.ir



مقاومت ابتلا به اسکرپی رابطه‌ی مستقیم دارد (Hunter, 2007; Teferedegan et al., 2020; Yoshida & Soto, 2019). به تعبیر دیگر، مقاوم‌ترین ژنوتیپ PrP گوسفندی ARR/ARR است به طوری که مشاهده شده است که گوسفندان دارای این ژنوتیپ به تلقیح آزمایشی با اسکرپی و BSE نیز مقاوم بوده‌اند (Curcio et al., 2016; Tongue et al., 2006). اگر چه مطالعاتی نشان داده است که به دلیل امکان اختلاط اکوتیپ‌ها کار ارزیابی ژنتیکی و حفظ وضعیت دشوار است (Houston et al., 2015). بزرگ دنیا که جزو قطب‌های دامپروری در جهان محسوب می‌شوند تلاش زیادی کرده‌اند که با تعیین ژنوتیپ و اصلاح نژاد دام‌های خود، از شیوع یک بیماری مهلک و ضررهای اقتصادی جبران‌ناپذیر آن، جلوگیری کرده و سلامت شهروندان خود را تضمین نمایند (Baylis & McIntyre, 2004; Boukouvala et al., 2018; Gmür et al., 2004; Jeong et al., 2018; Migliore et al., 2017). وجود بیش از ۵۰ میلیون رأس گوسفند و بز که یکی از منابع مهم درآمد دامداران و روستائیان کشور ما محسوب می‌شوند و همچنین تنوع اکوتیپ‌های مختلف، تعیین ژنوتیپ گوسفندان و اصلاح نژاد آن‌ها از نظر ابتلا به بیماری اسکرپی و سایر بیماری‌ها ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه‌ی قبل وضعیت آل‌ها و ژنوتیپ گوسفندهای قزل ایران بررسی شد (Salami et al., 2011) و در همین راستا، این پژوهش به عنوان یک مطالعه با مقیاس کوچک در راستای امکان سنجی انجام چنین مطالعاتی در حجم وسیع-تر و برآورد اولیه‌ای از وضعیت ژنوتیپی و فراوانی آللی برخی از کدون‌های دارای پلی مورفیسم در گوسفندان اکوتیپ ماکویی انجام شده است.

مواد و روش کار

به منظور انجام این پژوهش ۶۰ گوسفند ماکویی سالم به صورت تصادفی در کشتارگاه صنعتی ارومیه انتخاب شد. سپس ۴ میلی‌لیتر خون ورید و داج از هر گوسفند گرفته شد.

(Schulz-Schaeffer et al., 2020). بیماری‌های پریونی بیماری‌هایی پیش رونده، غیرقابل درمان و مرگ‌بار هستند که موجب تخریب بافت عصبی مرکزی در انسان و حیوان می‌شوند (Scheckel & Aguzzi, 2018). برخی از انواع بیماری‌های پریونی در حیوان و انسان عبارتند از اسکرپی در گوسفند، جنون گاوی و آنسفالوپاتی اسفنجی شکل گربه‌سانان، بیماری کورو، بی‌خوابی کشنده‌ی خانوادگی و بیماری جاکوب-کروتزفلد (CJD) (Hussein & Al-Mufarrej, 2004; Mead et al., 2019). اسکرپی یک بیماری کشنده است که سیستم عصبی مرکزی (CNS) گوسفندها را به صورت غیرقابل برگشت تخریب می‌کند. این بیماری جزو دسته‌ای از بیماری‌ها با عنوان آنسفالوپاتی-های اسفنجی شکل قابل انتقال (TSE) دسته‌بندی می‌شود و همانند سایر بیماری‌های پریونی دارای دوره‌ی کمون طولانی از ۱۸ تا ۴۰ ماه است (Cassmann & Greenlee, 2020; Chaudhary & Chaudhary, 2013; Schulz-Schaeffer et al., 2020). علائم اسکرپی به میزان زیادی در میان حیوانات متفاوت بوده و به کندی تظاهر پیدا می‌کند. به علت آسیب سلول‌های عصبی، حیوانات آلوده معمولاً تغییرات رفتاری و لزرش را به خصوص در نواحی سر و گردن از خود نشان داده و علائم اولیه شامل تغییرات نامحسوس در رفتار یا خلق و خو می‌شود. این تغییرات به صورت خاراندن و مالیدن بدن به اشیاء ثابت برای خلاص شدن از حس خارش است. این بیماری به طور معمول تنها توسط آزمایشات میکروسکوپی بافت مغزی در زمان کالبدشکافی و یا توسط روش‌های ایمنو هیستوشیمی، وسترن بلات و تست الایزا که حضور پروتئین پریون غیر طبیعی را تشخیص می‌دهند (Cassmann & Greenlee, 2020). اگر چه اسکرپی یک بیماری عفونی است ولی بین پلی مورفیسم موجود در ژن پروتئین پریونی (PrP) و مقاومت گوسفندان به این بیماری وجود دارد. مشخص شده است که وجود واریانت آللی آلانین/آرژنین/آرژنین (ARR) در سه کدون‌های ۱۳۶، ۱۵۴ و ۱۷۱ از ژن PrP با

قطعات مورد نظر با استفاده از ترموسایکلر Bioflux کشور ژاپن تکثیر شد. مشخصات پرایمرها و محصولات PCR در Table 1 و برنامه‌ی حرارتی PCR در Table 2 نشان داده شده است. محصولات PCR با استفاده از دستگاه الکتروفورز DNA (Clever Inc.) و ژل آماده Spreadex EL 500 (Elchrom Inc.) الکتروفورز شد و نهایتاً از رنگ سایبر گلد برای رنگ‌آمیزی ژل Spreadex استفاده شد (Figure 1). در مرحله‌ی بعدی، ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از دستگاه ترانس ایلومیناتور (Avagene Inc.) و نور ماوراء بنفش بررسی شدند. آنالیز تصویر ژل‌ها با استفاده از نرم‌افزار Total lab انجام گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۳) انجام شد.

Table 1: PCR products

	Allel	Product
Codon 136	A	133 bp
	V	139 bp
Codon 171	H	170 bp
	Q	247 bp
	R	155 bp

نمونه‌های خون وریدی پس از هر بار اخذ، به ویال‌های جمع‌آوری خون که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محلول EDTA بودند (۳ گرم EDTA در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول کلور سدیم ۰/۷ درصد) منتقل شده و سپس هر ویال در داخل ظرف نگهداری نمونه که حاوی یخ آماده بود قرار داده شد و نهایتاً نمونه‌ها با رعایت شرایط انتقال نمونه به آزمایشگاه منتقل شد. مطالعه به تأیید کمیته‌ی اخلاق دانشگاه محل اجرا رسید و در انجام نمونه‌گیری موارد اخلاقی کار با حیوانات رعایت گردید.

DNA موجود در نمونه‌های خونی توسط کیت جداسازی DNA ژنومی پستانداران (Bioflux, Japan) استخراج شد. با دستگاه اسپکتروفتومتر میزان غلظت DNA با محاسبه‌ی نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ آن‌ها تعیین شد و در مرحله‌ی بعد توسط دستگاه الکتروفورز کیفیت DNA به دست آمده بررسی شد. پلی‌مورفیسم آلی ژن پروتئین پریونی (PrP) در کدون‌های ۱۳۶ و ۱۷۱ به روش allele-specific PCR با استفاده از کیت سنجش حساسیت به اسکرپی (Elchrom Scientific AG, Switzerland) بررسی شد.

Table 2. Time-temperature protocol for PCR amplifications

Number of Cycle	Step	Temperature (°C)	Time	Others
1	Initial denaturation	95	15 min	
35	Denaturation	95	15 sec	Varied based on allele
	Annealing	62-66	90 sec	
	Amplification	72	30 sec	
1		64	10 min	
		4	stored	

مبنای تفاوت معنی‌دار آماری برای مقدار P عدد ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

در این مطالعه برای بررسی تفاوت توزیع فراوانی ال‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف در بین گوسفندان بررسی شده از تست کای ۲ (Pearson's chi-squared test) استفاده شد و

نتایج

چنان چه در Table 3 نشان داده شده است بررسی پلی مورفیسم A-V در کدون ۱۳۶ نشان داد که فراوانی آلل A (۶۵ درصد) به شکل معنی داری بیش تر از آلل V (۳۵ درصد) است ($P < 0.05$) و ژنوتیپ AA نیز فراوانی بیش تری نسبت به ژنوتیپ AV و VV دارد. از طرفی بررسی پلی مورفیسم H-Q-R در گوسفندان ماکویی نشان داد که آلل Q در کدون ۱۷۱ پروتئین پریونی به شکل معنی داری بیشتر از آلل R است، در حالی که آلل H در ۶۰ رأس گوسفند ماکویی بررسی شده یافت نشد. در بین اشکال ژنوتیپی ممکن، فرم QQ نسبت به QR و RR فراوانی بیش تری نشان داد در حالی که ژنوتیپ های حاوی آلل H دیده نشدند (Table 4).

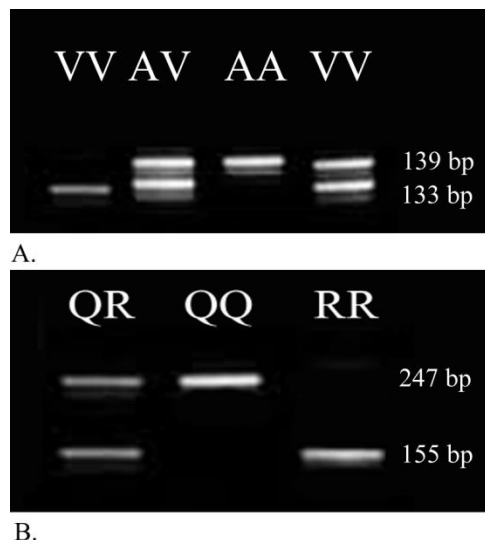


Fig. 1: PCR product for Codon 136 (A) and 171(B) on high resolution Speradex Gel

Table 3. Codon 136 polymorphism in Makuei ecotype sheep

	Allele		Genotype		
	A	V	AA	AV	VV
RAM (n=22)	14	8	10	8	4
percent	63.64	36.36	45.46	36.36	18.18
EWE (n=38)	25	13	18	14	6
percent	65.79	34.21	47.37	36.84	15.79
Total (%) (N=60)	65	35	46.67	36.67	16.67

Table 4. Codon 171 polymorphism in Makuei ecotype sheep

	Allele			Genotype					
	H	Q	R	RR	QR	QQ	QH	RH	HH
RAM (n=22)	0	6	5	3	4	4	0	0	0
percent	0	54.5	45.5	27.2	36.4	36.4	0	0	0
EWE (n=38)	0	11.5	7.5	4	7	8	0	0	0
percent	0	60.5	39.5	21.1	36.8	42.1	0	0	0
Total (%) (N=60)	0	58.33	41.67	23.33	36.67	40	0	0	0

بحث

بررسی ژنوتیپ های حساس به ابتلا به اسکرپی و حذف آن ها وجود دارد که سرمایه گذاری کلانی را به خود اختصاص داده است. این کشورها گله های بومی خود را نسبت به بروز همه گیری های اسکرپی یا وجود مخزن احتمالی عامل پریونی برای سایر بیماری ها نظیر BSE مقاوم کرده اند. ژنوتیپینگ کلی وضعیت کدون ها در ژن PrP می تواند اشکال مختلفی داشته باشد به طوری که پلی مورفیسم

بیماری اسکرپی گوسفندان به جهت ارتباط نزدیک با بیماری پریونی دیگری به نام جنون گاوی در سال های اخیر مورد توجه جدی تری قرار گرفته است و در کشورهای پیشرفته برنامه ریزی گسترده ای برای شناسایی موارد ابتلا، نحوه ی بیماری زایی و مقاومت ژنتیکی نسبت به این بیماری شده است. در کشورهای نظیر کانادا، استرالیا، سوئد، اتحادیه ی اروپا و امریکا برنامه ریزی های مدونی برای

مونتادل دیده شد اما در پژوهش حاضر، فراوانی نسبت به گروه‌های فوق‌الذکر کمتر و نزدیک به گوسفندان مونتادل است. در مطالعه‌ی دیگری نیز در بین رمه‌هایی با وضعیت مشابه نتایج تحقیق فعلی به دست آمده است (Teferedegn et al., 2020). در پژوهشی که روی ۴ اکوتیپ در بین گوسفندان سوئسی انجام شده است نیز آل A فراوانی بیشتری نسبت به آل V دارد در این بین، گوسفند آلی سفید سوئیس به نتایج تحقیق حاضر نزدیک تر از سه نوع دیگر است (Gmür et al., 2004) و مطالعه‌ای در اکوتیپ-های اتیوپیایی نیز نتایج نزدیکی تولید کرده است (Teferedegn et al., 2020) در مطالعه‌های مذکور فراوانی آل A نسبت به آل V بیش‌تر از مطالعه‌ی حاضر است که می‌توان اصلاح نژادی و سیاست‌های کنترل آمیزش و بررسی وضعیت نتایج حاصل را دلیل کاهش فراوانی آل V به عنوان آل بالابرنده‌ی ریسک ابتلا در نظر گرفت و از همین رو به نظر می‌رسد توجه به کنترل و کاهش فراوانی آل V در بین اکوتیپ ماکویی ضروری به نظر می‌رسد.

در کدون ۱۷۱ نیز فراوانی آل‌های مختلف نشان از برتری آل Q و R نسبت به H بود. به علاوه، فراوانی آل R نیز کم‌تر از آل Q بود. تحقیقات دیگر نیز نشان‌گر وضعیت متفاوت در بین گله‌ها و نژادهای مختلف است. در گوسفندان اوکلاهاما در نوع سافوک آل R بیش‌تر از Q گزارش شده است اما در همشایر، دورست و مونتادل وضعیت شبیه نتایج مطالعه‌ی حاضر است (DeSilva et al., 2003). در سوئیس نیز در گوسفندان سفید آلی (WAS) و داوون اکسفورد سوئیس (BFS) فراوانی آل R بیش‌تر از آل Q است اما در نوع کوهستان سیاه-قهوه‌ای (SBS) و پوزه سیاه والایس (SN) فراوانی آل Q بیش از R گزارش شده است (Gmür et al., 2004). در مطالعه‌ای بر روی شانزده اکوتیپ گوسفندی در چین هم نتایج سازگار با این مطالعه به دست آمده است (Lan et al., 2014). در اکوتیپ ماکویی فراوانی ژنوتیپ RR کم بود که میزان وقوع آل R در گوسفندان حاصل از آمیزش بین گوسفندان را کاهش می‌دهد. با توجه به این که آل R در کدون ۱۷۱ نقش

در کدون‌های مختلفی از جمله کدون ۱۱۲، ۱۳۶، ۱۳۷، ۱۳۸، ۱۴۱، ۱۵۱، ۱۵۴، ۱۷۱ و ۲۱۱ گزارش شده است که در این بین، پلی‌مورفیسم کدون‌های ۱۱۲، ۱۳۷، ۱۳۸، ۱۴۱ و ۲۱۱ نادر بوده و ارتباط قطعی بین پلی‌مورفیسم آن‌ها و بیماری اسکرپی یافت نشده است (GOMBOJAV et al., 2003; Yoshida & Soto, 2019). در طرف مقابل، پلی‌مورفیسم در کدون ۱۳۶ با استعداد ابتلا به اسکرپی هم در مدل‌های آزمایشگاهی و هم در مدل‌های طبیعی بیماری ارتباط دارد (Lan et al., 2014; Salami et al., 2011; Teferedegn et al., 2020). همچنین، مشخص شده است که پلی‌مورفیسم در کدون ۱۷۱ با حساسیت به اسکرپی در گوسفندان چینی، کره‌ای و سویس و حساسیت به مدل طبیعی اسکرپی در گوسفندان در ارتباط است (Gmür et al., 2004; Lan et al., 2014; Teferedegn et al., 2020) در کشور ایران با توجه به اختلاط زیاد انواع گوسفندها و اختلاط نژادی شدید، امکان بیشتری برای بررسی به صورت اکوتیپی وجود دارد که بنابر اکوتیپ‌های متنوع موجود در مناطق مختلف کشور، بررسی وضعیت ژنوتیپی بدون شک عرصه‌ای بسیار مهم و ارزشمند در تحقیقات خواهد بود. در تحقیق حاضر که با توجه به بررسی‌های به عمل آمده اولین مطالعه بررسی پلی‌مورفیسم کدون‌های درگیر در حساسیت یا مقاومت به ابتلا به اسکرپی در اکوتیپ ماکویی در منطقه‌ی آذربایجان غربی است، تعداد ۶۰ گوسفند ماکویی از نظر پلی‌مورفیسم کدون ۱۳۶ (A-V) و کدون ۱۷۱ (H-Q-R) بررسی شدند. نتایج پلی‌مورفیسم کدون ۱۳۶ نشان داد که فراوانی آل A نسبت به V برتری معنی‌داری دارد. چنین نتایجی در تحقیقاتی که بر روی گوسفندان اوکلاهاما انجام شده است نیز به دست آمده است که در بین گوسفندان سافوک، همشایر، دورست، و مونتادل فراوانی آل A در مطالعه‌ی حاضر به گله مونتادل بسیار نزدیک است (DeSilva et al., 2003). وضعیت ژنوتیپی A و V نشان داد که ژنوتیپ AA نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها یعنی AV و VV برتری دارد. چنین وضعیتی در گوسفندان اوکلاهاما از نوع سافوک، همشایر، دورست و

گوسفندان ماکویی و اکوتیپ‌های دیگر می‌تواند میزان اولویت سیاست‌گذاری در اصلاح نژاد و کاهش گوسفندان حساس به اسکرپی را نشان دهد. در همین راستا بذل توجه بیش‌تر در اصلاح نژادی و کاهش فراوانی آلل V در کدون ۱۳۶ و آلل V در کدون ۱۷۱ توصیه می‌شود. همچنین انجام مطالعات ویرولوژیک در سنجش مقاومت یا استعداد ابتلای حیوانات با ژنوتیپ‌های مختلف به اسکرپی می‌تواند راهگشای خوبی برای طرح برنامه‌ی کشوری مقاوم‌سازی رمه‌های گوسفندی نسبت به اسکرپی باشد.

مهمی در ایجاد ژنوتیپ‌های مقاوم به اسکرپی دارد لذا توجه به اصلاح و افزایش گوسفندان با ژنوتیپ RR حائز اهمیت است.

لازم به ذکر است که ژنوتیپینگ ارتباطی به بیماری یا تشخیص آن نداشته و صرفاً به جهت برآورد وضعیت مقاومت یا حساسیت احتمالی به بیماری اسکرپی انجام می‌شود. در این مطالعه، نتایج به دست آمده برآورد اولیه‌ای از وضعیت پلی‌مورفیسم کدون‌های ۱۳۶ و ۱۷۱ می‌باشد که نشان داد که آلل‌ها و ژنوتیپ حساس در این اکوتیپ وجود دارد. لزوم مطالعات جامع‌تر بر روی تعداد بیش‌تری از

تشکر و قدردانی

مؤلفین از همکاران خوب در کشنارگاه ارومیه که در تهیه نمونه خون از دام همکاری کردند سپاس‌گزارند.

تعارض منافع

مؤلفین در این مطالعه هیچ گونه تعارض منافی جهت اظهار ندارند.

منابع مالی

این مطالعه از طریق منابع مالی مؤلفین انجام شده و هیچ گونه گرنت یا پشتیبانی مالی خارجی نداشته است.

منابع

- Baylis, M., & McIntyre, K. M. (2004). Scrapie control under new strain. *Nature*, 432(7019), 810-811.
- Boukouvala, E., Gelasakis, A. I., Kanata, E., Fragkiadaki, E., Giadinis, N. D., Palaska, V., Christoforidou, S., Sklaviadis, T., & Ekateriniadou, L. V. (2017). The association between 171 K polymorphism and resistance against scrapie affection in Greek dairy sheep. *Small Ruminant Research*, 161, 51-56.
- Cassmann, E. D., & Greenlee, J. J. (2020). Pathogenesis, detection, and control of scrapie in sheep. *Am J Vet Res*, 81(7), 600-614. <https://doi.org/10.2460/ajvr.81.7.600>
- Chaudhary, S., & Chaudhary, M. (2013). Scrapie: A neuro degenerative disease in sheep-A review. *Agricultural Reviews*, 34(1), 79-85.
- Curcio, L., Sebastiani, C., Di Lorenzo, P., Lasagna, E., & Biagetti, M. (2016). Review: A review on classical and atypical scrapie in caprine: Prion protein gene polymorphisms and their role in the disease. *Animal*, 10(10), 1585-1593. <https://doi.org/10.1017/s1751731116000653>
- DeSilva, U., Guo, X., Kupfer, D., Fernando, S., Pillai, A., Najar, F., So, S., Fitch, G., & Roe, B. (2003). Allelic variants of ovine prion protein gene (PRNP) in Oklahoma sheep. *Cytogenetic and genome research*, 102(1-4), 89-94.
- Gmür, A., Gaillard, C., & Dolf, G. (2004). Characterization of the prion protein gene (PRNP) region in Swiss sheep breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 121(3), 216-220.
- GOMBOJAV, A., ISHIGURO, N., HORIUCHI, M., SERJMYADAG, D., BYAMBAA, B., & SHINAGAWA, M. (2003). Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. *Journal of veterinary medical science*, 65(1), 75-81.

- Houston, F., Goldmann, W., Foster, J., González, L., Jeffrey, M., & Hunter, N. (2015). Comparative Susceptibility of Sheep of Different Origins, Breeds and PRNP Genotypes to Challenge with Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie. *PLoS one*, 10(11), e0143251-e0143251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143251>
- Hunter, N. (2007). Scrapie—Uncertainties, biology and molecular approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1772(6), 619-628.
- Hussein, M. F., & Al-Mufarrej, S. I. (2004). Prion Diseases: A Review. *Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)*, 5(2), 1425.
- Jeong, M.-J., Kim, Y.-C., & Jeong, B.-H. (2018). Prion-like protein gene (PRND) polymorphisms associated with scrapie susceptibility in Korean native black goats. *PLoS one*, 13(10).
- Lan, Z., Li, J., Sun, C., Liu, Y., Zhao, Y., Chi, T., Yu, X., Song, F., & Wang, Z. (2014). Allelic variants of PRNP in 16 Chinese local sheep breeds. *Arch Virol*, 159(8), 2141-2144. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2048-9>
- Mead, S., Lloyd, S., & Collinge, J. (2019). Genetic Factors in Mammalian Prion Diseases. *Annu Rev Genet*, 53, 117-147. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-1202-092352-13>
- Migliore, S., Agnello, S., D'Avola, S., Goldmann, W., Presti, V. D. M. L., & Vitale, M. (2017). A cross-sectional study of PRNP gene in two native Sicilian goat populations in Italy: a relation between prion gene polymorphisms and scrapie incidence. *Journal of genetics*, 96(2), 319-325.
- Pandeya, D. R., Acharya, N., & Hong, S.-T. (2010). The prion and its potentiality. *Biomedical Research-Tokyo*, 21(2).
- Salami, S., Zadeh, R. A., Omrani, M. D., Ramezani, F., & Amniattalab, A. (2011). Allelic frequency and genotypes of prion protein at codon 136 and 171 in Iranian Ghezel sheep breeds. *Prion*, 5(3), 228-231. <https://doi.org/10.4161/pri.5.3.16098>
- Scheckel, C., & Aguzzi, A. (2018). Prions, prionoids and protein misfolding disorders. *Nature Reviews Genetics*, 19(7), 405-418.
- Schulz-Schaeffer, W. J., Wemheuer, W. M., & Wrede, A. (2020). Prion Diseases: Conformational Changes of a Protein Create an Unconventional Infectious Agent. In *Emerging and Reemerging Viral Pathogens* (pp. 479-488). Elsevier.
- Teferedegn, E. Y., Yaman, Y., & Un, C. (2020). Five novel PRNP gene polymorphisms and their potential effect on Scrapie susceptibility in three native Ethiopian sheep breeds. *BMC Vet Res*, 16(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02336-0>
- Tongue, S., Pfeiffer, D., Warner, R., Elliott, H., & Vilas, V. D. R. (2006). Estimation of the relative risk of developing clinical scrapie: the role of prion protein (PrP) genotype and selection bias. *Veterinary Record*, 158(2), 43-50.
- Yoshida, N., & Soto, P. (2019). Polymorphisms Modulate Sheep Prion Protein Susceptibility to Misfolding by Altering the Residue Network of Interactions. *Biophysical Journal*, 116(3), 187a.

Received: 23.05.2020

Accepted: 20.09.2020

Investigation of codon 136 (A-V) and codon 171 (H-Q-R) polymorphisms for scrapie susceptibility in Makuei Sheep breeds

Siamak Salami^{1*}, Reza Ashrafizadeh², Hossein Ghahremani³ and Amir Amniattalab⁴

¹ Associate Professor, Clinical Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² DVM Graduate, Faculty of Veterinary, Islamic Azad University, Urmia Branch, Urmia, Iran

³ PhD Graduate, Clinical Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Associate Professor, Pathology Department, Faculty of Veterinary, Islamic Azad University, Urmia Branch, Urmia, Iran

Received: 23.05.2020

Accepted: 20.09.2020

Abstract

Prion diseases in livestock can be a potential danger for humans as well. The Makuei sheep breed is one of the most important sources of protein in Iran. In this study, the polymorphism status of codons 136 and 171 of prion protein and their genotypes was investigated in Makuei ecotype sheep. Blood samples were obtained from 60 Makuei sheep and DNA was extracted. The codon 136 (A-V) and codon 171 (H-Q-R) polymorphisms were evaluated by PCR with specific primers. The results showed that allele A (65%) at codon 136 was significantly higher than allele V (35%). AA genotype (46.67%) was also the most common genotype. At codon 171, the Q and R alleles were significantly higher than the H allele. In addition, the allele R was significantly lower than the allele Q. Allele Q (58.33%) and QQ genotypes (40%) were the most common alleles and genotypes. In conclusion, the findings provide strong preliminary lines of evidence that motivate large-scale genotyping studies to establish an effective breeding control and successful eradication of scrapie-susceptible genotypes.

Key words: Prion disease, Scrapie, Makuei ecotype, PrP, Genotype

* **Corresponding Author:** Siamak Salami, Associate Professor, Clinical Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
E-mail: salami.si@sbm.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).