ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵
صفحه ۶۳-۵۷

شناسایی چند شکلی ژن پرایون در گوسفندان نژاد نائینی با استفاده از روش PCR-SSCP، تعیین توالی مستقیم و تجزیه منحنی ذوب

Identification of different allelic forms of *PrP* gene in Naeinian sheep using melting curve analysis technique

مجتبی نجفی*[۱]، قدرت رحیمی میانجی[۱]، زربخت انصاری پیرسرایی[۱]، محمد علی روحی[۱]
۱- آزمایشگاه ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی دام، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

Najafi M*[1], Rahimi Mianji G[1], Ansari Pirsaraie Z[1], Rouhi MA[1]

1- Molecular Genetics and Animal Biotechnology laboratory, Department of Animal sciences, Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:Mojtaba_najafy@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/٤/۷ - تاریخ پذیرش: ۹٤/۷/۱۹)

چکیده

تعیین ژنوتیپ با استفاده از تجزیه و تحلیل مستقیم DNA اهمیت به‌سزایی در به نژادی گیاهان و جانوران و نیز برای تشخیص و بررسی بی‌نظمی‌های ژنتیکی در موجودات مختلف اعم از گیاه، حیوان و همچنین در علم پزشکی قانونی دارد. در حال حاضر روش تجزیه منحنی ذوب یکی از کم هزینه‌ترین روش‌های تعیین ژنوتیپ به حساب می‌آید که می‌تواند در مطالعات ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد. پژوهش حاضر به‌منظور شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در جایگاه ژن پرایون گوسفندی انجام گرفت. پس از استخراج DNA از نمونه خون 145 رأس گوسفند نژاد نائینی و تکثیر قطعه مورد نظر توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ژنوتیپ‌ها تعیین و برای تایید نتایج به‌دست آمده از دو روش PCR-SSCP و روش تعیین توالی مستقیم استفاده شد. نتایج نشان داد که در جایگاه ژنی پروتئین پرایون، در مجموع نه ژنوتیپ مشاهده شد. اما به دلیل وجود چندین SNP در قطعه تکثیری، تفکیک هر یک از ژنوتیپ‌ها با استفاده از تجزیه منحنی ذوب به‌طور اختصاصی میسر نشد. بنابراین روش تجزیه منحنی ذوب، ژنوتیپ‌های حاصل از جابه‌جایی تک نوکلئوتیدی در یک قطعه تکثیری (تک جایگاه) را به راحتی از هم تفکیک کرده، اما به دلیل پیچیدگی‌های حاصل از حضور چندین جابه‌جایی در یک قطعه تکثیری (جایگاه‌های چندگانه) امکان جداسازی اختصاصی ژنوتیپ‌ها به راحتی میسر نمی‌باشد. با توجه به مزایای روش تجزیه منحنی ذوب در جداسازی ژنوتیپ‌ها، پیشنهاد می‌شود با انجام پژوهش‌های جدید بتوان محدودیت‌های این تکنیک برای قطعات تکثیری حامل چند جابه‌جایی تک نوکلئوتیدی را رفع کرد.

واژه‌های کلیدی

تعیین توالی مستقیم
ژن پرایون
گوسفند نژاد نائینی
MCA
PCR SSCP

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.6.9]

مقدمه

فرم پیچش غیر طبیعی پروتئین پرایون باعث بروز بیماری‌هایی در پستانداران از قبیل انسفالوپاتی اسفنجی گاوی (بیماری جنون گاوی) در گاو، بیماری کرتزفلد- جاکوب در انسان و بیماری اسکراپی در گوسفند شد. کلیه این بیماری‌ها روی ساختار مغز و سیستم عصبی تاثیر گذاشته و در نهایت باعث مرگ دام می‌شود، لیکن تا به‌حال هیچ روش درمانی برای آن‌ها ارایه نشده‌است (Lauren et al. 2009). جایگاه ژنی پرایون گوسفندی دارای سه اگزون و دو اینترون بوده که روی کروموزوم ۱۳ قرار می‌گیرد و به دلیل شروع چارچوب خواندن این ژن از روی اگزون سه، این ناحیه مهم‌ترین بخش این ژن محسوب می‌شود. در تمام موارد بیماری‌های ارثی حاصل از پرایون، حداقل یک جهش در این جایگاه ژنی مشخص شده‌است (Oesch et al. 1985; Goldmann 2008). بروز جهش‌های گوناگون در این جایگاه ژنی موید این نظر است که جهش‌های حاصله احتمالا باعث تبدیل خود به خودی فرم نرمال (PrP^{c}) به فرم غیر نرمال (PrP^{Sc}) پروتئین پرایون می‌شوند. مقاومت یا حساسیت به بیماری شدیداً به تغییرات در کدون‌های ۱۳٦ (آلانین یا والین)، ۱٥٤ (آرژنین یا هیستیدین) و ۱۷۱ (آرژنین یا گلوتامین یا هیستیدین) بستگی دارد (Hunter et al. 1996). تحققیات انجام شده که آلل ARR با حساسیت پایین گوسفندان به بیماری اسکراپی و همچنین آرژنین ۱۷۱ با مقاومت بالا به این بیماری رابطه مستقیم دارند (Animal Health Australia. 2001; Baylis and Goldmann 2004; Arsac et al. 2007). بنابراین در برنامه‌های اصلاح نژادی هدف این است که هاپلوتایپ VRQ حذف شده و ژنوتیپ ARR/ARR را افزایش دهند (Buschmann et al. 2004) در نژادهایی که وفور VRQ بالا یا وفور ARQ کم باشد، حساسیت به بیماری بالا خواهد بود، ولی ARR باعث مقاومت به بیماری می‌شود (Benestad et al. 2003).

تعیین ژنوتیپ با استفاده از تجزیه و تحلیل مستقیم DNA اهمیت به‌سزایی در به نژادی گیاهان و جانوران دارد. یکی از محدودیت-های فعلی، عدم وجود یک روش بسیار سریع است که بتواند در زمان کوتاه تعیین ژنوتیپ را در حد گسترده انجام دهد. روش‌های متعارف که وابسته به جداسازی و هیبرید شدن هستند معمولا طولانی، پیچیده و چند مرحله‌ای هستند و برای سنجش خیلی سریع مناسب نیستند. روش تجزیه منحنی ذوب، یکی از کم هزینه‌ترین روش‌های تعیین ژنوتیپ می‌باشد که می‌تواند در مطالعات ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد. این روش در یک سیستم کاملاً بسته انجام شده و نمونه‌ها بدون آلودگی، قابل استفاده برای دیگر مراحل آزمون هستند. در این روش برای خواندن نتایج پس از PCR نیازی به الکتروفورز نیست. لذا نتایج سریع‌تر به دست آمده و خطر آلودگی با اتیدیوم بروماید و نیترات نقره نیز وجود ندارد. جستجو برای حضور تنوع‌های ناشناخته در قطعات PCR از دیگر مزایای این روش می‌باشد. به هرحال، شناسایی جهش‌ها، کشف هتروزیگوسیتی، انگشت‌نگاری DNA، تعیین ژنوتیپ با استفاده از SNPها، شناسایی گونه‌ها، نسبت جهش‌های سوماتیکی و مطالعات همبستگی و هاپلوتایپی بین آن-ها، بررسی فراوانی آللی در جمعیت‌ها و شناسایی ژن‌های کاندیدا با استفاده از رنگ‌های کم هزینه در مقایسه با هزینه پروب‌های نشان‌دار از قبیل Taq Man و پروب‌های FRET از مزیت‌های این تکنیک در مقایسه با دیگر روش‌ها به شمار می‌رود (Akey et al. 2001; Ye et al. 2002; Froehlich T and Hoffmann, 2006; White et al. 2006). لذا با توجه به مطالب مذکور، لزوم استفاده از این تکنیک برای تعیین ژنوتیپ کاملاً مشهود می‌باشد.

در مطالعه‌ای با استفاده از تکنیک تجزیه منحنی ذوب، شناسایی چند شکلی‌های سه ناحیه اگزون یک و سه و هم‌چنین 3′-UTR را در گوسفند بلوچی مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که این تکنیک قابلیت شناسایی چند شکلی‌ها را دارد (Rouhi et al. 2012). در سال 2001 روش تجزیه منحنی ذوب به عنوان یک روش بدون ژل و کم هزینه برای تعیین ژنوتیپ SNP معرفی شد (Akey et al. 2001). تحقیقی به‌منظور شناسایی گونه‌های مایکوپلاسما هموتراپیک[1] در گله گاوها با استفاده از تجزیه منحنی ذوب روی محصولات PCR گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که با استفاده از این تکنیک می‌توان زمان شناسایی هم زمان و تفاوت دو هموپلاسما را در گله گاوها کاهش داد (Nishizawa et al. 2010). در پژوهشی شناسایی چند شکلی‌های تصادفی در کلونی-

[1] Hemotropic mycoplasma

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.6.9]

های پزدوموناس[1] ایزوله شده از بیماران با استفاده از Real–time PCR و تجزیه منحنی ذوب صورت گرفت. در این مطالعه، ده چند شکلی تک نوکلئوتیدی شناسایی شد. همچنین نتایج این تکنیک با ژل الکترفورز (PFGE[2]) نیز مقایسه شد که صحت تکنیک تجزیه منحنی ذوب و توانایی آن برای انجام چنین مطالعاتی را تایید نمود (Anuj et al. 2010). پژوهشی تحت عنوان تجزیه چند شکلی در ژن پروتئین پرایون گوسفندی با استفاده از پروب‌های فلورسانتی خطی و تجزیه منحنی ذوب انجام گرفت. در این پژوهش چند شکلی های موجود در کدون های 136، 154 و 177 ژن پروتئین پرایون در 12000 گوسفند مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که تنها با استفاده از چهار پروب HyBeacon، واریانت‌های مختلف این جایگاه که شامل A136, V136, T 136, T137, L141, F141, R154, H154, L168, R171, Q171, H171 و K171 هستند با صحت بالایی قابل شناسایی می باشند. در یک مطالعه، از تجزیه منحنی ذوب جهت تعیین ژنوتیپ توالی‌های تکراری در گوسفند استفاده شد. در مطالعه مذکور محدودیت‌های مهمی را مورد بررسی قرار دادند و محققین بیان کردند که جایگاه‌های SSR در حیوانات کمتر از گیاهان می‌باشد و نمی‌توان جایگاه‌های با اثر عمده که تنوع کمی دارند را انتخاب کرد. یکی از فاکتورهای مهم در استفاده از این تکنیک اندازه طول قطعه تکثیری و هم‌چنین دستگاه‌های مورد استفاده مانند Rotor Gene 6000 یا Light Cycler می‌باشد (Yang et al. 2014). در طی سال‌های اخیر مطالعات متعددی صحت و همچنین قابلیت‌های فراوان این تکنیک را گزارش کردند (French et al. 2007). پژوهش‌های متعددی در ارتباط با شناسایی تنوع ژنتیکی در این جایگاه ژنی در نژادهای خارجی انجام گرفته اما مطالعات اندکی در مورد بررسی تنوع ژنتیکی در این جایگاه ژنی در گوسفندان ایرانی وجود دارد. هدف از این مطالعه شناسایی تنوع ژنتیکی در جایگاه مورد نظر با استفاده از روش PCR-SSCP، منحنی ذوب و تعیین توالی مستقیم در گوسفند نژاد نائینی بود. از سوی دیگر، علیرغم ضرورت انجام مطالعات جامع‌تر در این جایگاه و ارتباط آن با بیماری اسکراپی، نیاز به توسعه و استفاده از روش‌های جدید در تعیین چندشکلی-های مهم می‌باشد. با نظر به این‌که تکنیک منحنی ذوب می‌تواند یک تکنیک کارآمدتر باشد لذا هدف از این پژوهش بررسی چندشکلی‌های موجود در ناحیه اگزون سه ژن پرایون با استفاده از تکنیک تجزیه منحنی ذوب بود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های خون، استخراج DNA و انجام PCR

نمونه‌های خون از 145 راس گوسفند نژاد نائینی که متعلق به سه گله مجزا (گله اول 15 راس، گله دوم 60 و گله سوم 70 راس) (در مجموع 10 قوچ و 135 میش) بودند جمع آوری و استخراج DNA با استفاده از روش نمکی بهینه یافته صورت گرفت. برای تعیین ویژگی‌های کمی و کیفی DNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. در این مطالعه بخشی از اگزون سه ژن پرایون انتخاب و با یک جفت آغازگر اختصاصی قطعه ای به طول ۱۹۸ جفت باز تکثیر شد. توالی آغازگرهای ژن پرایون شامل توالی رفت F: 5′-GCAGCTGGAGCAGTGGTAGG-3′ و توالی برگشت R: 5′- GATGTTGACACAGTCATGCAC -3′ (French et al.et al. 2007) بود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۲ میکرولیتر بافر ۵/۰، PCR(10x)، یک میکرولیتر ۲/۰، dNTPs میکرولیتر۱۰۰، Taq polymerase نانو گرم DNA ژنومی و ۵/۱ میکرولیتر $MgCl_2$ انجام گرفت. سپس چرخه‌های PCR با برنامه حرارتی شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشته سازی اولیه DNA به‌مدت ۳۰۰ ثانیه، واسرشت ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای ٦٢ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگرها به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط آغازگرها به‌مدت ۳۰ ثانیه به تعداد 35 چرخه و بسط نهائی به‌مدت ٦۰۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای آزمون صحت قطعه به دست آمده و هم‌چنین تعیین کمیت و کیفیت محصول PCR از ژل آگارز دو درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید به همراه نشانگر وزنی M100 شرکت فرمنتاز[3] استفاده شد.

تعیین ژنوتیپ با استفاده از روش PCR-SSCP

[1] *Pseudomonas aeruginosa*
[2] Pulsed- field gel electrophoresis
[3] Fermentas

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.6.9]

برای تعیین ژنوتیپ هر حیوان از روش PCR-SSCP و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید استفاده شد. در این روش تعیین ژنوتیپ، بر اساس اختلاف حرکت محصول PCR تکثیر شده در میدان الکتروفورز که ناشی از تغییر شکل فضایی DNA تک رشته‌ای است، صورت می‌پذیرد. برای تک‌رشته سازی، ۷ میکرولیتر از محصول PCR را با 7 میکرولیتر از بافر بارگذاری مخصوص ژل اکریل آمید (98٪ formamide, 10 mM EDTA, 0.025% bromophenol blue, and 0.025% xylene-cyanol) مخلوط و با استفاده از دستگاه PCR به‌مدت ٦ دقیقه با دمای ٩٦ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. در این پژوهش از ژل اکریل آمید ۰/۰۱۲ (1:5/38) استفاده شد. بعد از انجام الکترفورز محصولات PCR روی ژل اکریل آمید، از نیترات نقره برای رنگ-آمیزی استفاده شد (Byun et al. 2009). در این پژوهش تعیین ژنوتیپ مستقیما از روی ژل انجام و با شمارش مستقیم الگوهای باندی، فراوانی آللی و ژنوتیپی برآورد شد.

تجزیه منحنی ذوب

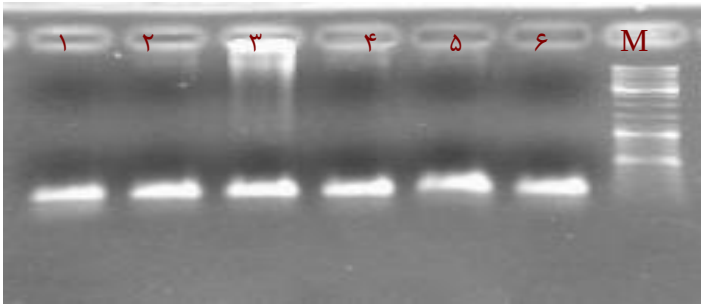
برای انجام واکنش ذوب ابتدا DNA نمونه‌ها از لحاظ غلظت یکسان سازی شد (۵۰ میکروگرم بر میکرولیتر). سپس برای انجام واکنش در حجم ۱۵ میکرولیتر از ۵/۷ میکرولیتر از مستر میکس SYBR Green PCR Kit با Cat.no.204052 از شرکت کیاژن حاوی (Taq polymerase, magnesium chlorid, dNTPs) (SYBR Green I,) و ۰/۷ میلی‌مولار آغازگر رفت و برگشت (۱۰پیکومول) ژن و مابقی توسط آب به حجم نهایی رسانده شد. در ادامه با استفاده از Real-time-PCR و پروتکل دمای دو مرحله‌ایی شامل دمای واسرشت سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه با الگوی دمایی شامل دمای واسرشت سازی ثانویه به‌مدت ۱۰ ثانیه و اتصال و بسط با دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت، بلافاصله بعد از فرآیند Real-time-PCR پروتکل منحنی ذوب انجام شد.

تعیین توالی قطعه تکثیری

بر اساس الگوهای باندی حاصل از روش PCR-SSCP، و جهت تایید صحت و هم‌چنین مشخص نمودن تنوع موجود در این جمعیت از هر ژنوتیپ یک نمونه برای تعیین توالی انتخاب و بعد از تکثیر این قطعات توسط واکنش زنجیره پلی مراز، توسط کیت تخلیص DNA شرکت Roche و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده خالص‌سازی صورت گرفت و برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره ارسال شد.

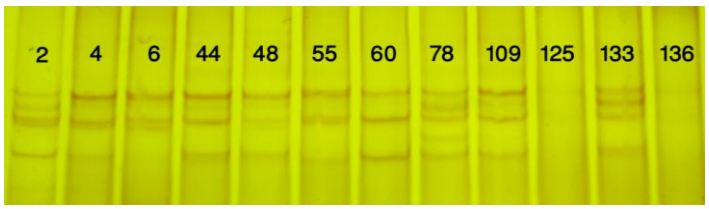
نتایج و بحث

در این پژوهش با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی، قطعه مورد نظر از اگزون ۳ جایگاه ژن پرایون به طول ۱۹۸ جفت باز تکثیر شد. نمونه‌ای از محصولات PCR تکثیر شده در شکل ۱ آمده است.



شکل۱- الگو باندی حاصل از تکثیر ژن پرایون از DNA ژنومی گوسفند شماره‌های ۱ تا ٦) نمونه‌های DNA تکثیری و M نشان دهنده خط‌کش مولکولی می‌باشد)

نتایج حاصل از تجزیه روش SSCP در این پژوهش در شکل ۲ ارائه شده‌است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در جمعیت مورد بررسی الگوهای باندی متفاوت وجود دارد.



شکل ۲- نمونه‌ای از ژنوتیپ‌های موجود از ژن پرایون بر مبنای باندهای حاصل از تجزیه SSCP. (شماره‌ها بیانگر شماره تیوپ‌ها می‌باشد)

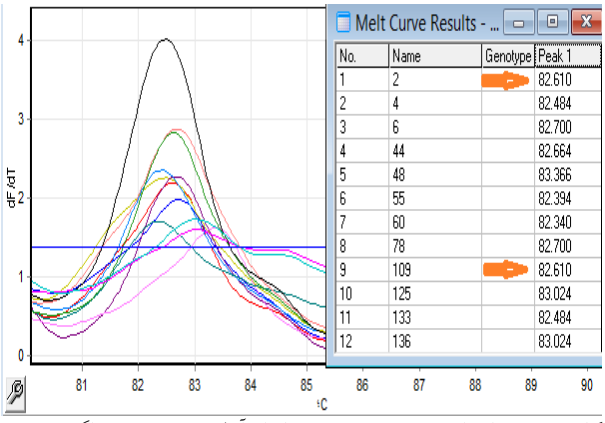
نتایج حاصل از این تکنیک نشان داد که جایگاه مورد مطالعه در گوسفند نژاد نائینی بسیار چند شکل بوده است (شکل ۳). نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد که به جز نمونه‌های ۱۰۹ و ۲ که دارای پیک یکسان هستند (با توجه به پیک مورد نظر در جدول منحنی ذوب) بقیه نمونه‌ها دارای ژنوتیپ متفاوتی می-

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.6.9]

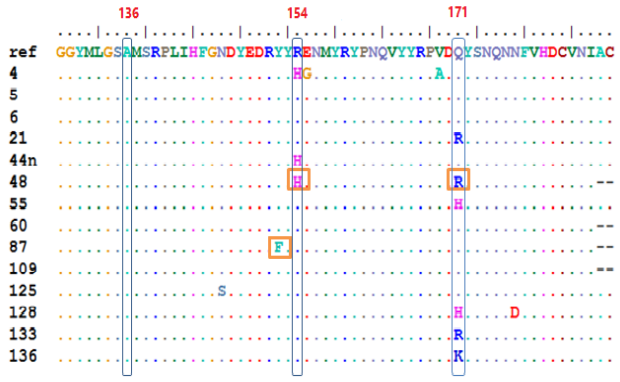
باشند. لازم به ذکر است که نتایج تعیین توالی نیز این نتیجه را تایید نموده است.

ابتدا تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها توسط هر دو روش SSCP و منحنی ذوب انجام گرفت. برای تایید و بررسی کارایی این روش‌ها، نمونه‌های دارای ژنوتیپ‌های متفاوت با استفاده از روش تعیین توالی مستقیم مورد بررسی قرار گرفتند. سپس با استفاده از نرم افزارهای Chromas Pro و BioEdit توالی‌های به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و با کمک سرور سایت Expasy (http://web.expasy.org/translate/) توالی زنجیره پروتئینی نیز به دست آمد.

تحقیقات بر روی همین ناحیه نشان داد که در مجموع ٤ هاپلوتیپ ARR، ARQ، ARH و AHQ و از ترکیب آنها ۹ ترکیب ژنتیکی شامل ARQ/ARQ، ARR/ARQ، ARR/ARR، ARR/AHQ، AHQ/ARQ، AHQ/ARH، ARH/ARH، ARH/ARQ، ARQ/ARK شناسایی شد. همان‌طور که در شکل ٤ ملاحظه می‌شود ۱۲ نمونه که با روش تعیین توالی مستقیم تعیین ژنوتیپ شده بودند با استفاده از تکنیک منحنی ذوب تفکیک شدند که هر کدام از این نمونه‌ها یک پیک را نشان دادند. علی‌رغم دسترسی به نتایج حاصله از تعیین توالی در مطالعه مذکور، در پژوهش حاضر نیز تمامی نمونه‌های گوسفندی مورد تجزیه و تحلیل مجدد قرار گرفت. نتایج تجزیه PCR-SSCP پژوهش حاضر، نتایج مطالعه Moradi et al. () را تایید کرد و علاوه بر آن ٤ نمونه دیگر به دلیل تفاوت داشتن با آن نتایج برای تعیین توالی ارسال شد (نمونه‌های ۲، ٤٨، ۸۷ و ۱۰۹) (به شکل ۲ مراجعه شود). علاوه بر جایگاه‌های ۱٥٤ و ۱۷۱ چندشکلی‌های دیگری در سایر کدون‌ها نظیر ۱٤٦، ۱٥٥، ۱٥۲، ۱٦۹، ۱۷۷ و ۱۸۷ مورد بررسی قرار گرفت. در این میان چند شکلی در جایگاه N146 S قبلاً گزارش شده است، اما چند شکلی در جایگاه‌های (E 155G)، (A169V)، (D 177N) و (C 187A) برای اولین بار در پژوهش مرادی و همکاران (۱۳۹۰) شناسایی شدند. لازم به ذکر می‌باشد که در پژوهش حاضر با بررسی‌های مجدد، تمامی ژنوتیپ‌های مذکور تایید شد ولی نمونه ٤٨ در هر دو جایگاه ۱٤٥ و ۱۷۱ و نمونه ۸۷ در جایگاه ۱٥۲ دارای ژنوتیپ هتروزیگوت می‌باشند (در شکل به صورت کادر نمایش داده‌شده) و نمونه‌ای ۲ و ۱۰۹ همان‌طور که در منحنی ذوب نیز بررسی شده بودند، کاملا مشابهت داشتند. نتایج حاصل از تکثیر ژن PRP در این پژوهش با نتایج مطالعات دیگر کاملا مطابقت دارد (Zhou et al. 2005). جایگاه ۱۳٦ بدون تغییر ژنتیکی بوده و در همه نمونه‌ها به صورت هموزیگوت (AA) بود.



شکل ۳- نمونه‌ای از تعیین ژنوتیپ حاصل از آنالیز منحنی ذوب اگزون سه ژن پرایون گوسفندی، نمونه‌های ۱۰۹ و ۲ دارای پیک یکسان هستند.



شکل ٤- نتایج تجزیه توالی پروتئینی ژن پرایون گوسفندی در جایگاه اگزون ۳

براساس چند شکلی در کدون‌های ۱۳٦، ۱٥٤ و ۱۷۱ (Dawson et al. 1998) گوسفندان را به ٥ گروه اصلی NSP1-5(R1-R5)، بر اساس میزان در معرض خطر بودن ژنوتیپ‌ها نسبت به بیماری اسکراپی تقسیم بندی کردند. این گروه‌بندی به عنوان پایه‌ای در طرح‌های ملی مربوط به کنترل و ریشه‌کنی بیماری اسکراپی که در بریتانیا (NSP, DEFRA.2007) انجام می‌گیرد مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به نتایج حاصل از برآورد فراوانی ژنوتیپ-

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.6.9]

های به دست آمده اکثر گوسفندان مورد بررسی در این پژوهش (٥٤ درصد) به لحاظ پتانسیل ژنتیکی مقاومت کمی به بیماری دارند (NSP3, 4, 5) و ٤٦ درصد در گروه‌های مقاوم (NSP1, 2) جای می‌گیرند (جدول ١) تاکنون گزارش رسمی از مشاهده این بیماری در نژادهای ایرانی منتشر نشده است.

جدول ١- مقایسه گروه‌های ژنوتیپی جایگاه مورد مطالعه در ژن پروتئین پرایون گوسفندی و عملکرد آن‌ها

عملکرد	ژنوتیپ‌ها	گروه‌ها
مقاومت بالا	ARR/ARR	NSP_1
مقاوم	ARR/AHQ, ARR/ARH, ARR/ARQ	NSP_2
مقاومت کم	ARQ/ARH,ARQ/AHQ, AHQ/AHQ, ARH/ARH, AHQ/ARH, ARQ/ARQ	NSP_3
حساس	ARR/VRQ	NSP_4
حساسیت بالا	AHQ/VRQ, ARH,VRQ, ARQ/VRQ, VRQ/VRQ	NSP_5

نتایج پژوهش حاضر در مقایسه با سایر تحقیقات انجام شده تفاوت زیادی نداشته و هاپلوژنوتیپ (ARQ/ARQ) و هاپلوتیپ (ARQ) بالاترین وفور را داشته‌اند. احتمالا فراوانی بالای این هاپلوتیپ و هاپلوژنوتیپ مربوط به آن می‌تواند به علت همبستگی این آلل با صفات مهم و اقتصادی باشد. براساس پژوهش‌های قبلی که در کشورهای مختلف انجام شده است، آلل ARQ به علت فراوانی زیاد به عنوان آلل وحشی پیشنهاد شد که این فرضیه با نتایج به دست آمده از این مطالعه قوت می‌گیرد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تکنیک تجزیه منحنی ذوب برای قطعاتی که یک SNP دارند بسیار قدرتمند عمل می‌کند ولی در قطعات تکثیری با بیش از چند SNP (همانند پژوهش حاضر)، تفکیک ژنوتیپ‌های متفاوت به راحتی میسر نخواهد بود. زمانی‌که تعداد آلل‌ها کم باشد، منحنی‌های کمتر و در نتیجه تفسیر نتایج راحتر می‌شود ولی تعداد آلل‌ها بیشتر از هفت آلل می‌شود تفسیر نتایج بسیار پیچیده خواهد شد (Mader et al. 2008). در مطالعه‌ای روی تعیین ژنوتیپ مخمر این ایده انکار شد و تجزیه منحنی ذوب نتوانست ژنوتیپ‌های SSR را علی‌رغم تنظیم پارامترهای آن مورد تفکیک قرار دهد (Costa et al. 2010). اخیراً، در پژوهش دیگر ژنوتیپ‌های SSR با استفاده از تکنیک تجزیه منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. اگرچه در مطالعه مذکور ٤ آلل و ٨ ژنوتیپ شناسایی شدند ولی محققان بیان کردند که این تکنیک هنوز یک تکنیک صحیح برای تعیین ژتوتیپ برای جایگاه مورد نظر نیست و دارای محدودیت‌هایی می‌باشد (Yang et al. 2014). هر چند در مطالعه حاضر با تنظیم پارامترها ژنوتیپ‌های مورد نظر تفکیک شدند و این تکنیک حساسیت بیشتری نسبت به روش PCR-SSCP داشت ولی یافتن راهی برای تجزیه منحنی‌های ذوب در قطعات حامل چندین SNP بدون استفاده از پروب، نیازمند مطالعات بیشتری می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان در تامین بودجه، امکانات آزمایشگاهی و نیز مشورت‌های علمی همکاران این مرکز کمال تشکر را داشته و صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

منابع

Akey J M, Sodnoski D, Para E, Dios S, Hester K, Su B, Bonilla C, Jin L, Shriver M D (2001) Melting Curve Analysis of SNPs (McSNP): A gel- free and inexpensive approach for snp genotyping. Biotechniques, 30: 358-367.

Animal Health Australia (2001) the National Animal Health Information System (NAHIS) Scrapie. Available at: http://www. Aahc.Com. au/nahis/disease/ dislist asp.

Anuj SN, Whiley DM (2010) Rapid single-nucleotide polymorphism-based identification of clonal Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis by the use of real-time PCR and high-resolution melting curve analysis Clinical Microbiology and Infection. 17:1403-8

Arsac JN, Andreoletti O, Bilheude JM, Lacroux C, Benestad SL, Baron T (2007) Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. Emerging Infectious Diseases Journal, 13: 58-65.

Baylis M, Goldmann W (2004) The genetics of scrapie in sheep and goats. Current Molecular Medicine 4: 385–396.

Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schonheit J, Tranulis MA, Bratberg B (2003) Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type. Veterinary Record 153: 202-208.

Buschmann A, Luhken G, Schultz J, Erhardt G, Groschup MH (2004) Neuronal accumulation of

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.6.9]

abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie resistant genotype (PrPARR/ARR). Journal of General Virology 85: 2727-33.
Byun, S.O., Fang, Q., Zhou, H and Hickford, J.G.H (2009) An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 385:174-175.
Costa JM, Garcia-Hermoso D, Olivi M, Cabaret O (2010) Genotyping of Candida albicans using length fragment and high-resolution melting analyses together with minisequencing of a polymorphic microsatellite locus. Journal of Microbiological Methods 80: 306-309.
Dawson M, Hoinville LJ, Hosie BD, Hunter N (1998) Guidance onthe use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Veterinary Record 142: 623-625.
Dıaz C, Vitezica ZG, Rupp R, Andreoletti O, Elsen JM (2005) Polygenic variation and transmission factors involved in the resistance-susceptibility to scrapie in a Romanov flock. Journal of General Virology 86: 849-857.
French DJ, Jones D, McDowell DG, Thomson JA ,Debenham PG (2007) Analysis of multiple single nucleotide polymorphisms closely positioned in the ovine PRNP gene using linear fluorescent probes and melting curve analysis. BMC Infectious Diseases 7:90.
Froehlich T, Hoffmann M (2006) Melting Curve-based Analysis of Adjacent SNPs. Biochemicals and Kits, www BioscienceTechnology com.
Goldmann W (2008) PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. Veterinary Research 39: 30.
Hunter N, Foster JD, Goldmann W, Stear MJ, Hope J, Bostock C (1996) Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. Archives of Virology 141: 809-824.
Mader E, Lukas B, Novak J (2008) A strategy to setup codominant microsatellite analysis for high-resolution-melting-curve-analysis (HRM). BMC Genetic 9: 69.
Nishizawa I, Sato M (2010) Differential detection of hemotropic Mycoplasma species in cattle by melting curve analysis of PCR products. Journal of Veterinary Medical Science 72: 77-79.
O'Doherty E, Aherne M, Ennis S, Weavers E, Roche JF, Sweeney T (2001) Prion protein gene polymorphisms in pedigree sheep in Ireland. Research in Veterinary Science 70: 51-6.
Oesch B, Westaway D, Wälchli M (1985) a cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. Cell 40: 735–46.
White H, potts G (2006) Mutation by high resolution melt analysis Evaluation of rotor-gene 6000(Corbett Life Sience), HR-1 and 384 well LightScanner (Idaho Technology). National Genetics Reference Laboratory (Wessex).
Ye J, Parra JE, Sosnoski MD, Hiester K, Underhill PA and Shriver MD (2002) Melting curve SNP Genotyping: a useful approach for Diallelic Genotyping in Forensic Science. Journal of Forensic Science 47:593-600.
Rouhi MA (2012) the determination of allelic polymorphism in Myostatin using melting curve analysis in Baluchi sheep. Dissertation, Sari agricultural science and natural resources University, Iran (In Farsi).
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 Farsi).
Laurén J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. Nature 457: 1128-32.
Yang M, Yue YJ, Guo TT, Han JL, Liu JB, Guo J, Sun XP, Feng RL, Wu YY, Wang CF, Wang LP, Yang BH (2014) Limitation of high-resolution melting curve analysis for genotyping simple sequence repeats in sheep. Genetic Molecular Research. 13: 2645-2653.
Zhou H, Hickford JG, Fang Q (2005) Technical Note: Determination of alleles of the ovine PRNP gene using PCR-single-strand conformational polymorphism analysis. Journal of Animal Science 83: 745-749.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.6.9]