دانشکده علوم دامی و شیلات

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نژاد دام

عنوان :

تعیین چند شکلی های آللی در جایگاه ژنی پروتئین پرایون با استفاده از آنالیز PCR-SSCP در گوسفندان نژاد زل، نائینی و بلوچی

استاد راهنما :

پروفسور قدرت رحیمی میانجی

استاد مشاور :

دکتر حمید دلدار

نگارش :

نورالدین مرادی

شهریور ۱۳۹۰

فهرست

۱-۱- مقدمه ۱

۲-۱- مروری بر منابع پیشین ۴

۲-۲- ساختار و رفتار پروتئین پرایون ۵

۲-۳- سد گونه ای ۷

۲-۴- انتقال بیماری ۱۰

۲-۵- تشخیص بیماری ۱۱

۲-۶- علائم بالینی اسکراپی ۱۱

۲-۷- سایر ژن های مرتبط با ژن پروتئین پرایون ۱۱

۲-۸- ژنPRP در گوسفند ۱۲

۲-۹-تنوع ژنتیکی ژنPRP گوسفند ۱۲

۳-۱- گوسفند زل مازندران ۱۴

۳-۲- گوسفند بلوچی ۱۵

۳-۳- گوسفند نائینی ۱۶

۳-۴- نمونه برداری و خون گیری ۱۷

۳-۵- استخراج DNA ۱۷

۳-۵-۱- بافر های به کار رفته در استخراج دی ان ای ۱۸

۳-۵-۱-۱- بافر جدا کننده: ۱۸

۳-۵-۱-۲- بافر لیز کننده: ۱۸

۳-۵-۱-۳- بافرTE: ۱۸

۳-۵-۲- مراحل استخراج دی ان ای به روش نمکی بهینه یافته ۲۰

۳-۵-۳- ذخیره سازی دی ان ای استخراج شده ۲۱

۳-۵-۴- تعیین ویژگی های کمی و کیفی دی ان ای استخراج شده: ۲۱

۳-۵-۴-۱- تعیین کیفیت و کمیت دی ان ای استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۲۲
۳-۵-۴-۲- تعیین کیفیت و کمیت دی ان ای استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۲۲
۳-۶- واکنش زنجیره ای پلیمراز (پی سی آر) ۲۳
۳-۶-۱- پروتکل و مواد استفاده شده در پی سی آر ۲۳
۳-۶-۲- مراحل انجام پی سی آر ۲۴
۳-۶-۳- تنظیم سیکل های حرارتی پی سی آر ۲۵
۳-۶-۳-۲- اتصال آغازگر ها ۲۶
۳-۶-۳-۳- بسط (طویل سازی) آغازگر ها ۲۶
۳-۷-۴-۳- محلول رنگ آمیزی ۳۱
۳-۷-۴-۴- محلول ظاهر سازی ۳۱
۳-۷-۵- مراحل انجام کار ۳۱
۳-۸- تعیین دقیق هاپلوتیپ ها و ژنوتیپ ها در نمونه های مورد بررسی ۳۲
۳-۹- همسانه سازی ۳۳
۳-۹-۱- استخراج DNA از روی ژل آگارز ۳۳
۳-۹-۲- واکنش اتصال ۳۵
۳-۱۰-۲- تهیه سلول های شایسته ۳۷
۳-۱۰-۳- ترانسفورماسیون ۳۹
۳-۱۰-۳-۱- تهیه محیط کشت باکتریایی حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، Xgal و IPTG ۳۹
۳-۱۱- جداسازی DNA پلاسمیدی ۴۰
۳-۱۲- تایید پلاسمید نوترکیب ۴۲
۳-۱۲-۱- انجام واکنش PCR با آغازگر های عمومی ۴۲
۳-۱۲-۲- انجام واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ۴۲
۳-۱۲-۳- تیمار آنزیمی ECOR ۱ ..... ۴۳

۳-۱۴- تجزیه و تحلیل داده ها ۴۴

۳-۱۴-۱- آنالیز و مقایسه توالی قطعه تکثیری ۴۴

۳-۱۴-۲- برآورد میزان وفور ژنی و ژنوتیپی و هاپلوژنوتیپی و مقایسه آنها بین نژادهای مختلف ۴۴

۴-۱- استخراج دی ان ای ۴۵

۴-۲- تعیین چند شکلی های موجود در نشانگر ۴۴

۴-۲-۱-تکثیر قطعه مورد نظر ۴۴

۴-۲-۲ آنالیز ژنتیکی با استفاده از PCR-SSCP ۴۵

۴-۲-۳- همسانه سازی نمونه ها ۴۶

۴-۲-۳-۱- استخراج DNA از روی ژل آگارز ۴۶

۴-۲-۳-۲- اتصال ژن هدف به حامل (PGEM-T Easy vector) وانتقال آن به سلول های مستعد ۴۷

۴-۲-۳-۳- انتخاب کلنی حامل ژن هدف ۴۸

۴-۲-۳-۴ جداسازی DNA پلاسمیدی ۴۸

۴-۲-۳-۵-تایید پلاسمید نوترکیب ۴۹

۴-۲-۳-۵-۱ انجام واکنش PCR با آغازگر های عمومی ۴۹

۴-۲-۳-۵-۲انجام واکنش PCR با آغازگر های اختصاصی ۵۰

۴-۲-۳-۵-۳ تیمار آنزیمی *ECOR ۱* ۵۱

۴-۲-۴- آنالیز نتایج حاصل از تعیین توالی ۵۱

۴-۲-۴-۱- بررسی و تصحیح توالی ها ۵۱

۴-۲-۴-۲ مقایسه و آنالیز توالی های حاصل از نمونه های مختلف ۵۲

۴-۲-۴-۳ مقایسه و آنالیز توالی اسید های آمینه ۵۳

۴-۳- برآورد میزان و فور ژنی و ژنوتیپی و مقایسه آنها بین نژادهای مختلف ۵۴

۴-۴- برآورد میزان و فور هاپلوتیپی و هاپلو ژنوتیپی و مقایسه آنها بین نژادهای مختلف ۵۶

۴-۵- چند شکلی در سایر کدون ها ۵۷

۴-۶-بررسی میزان مقاومت و حساسیت جمعیت های مورد مطالعه نسبت به بیماری اسکراپی..... ۵۸

۵-بحث ۵۹

۶-منابع ۷۶

فهرست جدول ها

جدول ۳-۱- وزن در سنین مختلف در گوسفند زل..... ۱۴

جدول ۳-۲- مواد تشکیل دهنده بافر جدا کننده..... ۱۸

جدول ۳-۳- مواد تشکیل دهنده بافر لیز کننده..... ۱۸

جدول ۳-۴- مواد تشکیل دهنده بافر TE ۱۸

جدول۳-۵- اجزای تشکیل دهنده بافر بارگذاری ۲۲

جدول ۳-۶- مواد استفاده شده در واکنش زنجیره ای پلیمراز برای نشانگر ژن پروتئین پرایون ۲۳

جدول ۳-۷- توالی آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش ۲۴

جدول ۳-۸- ضریب خطای استفاده شده در تهیه مخلوط MASTER ۲۴

جدول ۳-۹- دماهای استفاده شده در سیکل های پیسیآر (درجه سانتیگراد) ۲۶

جدول ۳-۱۰- زمان ها و تعداد سیکل های استفاده شده در پی سی آر ۲۶

جدول۳- ۱۱- مواد لازم برای تهیه ۶۵ میلی لیتر ژل اکریل آمید ۲۷

جدول ۳-۱۲- مواد لازم جهت تهیه بافر بارگذاری SSCP ۲۹

جدول ۳-۱۳- مواد لازم جهت تهیه محلول ثابت کننده..... ۳۰

جدول۳- ۱۴- مواد لازم جهت تهیه محلول رنگآمیزی..... ۳۰

جدول ۳-۱۵-مواد لازم جهت تهیه محلول ظاهرسازی ۳۰

جدول ۳-۱۶- اجزای واکنش اتصال ۳۴

جدول۳-۱۷- بافرهای استخراج پلاسمید و اجزای آنها ۴۰

جدول ۳-۱۸- مواد استفاده شده در واکنش PCR برای تائید پلاسمید های نوترکیب با آغازگرهای عمومی ۴۱

جدول ۳-۱۹- مواد استفاده شده در واکنش PCR برای تائید پلاسمید های نوترکیب حامل ژن پروتئین پرایون..... ۴۲

جدول ۳-۲۰- شرایط انجام واکنش هضم DNA پلاسمید نوترکیب ۴۲

جدول۴-۲- تعیین چند شکلی های موجود در نشانگر ۴۴
جدول ۴-۱-فراوانی آللی در نژاد های زل، نائینی و بلوچی..... ۵۵
جدول ۴-۲-فراوانی ژنوتیپی زل، نائینی و بلوچی..... ۵۵
جدول ۴-۳- تقسیم بندی گروه های ژنوتیپی براساس میزان مقاومت و حساسیت و فراوانی هر گروه در نژاد های زل، نائینی و بلوچی..... ۵۷
جدول ۵-۱ تقسیم بندی گروه های ژنوتیپی به همراه عملکرد هر گروه..... ۶۷

فهرست نگاره ها

نگاره ۲-۱- مدل پیشرفت بیماری انسفالوپاتی اسفنجی..... **Error! Bookmark not defined.**

نگاره ۲-۲- رونویسی، ترجمه و اصلاحات بعد ترجمه ای پروتئین پرایون.. **Error! Bookmark not defined.**

نگاره ۲-۳- درخت فیلوژنی براساس میزان تقارب توالی اسیدهای بین گونه های مختلف... **Error! Bookmark not defined.**

نگاره ۲-۴- ضایعات پوستی درگوسفند مبتلا به اسکراپی..... **Error! Bookmark not defined.**

نگاره ۳-۱ الف: قوچ نژاد زل؛ ب: میش نژادزل ۱۵

نگاره ۳-۲- گوسفند بلوچی..... ۱۶

نگاره ۳-۳- گوسفند نائینی ۱۷

نگاره ۳-۴- تصویر شماتیکی از ساختار وکتور PGEM-T Easy Vector ۳۵

شکل ۳-۵- نحوه اتصال وکتور و قطعه DNA خارجی ۳۶

نگاره ۴-۱- نمونه ای از دی ان ای استخراج شده به روش بهینه نمکی روی ژل آگارز ۰/۸ درصد ۴۴

نگاره ۴-۲- نمونه هایی از باند های حاصل از تکثیر ژن پروتئین پرایون..... ۴۵

نگاره ۴-۴ نمونه ای از الکتروفورز محصولات پی سی آر توسط ژل پلی اکریل آمید ۱۴٪..... ۴۶

نگاره ۴-۵-الکتروفورز نمونه های استخراج شده روی ژل ۱٪؛..... ۴۷

نگاره ۴-۶ نمونه ای از کلنی های سفید وآبی تشکیل شده در محیط کشت ۴۸

نگاره ۴-۷ واکنش PCR با تک کلنی های انتخاب شده برای هریک از نمونه های موردبررسی..... ۴۹

نگاره ۴-۸ الکتروفورز پلاسمید های استحصال شده روی ژل آگارز ۱٪ ۴۹

نگاره ۴-۱۰ واکنش PCR با تک کلنی های انتخاب شده برای هریک از نمونه های مورد بررسی. ۵۰

نگاره ۴-۱۰ واکنش PCR با استفاده از آغازگر های اختصاصی برای هر یک از پلاسمیدها. ۵۱

نگاره ۴-۱۱ تیمار آنزیمی پلاسمید نوترکیب با ECOR۱. چاهک ۱: پلاسمید حلقوی (کنترل). ۵۲

نگاره۴-۱۲ بخشی از توالی یکی از نمونه ها را نشان می دهد..... ۵۳

نگاره ۴-۱۳- نتیجه همردیفی چند تایی توالی نوکلئوتیدی آلل های شناسایی شده در این پژوهش. ۵۴

نگاره ۴-۱۴- نتیجه همردیفی چند تایی توالی اسید آمینه آلل های شناسایی شده در این پژوهش. ۵۵

چکیده

زئونوزها یا بیمار های قابل انتقال بین انسان و حیوان هم از نظر اقتصادی و هم از نظر بهداشت عمومی از اهمیت بالایی برخوردار بوده و در این سال های اخیر تلفات و خسارات سنگین ناشی از این بیماری در بسیاری از کشور های جهان ها به طور جدی مورد توجه قرار گرفته است. اسکراپی که یک بیماری مهلک، کشنده و تحلیل برنده سیستم اعصاب مرکزی است در این دسته جای می گیرد. پژوهش های متعدد در نژادهای مختلف گوسفند نشان داد که چند شکلی درکدون های ۱۳۶، ۱۵۴ و ۱۷۱ ژنPrP با میزان حساسیت و مقاومت نسبت به این بیماری مرتبط است. اما علی رغم اهمیت این موضوع، تا به حال تحقیقات گسترده ای در ارتباط با این بیماری در ایران انجام نشده است. در پژوهش حاضر نمونه های خون از تعداد ۴۵۰ راس گوسفند از نژادهای زل، نائینی و بلوچی تهیه و استخراج DNA با استفاده از روش بهینه یافته نمکی انجام شد. قطعه ای به طول ۱۷۳ جفت باز از اگزون ۳ ژن PrP که کدون های ۱۲۹ تا ۱۸۷ را در بر می گرفت توسط PCR تکثیر و آنالیز SSCP با الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۱۴درصد غیر دناتوره انجام گرفت. ده الگوی باندی منحصر به فرد SSCP به عنوان ده ژنوتیپ متفاوت از ژن PrP گوسفندی در جمعیت های مورد مطالعه شناسایی شد. از هر الگوی باندی یک نمونه انتخاب و در حامل مناسب همسانه سازی و سپس تعیین توالی شد. آنالیز و همردیفی توالی های DNA و اسیدهای آمینه نمونه های مختلف با استفاده از نرم افزار Bio Edit انجام گرفت. ارزیابی ژنتیکی ژن PrP در نمونه های مورد بررسی نشان داد که تنها در جایگاه های ۱۵۴ (R/H) و ۱۷۱ (Q/R/H/K) چند شکلی وجود داشته در حالی که در جایگاه ۱۳۶ جهش ژنتیکی وجود نداشته و همه نمونه ها دارای ژنوتیپ مونومورف (AA) بودند. برای جایگاه ۱۵۴در مجموع دو آلل R و H و دو ژنوتیپ RR و RH مورد شناسایی قرار گرفت. فراوانی آللی در هر سه نژاد بسیار نزدیک بوده و تفاوت معنی داری با هم نداشته و بیشترین فراوانی مربوط به آلل R با فراوانی ۰/۸۸ برآورد شد. در این جایگاه به طور میانگین فراوانی ژنوتیپ RR و RH به ترتیب برابر با ۰/۷۶ و ۰/۲۴ مشاهده شد. برای جایگاه ۱۷۱چهار آلل Q، R، H و K و شش ژنوتیپ QQ، QR، QK، QH، HH و RR مورد شناسایی قرار گرفت که بیشترین فراوانی آللی مربوط به آلل Q با فراوانی ۰/۶۵ بود. در این جایگاه فراوانی آللی نژاد زل با دو نژاد دیگر متفاوت اما تفاوت معنی داری بین دو نژاد بلوچی و نائینی وجود نداشت. آلل K در نمونه های مورد بررسی نژاد زل حضور نداشت. در مجموع ژنوتیپ QQ بیشترین فراوانی ژنوتیپی (۰/۴۳) و ژنوتیپ QK کمترین فراوانی ژنوتیپی (۰/۰۱) را داشتند. در مجموع ۴ هاپلوتیپ ARR، ARQ، ARH و AHQ و ۹ ترکیب هاپلوژنوتیپی ARQ/ARQ، ARR/ARQ، ARR/ARR، ARR/AHQ، AHQ/ARQ، AHQ/ARH، ARH/ARH، ARH/ARQ، ARQ/ARK در این مطالعه شناسایی شد. فراوانی هاپلوتیپی در نژاد زل با دو نژاد دیگر متفاوت اما تفاوت معنی داری بین نمونه های دو جمعیت بلوچی و نائینی مشاهده نشد. برای اولین بار در این پژوهش، علاوه بر جایگاه های ۱۵۴ و ۱۷۱ در کدون ها ی (G ۱۵۵ E)، (A ۱۶۹ V)، (N ۱۷۱ D) و (A ۱۸۷ C) جهش های جدیدی شناسایی شدند. بر اساس میزان در معرض خطر بودن ژنوتیپ ها نسبت به بیماری اسکراپی ۵۴ درصد از حیوانات مورد بررسی در این پژوهش در گروه با مقاومت کم (NSP۳)، ۱۰ درصد از حیوانات در گروه بسیار مقاوم (NSP۱) و ۳۶ درصد از حیوانات (NSP۲) در گروه مقاوم جای گرفتند.

کلمات کلیدی: چند شکلی، اسکراپی، پی سی آر، اس سی پی، تعیین توالی، زل، نائینی، بلوچی

کوتاه واژگان

PRP: prion protein

TSE: transmissible spongiform encephalopathies

BSE: bovine spongiform encephalopathies

CJD: creutzfed-jakob disease

UTR: untranslated region

NSP: national scrapiepaln

R: argenine

H: histidine

Q: gulotamin

A: alanin

V: valine

$A_{۱۳۶}R_{۱۵۴}R_{۱۷۱}$: ARR

A $_{۱۳۶}R_{۱۵۴}$ $H_{۱۷۱}$: ARH

$A_{۱۳۶}H_{۱۵۴}Q_{۱۷۱}$: AHQ

$A_{۱۳۶}R_{۱۵۴}Q_{۱۷۱}$: ARQ

$V_{۱۳۶}R_{۱۵۴}Q_{۱۷۱}$: VRQ

NSP: national scrapie plan

مقدمه

جمعیت جهان در آغاز هزاره جدید از مرز ۶ میلیارد نفر گذشته و در سال ۲۰۳۰ جمعیت جهان به ۱۰ میلیارد نفر خواهد رسید. بر اساس تخمین سازمان ملل متحد، در سال ۲۰۲۵ بیش از نیمی از مردم جهان در شهر ها زندگی خواهند کرد. این عده به تولیدات غذایی کشاورزان متکی خواهند بود. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که تولیدات غذایی جهان تا سال ۲۰۲۵ باید دو برابر شود تا نیاز های جمعیت رو به رشد در حد فعلی رفع گردد (نقوی وهمکاران ۱۳۸۶).

بخشی از تامین نیاز های فوق در گرو صنعت گوسفنداری توسعه این صنعت در مناطق مختلف دنیا تحت تاثیر شرایط طبیعی و اقتصادی می باشد. شرایط طبیعی مانند ناهمواری‌ها و ارتفاعات عاری از درختان جنگلی مکان مناسبی در پرورش گوسفند به شمار می‌آیند (عزت پور ۱۳۸۱). با توجه به اینکه گوسفند می-تواند مسافت‌های زیادی را در صحرا برای چرا طی کند این حیوان در مقایسه با گاو در مناطقی که دارای پوشش گیاهی ضعیف می‌باشند برای پرورش مفیدتر است. صنعت گوسفندداری در اقتصاد ملی کشور نقش موثری دارد، به طوری‌که بخش قابل توجهی از تولیدات گوشت قرمز، شیر، پشم و پوست از این صنعت تأمین می‌شود. برابر با آمار بدست آمده در سال ۱۳۸۲ شمار گوسفندان ایران ۵۱۹۵۹۰۰۰ راس بوده است. گوشت به دست آمده از گوسفندان در این سال برابر با ۴۱۶/۸ هزار تن بوده است (توکلیان ۱۳۷۸).

علم اصلاح نژاد دام امروزه به عنوان یک ابزار قوی و مطمئن جهت رفع یا حذف عوامل نامطلوب در موجودات زنده به کار گرفته می شود تا زمینه و بستر مناسب بهره وری و افزایش قابلیت های دام فراهم شود.

کنترل بیماری ها از مسائل عمده ای است که تولید کار آمد دام به آن وابسته است. انتخاب در جهت توان تولیدی بهتر حیوانات نیز خود شامل مقدار معینی از انتخاب طبیعی است که برای افزایش مقاومت ژنتیکی به بیماری ها در طبیت انجام می‌شود. زیرا حیواناتی که بهتر تولید می کنند، باید سالم و عاری از عفونت یا آلودگی ها باشند. تا به امروز انسان، انتخاب را با شناخت خیلی جزئی برای مقاومت به بیماری ها

انجام داده ، اگر چه طبیعت همیشه در این راستا انتخاب کرده است. عمده مشکلات مرتبط به کنترل ژنتیکی بیماری در حیوانات عبارتند از:

۱- پایین بودن تعداد نتاج در هر نسل

۲- فاصله ی نسل نسبتاً طولانی

۳- در معرض بیماری قرار دادن حیوانات برای شناسایی مقاومت ژنتیکی آنها نسبت به یک بیماری خاص، مستلزم ضررهای اقتصادی هنگفتی است و به علت تلفات زیاد، تحمل آن برای تولید کنندگان غیر ممکن خواهد بود و امکان دارد حیواناتی که زنده مانده اند ، ناقل عفونت به گله و رمه های مجاور شوند.

۴- مقاومت ژنتیکی نسبت به بیماری در دام ها به یک جفت ژن مربوط نبوده و اغلب به صورت چند ژنی کنترل می شود. در چنین مواردی ایجاد سویه ای از حیوانات مقاوم به بیماری، یک روند طولانی مدت بوده و پیشرفت به کندی صورت خواهد گرفت. زیرا قبل از این که بتوان انتخاب انجام داد، بایستی حیوانات تولید شده جهت شناسایی افراد مقاوم به بیماری، در معرض آن بیماری خاص قرار گیرند. امّا احتمال پیدا کردن صفاتی از حیوانات برای استفاده به عنوان شاخص مقاوم یا حساس بودن آنها در برابر بیماری وجود دارد. از این رو انتخاب برای مقاومت نسبت به بیماری می تواند بر اساس این شاخص های قابل اندازه گیری ، بدون در معرض بیماری قرار دادن حیوانات، استوار باشد (لازلی ۱۳۸۴).

زئونوزها یا بیماری های 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 سنگینی ناشی از این بیماری ها مورد توجه قرار گرفته است (ذوقی و همکاران ۱۳۸۳).

پرایون، پروتئینی است که به طور عادی در سلول های عصبی بیان می شود (الکساندر و همکاران ۲۰۰۵، گلدمن ۲۰۰۸). جهش در این پروتئین می تواند باعث تغییرساختار این پروتئین شده به طوری که پروتئین های جهش یافته می توانند مجتمع شده و توده های پروتئینی را در سلول های عصبی ایجاد کنند.این توده ها باعث انسفالوپاتی های اسفنجی شکل در مغز می شوند (دتویلر و همکاران ۱۹۹۲). اسکراپی، که یک بیماری مهلک، کشنده و تحلیل برنده سیستم اعصاب مرکزی است (هوریوچی وهمکاران

۱۹۹۷) در این دسته جای می گیرد. در سال های اخیر بیماری اسکراپی به عنوان موضوع مهمی در سلامت عمومی مورد توجه قرار گرفته است (ایانوزی و همکاران ۱۹۹۸). خصوصیات بیولوژیکی و بیوشیمیایی منحصر به فرد این عامل عفونی و ارتباط آن با بیماری BSE[۱] در گاو و CJD[۲] در انسان توجه زیادی را به خود جلب کرده است . اسکراپی گوسفندان در اکثر کشورهای اروپایی، کانادا، ایالات متحده، کلمبیا و در بعضی از کشورهای آسیایی گزارش شده است (بوکا و همکاران ۲۰۰۶، کمیته اروپا ۲۰۰۷). در حال حاضر بسیاری از کشورهای دنیا تحقیقات وسیعی را در سطح گله‌های گوسفند خود آغاز کرده‌اند. به طور کلی برنامه های ریشه کن کردن این بیماری بر اساس ایجاد محدودیت در استفاده از گوسفندان دارای آلل حساس پروتئین پرایون یا انتخاب گوسفندان با آلل مقاوم پروتئین پرایون یا هر دو روش انجام می شود. اما علیرغم اهمیت این موضوع، تا به حال تحقیقات گسترده ای در این ارتباط در ایران انجام نگرفته است.

بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، استفاده از نشانگری است که بتواند مهم ترین بخش از ORF[۳] ژن پروتئین پرایون را با دقت زیادی مورد بررسی قرار دهد. از آنجائیکه در پژوهش های متعددی در نژادهای مختلف گوسفند نشان داده شد که چند شکلی در ژن پروتئین پرایون با میزان حساسیت و مقاومت به این بیماری مرتبط است. در این پژوهش فرض بر این است که ژن پروتئین پرایون در جمعیت گوسفندان ایرانی دارای چند شکلی می باشد. هدف اصلی این پژوهش، ارزیابی ژنتیکی کدون‌های چند شکل در اگزون۳ ژن پروتئین پرایون خصوصاً کدون های ۱۳۶، ۱۵۴ و ۱۷۱ در گوسفندان نژاد زل، نائینی و بلوچی بوده است.

---

[۱] Bovine spongiform encephalopathies
[۲] Creutzfeldt-Jakob disease
[۳] Open reading frame

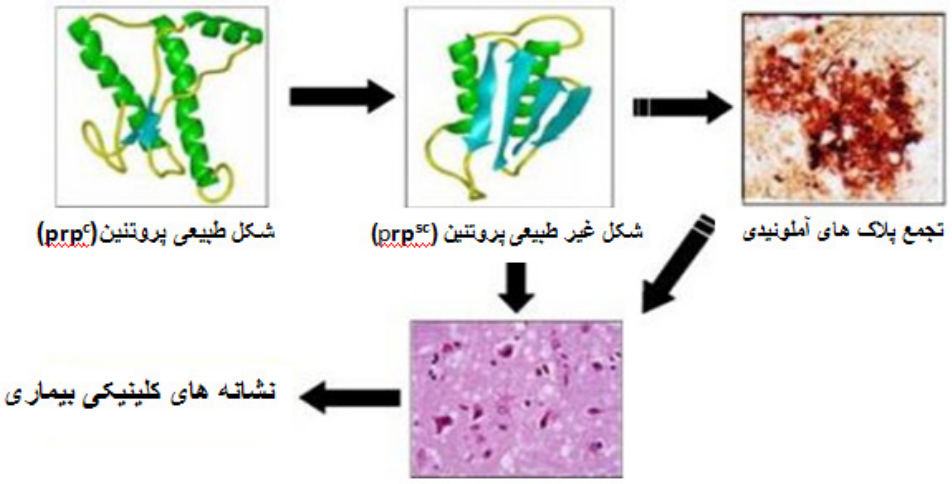
مروری بر منابع پیشین

پرایون ها عامل گروهی از بیماری های تخریب کننده سلول های عصبی یا نورون ها هستند که در حال حاضر به دلیل سبب شناسی و بیماری زایی پیچیده آنها در گروهی از پروتئین ها به نام پروتیئن های پرایونی طبقه بندی می شوند (دتویلر و همکاران، ۱۹۹۲).

بیماری های حاصل از پرایون ها تظاهرات عفونی خود را با ایجاد بی نظمی های انفرادی و ژنتیکی بروز می دهند. این بیماری ها دارای توانایی انتقال در بین پستانداران می باشند که انتقال به وسیله ذرات عفونی که پرایون نامیده می شوند، صورت می گیرد. علیرغم تحقیقات گسترده ای که در سه دهه ی گذشته روی پرایون ها صورت گرفته است، وجود هیچ گونه اسید نوکلئیک یا ماده ژنتیکی مربوط به آنها در سلول اثبات نشده است (دتویلر و همکاران، ۱۹۹۲) و در حال حاضر، گفته می شود که یک ایزوفرم تغییر یافته از پروتئین پرایون[۴] ساخته شده توسط میزبان که معروف به PrP^{sc}[۵] می باشد برای ایجاد عفونت ضروری است. در واقع، اطلاعات تجربی قابل ملاحظه ای ثابت کرده است که پرایون ها ترکیبات گسترده ای از PrP^{sc} می باشند (بروشلت وهمکاران، ۱۹۹۰). در توصیف بیماری های پرایونی اصطلاحاتی از قبیل انسفالوپاتی اسفنجی شکل قابل انتقال[۶] نیز به کار برده می شود. روند پیشرفت بیماری های پریونی در نگاره ۲-۱ نشان داده شده است.

---

[۴] Prion Protein
[۵] Scrapie prion protein
[۶] Transmissible spongiform encephalopathy



نگاره ۲-۱- مدل پیشرفت بیماری انسفالوپاتی اسفنجی شکل (برگرفته از دیپندرا و همکاران ۲۰۱۰)

به طور کلی، پرایون ها از چند نظر با تمام عوامل بیماریزای عفونی شناخته شده تفاوت دارند. اولاً پرایون ها فاقد اسید نوکلئیک جهت تکثیر و تزاید می باشند، در حالی که ویروس ها، ویروئیدها، باکتری ها، قارچ ها و انگل ها همگی دارای یک ناحیه ژنومی از جنس اسید نوکلئیک بوده که جهت تکثیر آنها بـه کـار مـی رود. ثانیاً، تنها ترکیب شناخته شده ای که تشکیل دهنده پرایون هاست، یک پروتئین تغییر شکل یافته است که توسط یک ژن سلولی ساخته می شود. ثالثاً، اصلی ترین و احتمالاً تنها ترکیب پرایونی، ایزوفرم اسـکراپی[۷] از پروتئین پرایونی (prp^{sc}) است که شکل بیمـاریزای ایزوفـرم سـلولی prp^c مـی باشـد (پروسـینر و همکـاران، ۱۹۸۲). نتایج بدست آمده حاکی از آن است که بیماری های پرایونی بـه علـت تغییـر شـکل سـاختاری در تبدیل prp^c به prp^{sc} ایجاد می شوند. تاکنون prp^c در تمامی پستانداران و پرنـدگان مـورد مطالعـه تشـخیص داده شده است. این پروتئین توسط گلیکولیپیدی غشایی به سطح خارجی سلول ها متصل شـده و عملکـرد این پروتئین شناخته شده است (بروشلت وهمکاران، ۱۹۹۰؛ کاگی[۸] و همکاران، ۱۹۹۱). محققـین دیگـر بـر این عقیده اند که اسکراپی به طور طبیعی یک بیماری عفونی است و خصوصیات ژنتیکی میزبـان تنهـا مـی تواند میزان حساسیت به عامل عفونت های آندمیک را تعیین نماید (دیکنسون و همکاران، ۱۹۷۲).

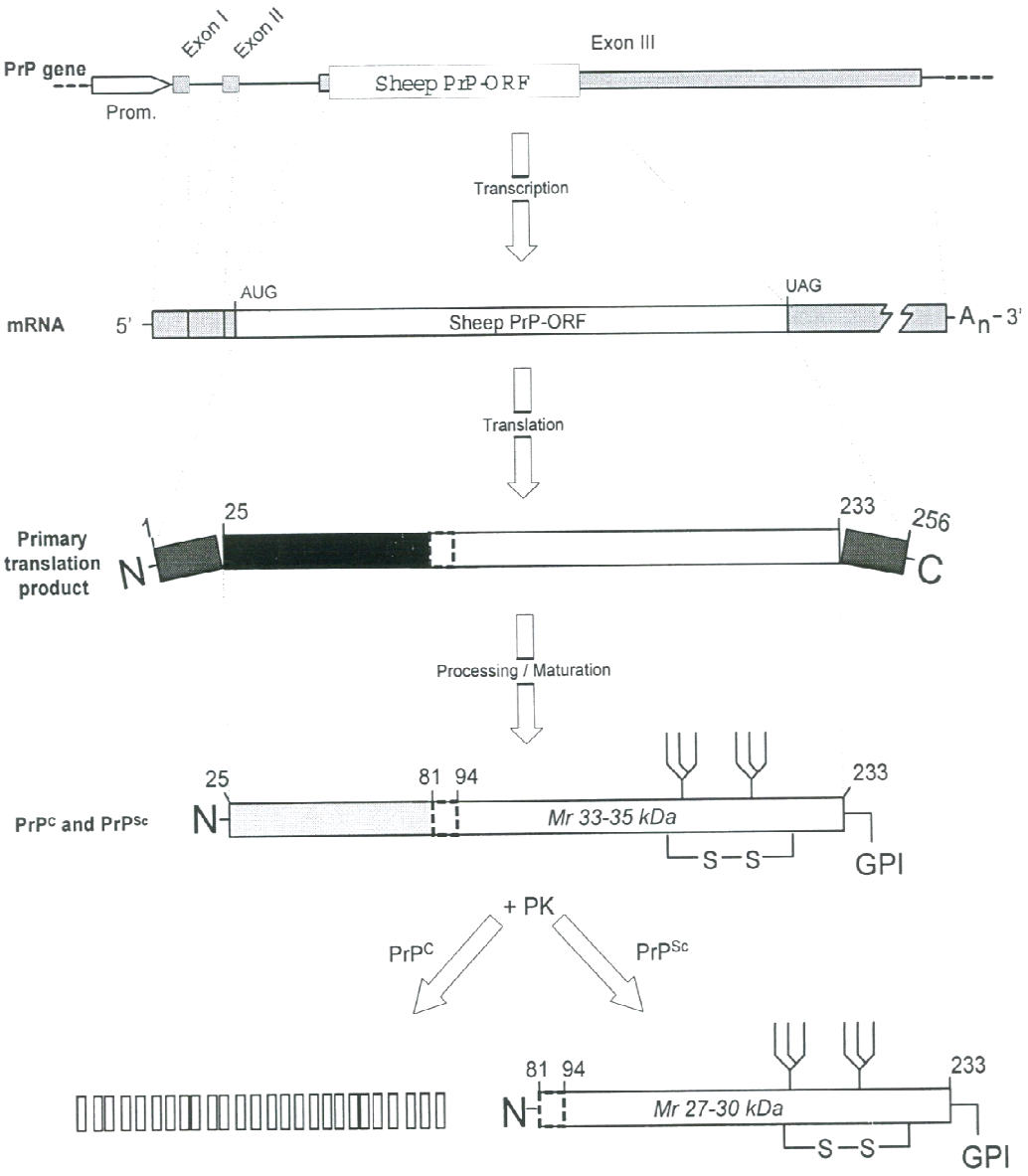
[۷] Scrapie
[۸] caughey

ساختار و رفتار پروتئین پرایون

ساختار ژن prp در بین پستانداران به خوبی حفظ شده است[۹] (شباهت ۹۰ درصد یا بیشتر). در تمام پستانداران آزمایش شده ORF[۱۰] کاملا درون یک اگزون منفرد قرار گرفته است. لازم به ذکر است که تنها یک mRNA مرتبط با prp تشخیص داده شده است. (باسلر و همکاران، ۱۹۸۶؛ وستاوی و همکاران، ۱۹۹۱). نتیجه عملکرد ژن prp طبیعی یک قطعه پلی پپتیدی ۲۵۶ آمینو اسیدی با وزن مولکولی ۳۵-۳۳ کیلو دالتون است که در حین مطالعات غیر منتظره ای کشف و بعداً prp^c نامیده شد (اوش و همکاران، ۱۹۸۵؛ باسلر و همکاران، ۱۹۸۶). prp^c بطور کامل با پروتئاز K هیدرولیز می شود و در پاک کننده های غیر دناتوره کننده محلول می باشد. این در حالی است که پروتئاز K در مواجهه با prp ۳۰-۲۷ کیلو دالتونی (prp^{sc}) تنها بخشی که به اندازه حدوداً ۶ کیلو دالتون از قسمت انتهایی N تا از prp^{sc} که مربوط به شکل فضایی می باشد (تقریباً بین کدون های ۸۱ تا ۹۴) از پروتئین پرایون را جدا می کند (مقاومت نسبی). این پروتئین در پاک کننده ها غیر محلول بوده و prp^{sc} نامیده می شود (پروسینر و همکاران، ۲۰۰۱). به نظر می رسد که prp^{sc} از prp^c توسط یک فرآیند بعد ترجمه ای پدید می آید (باسلر و همکاران، ۱۹۸۶؛ بورشلت و همکاران، ۱۹۹۲). توالی اسید آمینه prp^{sc} دقیقاً مشابه با آن چیزی است که در مورد توالی ترجمه شده DNA، کد کننده ژن prp پیش بینی می شد. در فرآیند بعد از ترجمه، هیچ گونه تغییر شیمیایی منحصر به فردی که بتواند prp^{sc} را از prp^c متمایز کند، تشخیص داده نشده است. از این رو به نظر می رسد که prp^c در روند تبدیل به prp^{sc} دچار یک تغییر ساختمانی می شود (باسلر و همکاران، ۱۹۸۶؛ استال و همکاران، ۱۹۹۳). این تغییرات در نگاره ۲-۲ نشان داده شده است.

---

[۹] Conserve
[۱۰] Open reading frame



نگاره ۲-۲- رونویسی، ترجمه و اصلاحات بعد ترجمه ای پروتئین پرایون

prp^c از نظر ساختمانی حاوی چهل و پنج درصد مارپیچ آلفا[۱۱] بوده و به طور کامل فاقد صفحات بتا[۱۲] می باشد (پان و همکاران، ۱۹۹۳). در تبدیل prp^c به prp^{sc} پروتئینی حاوی سی درصد مارپیچ آلفا و چهل و پنج

[۱۱] α– Helix

[۱۲] β-Sheet

درصد صفحات بتا ایجاد می شود. مکانیسمی که توسط آن prp^{c} به prp^{sc} تبدیل مـی شـود، شـناخته نشـده است. اما به نظر می رسد احتمال این که ژن دیگری، پروتئینی مانند X را تولید نمایـد و ایـن پـروتئین بـه عنوان ماده واسط برای تبدیل prp^{c} به prp^{sc} عمل کند زیاد است. در این صورت این ماده واسط می توانـد بـه عنوان عامل اصلی در بیماریزایی بیماری های پرایونی در نظر گرفته شود (پان وهمکـاران، ۱۹۹۳؛ پروسـینر وهمکاران، ۲۰۰۳).

سد گونه ای

در یک بررسی دانشمندان نشان دادند که اگر پرایون غیر طبیعی موش را به مغز موش سالمی، که دارای ژن PRNP است، تزریق کنند پروتین پرایون غیر طبیعی در حیوان به مقدار زیادی ایجاد می شود. امّا اگر همین پرایون را به موشی که فاقد ژن PRNP[۱۳] است تزریق نمایند، انتقال بیماری صورت نمی گیرد و پرایون غیـر طبیعی ایجاد نمی شود. این مسئله بیانگر اهمیت وجود پرایون طبیعی در پـذیرش بیمـاری پرایـونی اسـت. یعنی برای آنکه موجودی دچار بیماری پرایونی شود، باید حتماً پرایون طبیعی را در بدنش داشـته باشـد در غیر این صورت انتقال بیماری صورت نخواهد گرفـت (تـوبلر و همکـاران، ۱۹۹۶؛ بـولر و همکـاران، ۱۹۹۲ و ۱۹۹۳).

در همین پژوهش آنها پرایون غیر طبیعی انسان ($Hu\ prp^{sc}$) را به مغز یک موش سالم دارای ژن PRNP تزریق کردند و متوجه شدند که تنها در ۱۰ درصد آنها انتقال بیماری و ایجاد پرایون غیر طبیعی اتفاق می افتد. اما وقتی موش ترانسژنیکی به وجود آوردند که هم حامل پرایون طبیعی انسانی و هم پرایون طبیعی موش بود و وقتی پرایون غیر طبیعی انسانی را به آن تزریق نمودند در تمام موش ها انتقال بیماری و ایجاد پرایون هـای غیر طبیعی صورت گرفت.

این مساله نشان می دهد که چون پرایون طبیعی موش ها در ۲۸ اسید آمینه با پرایون انسانی تفـاوت دارد، تزریق پرایون غیر طبیعی انسان نمی تواند به راحتی در موش ایجاد بیماری کند. اما با تغییری که در پرایون

[۱۳] Knockout

طبیعی موش ایجاد و آن را مشابه فرم انسانی طراحی کرده بودند، توانستند بیماری انسانی را بـه آن انتقـال دهند وجود تشابه بین پرایون میزبان و مهمان یکی از شرایط انتقال بیماری پرایـونی مـی باشـد (اسـکات و همکاران، ۱۹۹۷؛ کالینگ و همکاران، ۲۰۰۱). این مطالعه و مطالعات دیگر نشان داد که انتقال پرایون از یک گونه به گونه دیگر نیاز به عوامل و فاکتورهای خاصی دارد که عدم وجود آنها کلاً مانع از انتقال بیماری های پرایونی بین دو گونه می شود. گاهی دوره نهفتگی بیماری بسیار طولانی می شود، در واقع یک سد یـا مـانع در انتقال پرایون بین گونه های مختلف ایجاد می نماید که به آن سد گونه ای می گوینـد. سـد گونـه ای را حداقل به سه فاکتور مرتبط می دانند: ۱- تفاوت در توالی ژن PRNP بین میزبان جدید و قدیم، که هر چـه تفاوت بیشتر باشد احتمال انتقال کمتر است. ۲- سویه پرایون و ۳- وجود فاکتورهای موثر در تبدیل پرایون طبیعی به غیر طبیعی به خصوص پروتئین X (اسکات وهمکاران، ۱۹۹۳؛ تلینگ و همکاران، ۱۹۹۵) .

بررسی پروتئین پرایون در موجودات مختلف نشان داد که پرایون در گونه های مختلف با هـم تفـاوت هـایی دارد. بیشترین تفاوت بین پرایون انسان با پرایون جوجه دیده شده است (۳۰ درصد) بـین پرایـون انسـان و جوندگان نیز تفاوت زیادی وجود دارد. پرایون انسانی در ۳۰ اسید آمینه با پرایـون گـاوی تفـاوت دارد. ولـی پرایون گوسفند در ۷- ۸ اسید آمینه با عامل پرایون گاوی متفاوت است و به همین دلیل عامل اسکراپی بـه راحتی به گاوها منتقل شده ولی به انسان انتقال نمی یابد. گاو و گوسفند از نظر تکاملی بسیار به هم نزدیک و هر دو متعلق به خانواده بوویده هستند. که احتمالاً از ۲۰ میلیون سال قبل از هم جدا شـدند و بـه همـین دلیل وقتی از راه مناسب پرایون غیر طبیعی از گوسفندان به گاوها منتقل شد در آنها ایجـاد بیمـاری نمـود. ولی انسان به یک خانواده نسبتاً متفاوت تعلق دارد که احتمالاً حدود ۷۰ میلیون سال پیش از آنها جدا شده است. به همین دلیل تشابه پرایون انسان با پرایون گاو و گوسفند کم است ولی در این بین میزان تشابه بین پرایون انسانی و گاوی بیشتر از تشابه پرایون انسانی و گوسفندی است. به همین دلیل بیماری جنون گـاوی در مدت کوتاهی از گاو به انسان منتقل شد. فاصله ژنتیکی بین گونه های مختلـف براسـاس میـزان تقـارب توالی اسیدهای آمینه ژن پروتئین پرایون در نگاره ۲-۳ به تصویر کشیده شده است.