نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ۳۱، تابستان ۱۳۹۸
ص‌ص: ۳~۱۰

بررسی چندشکلی و تعیین ژنوتیپ ژن پروتئین پریون (PrP) درگوسفندان سنگسری دامغان

- **رضا جمشیدی** (نویسنده مسئول)
  استادیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
- **مهدی مهرآبادی**
  گروه پرورش طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فنی و حرفه‌ای پاکدشت، تهران، ایران
- **سید محسن حسینی**
  دانش‌آموخته دکتری تغذیه دام، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
- **الهه شهریاری**
  دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت : آذر ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش : دی ۱۳۹۷
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۲۳۱۱۱۳۰
Email: r_jamshidi@semnan.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/aasrj.2019.124497.1171

چکیده

بیماری اسکراپی در گوسفندان، بیماری تحلیل برنده نورون‌های عصبی است که به دلیل تاخوردگی غیرمعمول پروتئین پریون در مغز، که باعث ایجاد شکل مقاوم این پروتئین می‌شود، بوجود می‌آید. فاکتورهای ایمنولوژیکی و ژنتیکی علل عمده ایجاد کننده این اسکراپی ذکر شدند. از جمله این فاکتورهای ژنتیکی که ممکن است در ایجاد و یا پیشرفت بیماری نقش داشته باشند، وجود چندشکلی کدون شماره ۱۷۱ از ژن پروتئین پریون می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی چندشکلی کدون ۱۷۱ ژن PrP در گوسفند سنگسری است. در این تحقیق ابتدا، نمونه‌های خون از ۱۵۰ رأس گوسفند از مرکز اصلاح نژاد دامغان، به‌وسیله ونوجکت‌های آغشته به ماده ضد انعقاد (EDTA) تهیه و DNAی آن‌ها به‌روش نمکی بهینه یافته (salting out) استخراج گردید. بعد از استخراج DNA و انجام آزمایشات کمی و کیفی (اسپکتروفوتومتر و ژل آگاروز ۰/۸ درصد)، قطعه مورد نظر در PCR با استفاده از پرایمر مربوطه، تکثیر یافته و سپس فرآورده‌های PCR توسط آنزیم Sau3AI برای جایگاه ۱۷۱ برش داده شد. الکتروفورز قطعات حاصل از هضم روی ژل آگارز انجام و ژنوتیپ هر فرد تعیین گردید. فراوانی‌های آللی، ژنوتیپی و هاپلوتیپی با شمارش مستقیم به دست آمد. توالی‌های قبل و بعد از مکان برش با استفاده از نرم‌افزارPrimer Premier مشخص گردید. نتایج نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌های R/R، R/Q و Q/Q به‌ترتیب ۸۷، ۸ و ۵ درصد می‌باشند. نتایج آشکار شده برای فراوانی آلل‌های مورد نظر Q وR به‌ترتیب ۱۰ و ۹۰ درصد بود. ژنوتیپ Q/Q بیشترین حساسیت را به بیماری اسکراپی داشته و ژنوتیپ‌های R/R و R/Q مقاوم به بیماری اسکراپی بودند.

واژه‌های کلیدی: گوسفند سنگسری، ژن پروتئین پریون(PrP)، بیماری اسکرپی، PCR ، مقاومت ژنتیکی

Applied Animal Science Research Journal No 31 pp: 3-10

Detection of PRP Gene Polymorphism in Sangsari Sheep

By: R. Jamshidi[1*], M. MEhrabadi[2], Seyed Mohsen Hosseini[3], Elahe Shahryari
1: Assistant Professor. Department of Biochemistery, Faculty of Veterinary, Semnan University, Semnan, Iran.
2: Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, Technical and Vocational University of Pakdasht, Tehran, Iran.
3: Graduated PhD Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4: Graduated MSc Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Scrapie is a neuromuscular neuronal disease that is caused by unusual protein pricking in the brain that causes the protein to become resistant. Immunological and genetic factors have been mentioned as the main causes of this scrapie. Among these genetic factors that may contribute to the development or progression of the disease, is the polymorphism at codon 171 of the protein of the prion gene. In this study, we investigated the polymorphism of Prion protein (PrP) gene (code 171) in the Sangsari sheep breed. In total 150 blood samples were taken from sheep in Damghan genetic modification center, using venojects treated with the anti-clot substance (EDTA). Then their DNAs were extracted by usage salting out procedure Extracted DNAs were treated quantitatively and qualitatively (using a spectrophotometer and gel agarose 0/8% repetitively), then the required amounts for each polymerase chain reaction (PCR) were specified. In the polymerase chain reactions, using the relevant primer, the related part was reproduced and then was cut by using Sau3AI enzymes 171 target site. Individual genotype was identified by using electrophoresis on agarose gel. Results showed that the frequency of R/R, R/Q and Q/Q genotypes was 87, 8 and 5%, respectively. The revealed results for the frequency of the desired alleles were Q and R, respectively, 10 and 90%. Genotypes of Q/Q were the most susceptible and R/R and R/Q genotypes were resistant to scrapie disease.

Key words: Sangsari sheep, PCR, Gene Prion protein (PrP), Scrapie disease, Genetic resistance

مقدمه

شناسایی و حذف حیوانات برمبنای بیماری‌های ژنتیکی بر اساس ژنتیک کلاسیک، که نمی‌توان آن‌ها را روی حیوانات زنده تشخیص داد، نیاز به صرف زمان و هزینه نسبتاً زیادی دارد. استفاده از ژنتیک مولکولی به‌عنوان یک ابزار مناسب، متخصصین اصلاح نژاد را قادر می‌سازد تا حیوانات را برای تشخیص بیماری یا بیماری‌های مختلف در همان اوایل زندگی شناسایی، انتخاب و از گله حذف نمایند (Goldmann et al., 1994). یکی از بیماری‌های عفونی مهم گوسفندان که زمینه ژنتیکی در بروز آن تأثیر فراوانی دارد، بیماری اسکراپی است که عامل این بیماری پریون نامیده می‌شود (Belt et al., 1995). پریون یک ذره عفونی غیر متعارفی به ابعاد کمتر از ۵۰ نانومتر و وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰۰۰ دالتون بوده و فاقد اسید نوکلئیک است (Curtis, 2006). پریون یکی از پروتئین‌هایی است که به‌طور عادی در سلول‌های عصبی بیان می‌شود. این پروتئین توسط ژنی که روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۲۰ قرار دارد کد شده و تولید می‌شود. این پروتئین در حالت طبیعی PrPc (پروتئاز مقاوم پروتئین سلولی) نامیده می‌شود و در تکامل سلول‌های عصبی نقش دارد، به‌همین خاطر به مقادیر زیادی در سلول‌های عصبی یا نورون‌ها یافت می‌شود. جهش در

این پروتئین می‌تواند باعث تغییر آرایش فضایی آن شده به‌طوری که پروتئین جهش یافته می‌تواند تجمع یافته و پلاک‌های پروتئینی را در سلول‌های عصبی ایجاد کند. این پلاک‌ها باعث آنسفالوپاتی های اسفنجی شکل در مغز می‌شوند که نهایتاً منجر به مرگ حیوان می‌شود (Gombojav et al, 2003; Prusiner 1996; Bossers et al, 1997). 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 (Van et al., 2005). از آنجایی‌که تاکنون هیچ گزارشی از ساختار ژنتیکی این جایگاه کروموزومی در گوسفندان سنگسری شناسایی نشده است، لذا تحقیق حاضر در گوسفندان سنگسری برای تعیین ژنوتیپ این ژن انجام شد تا حساسیت و یا مقاومت این گوسفندان در مقابل بیماری اسکراپی مشخص شود، تا در طراحی برنامه‌های انتخاب ژنتیکی برای مقابله با این بیماری از تکثیر آلل‌های حساس جلوگیری به عمل آید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان و در فاصله زمانی خرداد تا مهر ماه ۱۳۹۶ انجام گرفت. بدین منظور از ۱۵۰ رأس گوسفند سنگسری منطقه دامغان از هر دو جنس، نمونه‌های خون کامل از سیاهرگ وداج با استفاده از لوله‌های خلاء دار ۷ میلی‌متری آغشته به ماده ضد انعقاد اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) با رعایت شرایط بهداشتی اخذ شده و به لوله‌های آزمایش منتقل و شماره‌گذاری گردید. سپس نمونه‌های خون کامل بلافاصله در داخل یخ به آزمایشگاه منتقل گردید و تا زمان استخراج DNA در دمای °C ۲۰- نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون به‌روش بهینه شده و تغییر یافته استخراج نمکی انجام گردید (Miller et al., 1988). چندشکلی در موقعیت کدون ۱۷۱ ژن پروتئین پریون گوسفند (Gombojav et al, 2003)، با استفاده از یک جفت آغازگر که توالی آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است، مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- توالی آغازگر مورد استفاده برای بررسی چندشکلی در موقعیت کدون ۱۷۱ ژن پروتئین پریون

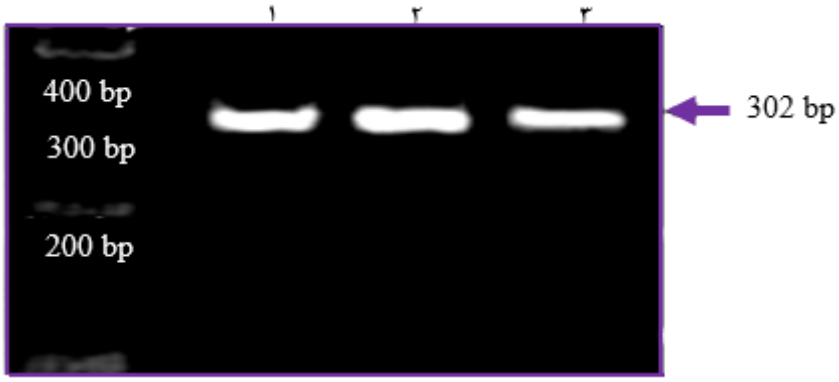
آغازگر	توالی	جهت
Forward Primer	TTGTGGCTACATGCGGGAAG	5'→3'
Reverse Primer	ATAAGCCTGGGATTCTCTCT	5'→3'

در هر نمونه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر رشته مورد نظر در حجم استاندارد ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برای انجام واکنش PCR در این حجم موارد زیر مورد استفاده قرار گرفت:
یک واحد Taq پلیمراز، ۲۰۰ میکرو مول dNTP ، ۲۰۰ میکرو مول $MgCL_2$ ، ۲۰-۱۰ پیکو مول از هر آغازگر و ۱-۰/۸ میکرولیتر DNA با غلظت ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم.
سیکل دمایی استفاده شده برای جفت آغازگر موردنظر به‌صورت واسرشته سازی اوّلیه در دمای °C ۹۵ به‌مدّت ۹ دقیقه و به‌دنبال آن ۵۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای °C ۹۴ به‌مدّت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای °C ۵۵ به‌مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای °C ۷۲ به‌مدّت یک دقیقه انجام گرفت و در نهایت بسط نهایی در دمای °C ۷۲ به‌مدت ۷ دقیقه بهینه شد. ژن‌های مورد نظر با استفاده از یک جفت آغازگر مربوط به کدون ۱۷۱ قطعه‌ای ۳۰۲ جفت بازی، تکثیر شد و سپس تحت هضم آنزیمی با آنزیم برشی Sau3AI قرار گرفت. هضم آنزیمی در حجم ۳۰ میکرولیتر با مصرف ۱۵ واحد آنزیم مذکور تحت شرایط بافری (۲ میکرولیتر بافر 10X PCR) و دمای مناسب (°C ۳۷) صورت پذیرفت. پس از تکثیر و هضم آنزیمی، قطعات حاصله از PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز و سپس با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی (Sambrook et al, 1989) و تحت نور ماوراء بنفش (UV) تکثیر قطعات مورد نظر تأیید گردید. پس از به دست آوردن فراوانی‌های آللی (انواع جابجایی بازهای آلی در هر

کدون)، ژنوتیپی (ترکیب آللی هر نمونه در هر کدون) و هاپلوتیپی (ترکیب نوکلئوتیدی هر نمونه به ازای هر سه جایگاه) جایگاه مورد نظر به روش شمارش مستقیم، آزمون کای اسکوئر یا خی‌دو با استفاده از نرم‌افزار HWE (Ott, 2001) انجام شد. توالی‌های قبل و بعد از مکان برش با استفاده از نرم افزار Primer Premier مشخص گردید.

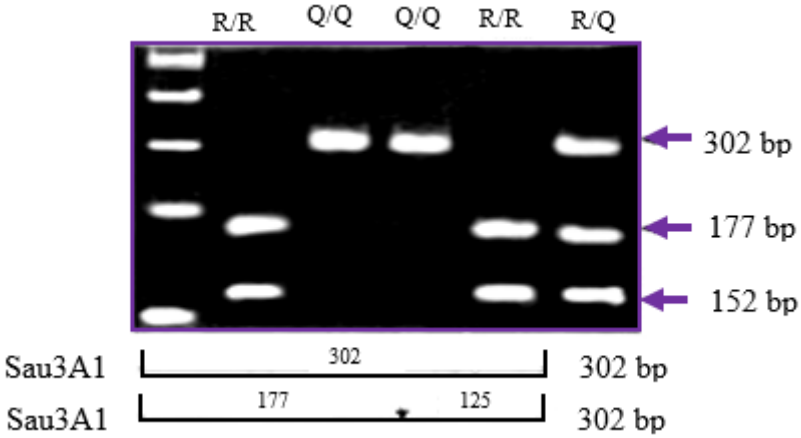
نتایج

واکنش‌های PCR با استفاده از یک جفت آغازگر (پرایمر) اختصاصی کدون ۱۷۱ ژن پروتئین پریون گوسفند در تمام نمونه‌ها صورت پذیرفت. در شکل۱، قطعه۳۰۲ جفت بازی حاصل از افزوده‌سازی DNA با آغازگر مربوطه نشان داده شده است.



شکل ۱- قطعه۳۰۲ جفت بازی حاصل از تکثیر DNA با آغازگر مربوطه در نمونه‌ها قبل از هضم آنزیمی

هضم آنزیمی محصولات PCR با استفاده از آنزیم Sau3AI با موفقیت انجام شد. همان‌طور که انتظار می‌رفت قطعه ۳۰۲ جفت بازی از ژن پروتئین پریون یافت شد (شکل ۲). به‌منظور تأیید تکثیر قطعه‌های مورد نظر، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز و به کمک یک نشانگر وزنی M100 مورد ارزیابی قرار گرفتند. از آنزیم محدود الاثر Sau3I جهت هضم قطعه ۳۰۲ جفت بازی تکثیر شده از جایگاه ۱۷۱ استفاده شد و دو قطعه ۱۲۵ جفت بازی و۱۷۷ جفت بازی تکثیر گردید(لاین ۴ و ۱) . در لاین۲ و ۳، قطعه ۳۰۲ جفت بازی تکثیر شد.



شکل۲ -انواع ژنوتیپ حاصل از هضم آنزیمی در موقعیت‌های کدون ۱۷۱ و نقشه محل برش آنزیم‌ها، اندازه خط‌کش مولکولی یا سایز مارکر(نشان داده شده در ستون سمت چپ) برابر بود با 150bp

جدول۲- فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی کدون ۱۷۱ ژن PrP گوسفندان

ژنوتیپ / آلل	تعداد	فراوانی (درصد)
R/R*	۱۳۰	۸۷
R/Q*	۱۲	۸
Q/Q**	۸	۵
R	۲۷۲	۹۰
Q	۲۸	۱۰
مجموع	۱۵۰	-

* مقاوم به بیماری اسکراپی

**حساس به بیماری اسکراپی

در بین ژنوتیپ‌ها، بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ R/R (۸۷ درصد)، سپس ژنوتیپ R/Q (۸ درصد) و در نهایت ژنوتیپ Q/Q کمترین مقدار (۵ درصد) را به خود اختصاص داد. ژنوتیپ‌های R/R و R/Q نسبت به بیماری اسکراپی مقاوم بودندکه به‌ترتیب ۱۳۰ و ۸ رأس از گوسفندان سنگسری مورد مطالعه را شامل شدند. در مقابل ژنوتیپ Q/Q نسبت به بیماری اسکراپی حساس بودند که ۵ رأس از گوسفندان مورد مطالعه را شامل می‌شدند (جدول ۲). با استفاده از آزمون مربع کای (X^2_T) هر دو جایگاه مورد مطالعه انحراف از تعادل (P<۰/۰۰۵) را نشان‌دادند.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه فراوانی ژنوتیپی چندشکلی کدون ۱۷۱ ژن پریون در گوسفندان سنگسری مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به عدم گزارش فراوانی ژنوتیپی این بیماری در گوسفندان سنگسری، این پژوهش اولین تحقیق در شناسایی فراوانی ژنوتیپی این بیماری در این گوسفندان است. از آنجایی که رابطه ژنوتیپ جایگاه ژن PrP با حساسیت به این بیماری اثبات شده است (Van et al., 2005)، این گونه مطالعات می‌توانند در طراحی برنامه‌های انتخاب ژنتیکی برای مقابله با این بیماری مورد استفاده قرار گرفته تا از تکثیر آلل‌های حساس جلوگیری به عمل آید.

در این بررسی سه ژنوتیپ ژن پریون پروتئین متفاوت و دو فرم آللیک از ژن پریون پروتئین پیدا شد. سه ژنوتیپ ژن پریون پروتئین (R/R، R/Q، Q/Q) و فرم آللیک (Q، R) در مطالعه حاضر با نتایج حاصل از بررسی‌های Laplanch (۱۹۹۳)، Zhang (۲۰۰۴) و Curtis (۲۰۰۶) مطابقت داشت.

همچنین این نتایج همچنین با مطالعات صورت گرفته در کشور ژاپن روی گوسفندان سافولک و کاریدال هم‌سو بود (Ikeda, 1995). نتایج مشخص شده برای فراوانی آلل‌های مورد نظر Q و R به‌ترتیب ۱۰ درصد و۹۰ درصد بود. ژنوتیپ Q/Q بیشترین میزان حساسیت به بیماری اسکراپی را دارند، در حالی‌که ژنوتیپ‌های R/R و R/Q مقاوم به بیماری اسکراپی هستند. چندشکلی مشاهده شده در این مطالعه در جایگاه ۱۷۱ (R/R، R/Q، Q/Q)، با نتایج گزارش شده توسط Ikeda (۱۹۹۵)

مطابقت داشت. همچنین آلل‌های Q و R مشاهده شده در گوسفندان سنگسری با نتایج گزارش شده در مطالعه Curtis (۲۰۰۶) هم‌راستا بود.

Bossers و همکاران (۱۹۹۷) طی مطالعه‌ای روی ژن PrP گوسفندی در کدون‌های ۱۱۲- ۱۲۷-۱۳۶-۱۳۷-۱۳۸-۱۴۱-۱۴۳-۱۵۱-۱۵۴-۱۷۱-۱۷۶ و ۲۱۱ چندشکلی‌هایی را در ارتباط با بیماری اسکراپی گزارش نمودند، به‌طوری‌که در بین جایگاه‌های ذکر شده، جایگاه‌های ۱۳۶-۱۵۴ و ۱۷۱ بیشترین ارتباط را با بیماری اسکراپی داشتند. در مطالعه‌ای Thorgeirsdottir و همکاران (۱۹۹۹) نیز ارتباط تنگاتنگی بین بیماری اسکراپی و چندشکلی ژن پروتئین پریون در گوسفندان ایرلندی را بررسی نموده‌اند. در مطالعه آن‌ها مشخص گردید کدون‌های ۱۳۶-۱۵۴ و ۱۷۱ در حساسیت گوسفندان به بیماری اسکراپی نقش مهمی دارند. در این مطالعه از آنزیم BspHI برای برش کدون‌های ۱۵۴ و ۱۳۶ و از روش PCR-DGGE برای شناسایی چندشکلی در کدون ۱۷۱ استفاده شد. تنوع آللیک در لوکوس اسید آمینه‌ای PrP (VQR) از لحاظ آماری ارتباط زیادی با بیماری اسکراپی داشت در صورتی‌که تنوع آللیک (AHQ) در گوسفندان آلوده دیده نشد. در مطالعه‌ای Kutzer و همکاران (۲۰۰۲) به بررسی تنوع آللیک ژن پروتئین پریون گوسفندی برای کدون‌های۱۳۶-۱۵۴ و ۱۷۱ در نژادهای گوسفند سافولک، نولانا و تکسل پرداخته شد. تنوع آللیک اسید آمینه‌ای مشاهده شده شامل VQR، ARH، AHQ، ARQ و ARR و دو فرم آللیک هاپلوتیپ جدید VRR و AHR در این نژادها دیده شدکه احتمالاً ارتباط این تنوع آللیک با وقوع بیماری اسکراپی را نشان می‌دهد.

در مطالعه‌ای Gombojav و همکاران (۲۰۰۳) به تعیین چندشکلی اسید آمینه‌ای پروتئین پریون گوسفندی (PrP) در ۲۷۱ گوسفند مانگولیان (Mongolian) پرداختند، به گونه‌ای‌که کدون ۱۷۱ (۳۰۲ جفت بازی) پس از تکثیر، برای هضم تحت تیمار آنزیم Sau3AI قرار گرفت. این محققین نشان دادند که ژنوتیپ‌هایی که نسبت به بیماری اسکراپی حساس بودند دارای دوقطعه ۱۲۵ و۱۷۷ جفت بازی و ژنوتیپ‌هایی که نسبت به بیماری اسکراپی مقاوم بودند یک قطعه ۳۰۲ تولید کردند. Ewa wisnieska و همکاران (۲۰۰۶) طی مطالعه‌ای روی ۹۸ رأس گوسفند نژاد مرینوس، حساسیت و مقاومت ژنتیکی در خصوص چندشکلی جایگاه‌های ۱۳۶-۱۵۴ و ۱۷۱ اثر ژن پریون پروتئین را بررسی نمودند. این محققین بعد از آنالیز داده‌ها، دو شکلی‌هایی در کدون‌های ۱۳۶ (A و V) و ۱۷۱ (R و Q) مشاهده نمودند، به‌طوری‌که ۳۵/۷ درصد از ژنوتیپ‌ها ARQ/ARQ، ۵۴/۱ درصد ژنوتیپ ARR/ARQ و ۷/۱ درصد ژنوتیپ ARR/ARR را داشتند. ژنوتیپ‌های VRQ و ARQ بیشترین حساسیت را به بیماری اسکراپی داشتند و ژنوتیپ‌های ARR/ARR کمترین حساسیت به اسکراپی را نشان دادند که با نتایج حاصل از این تحقیق هم‌راستا نبود. شاید بتوان دلیل این امر را در حساس بودن گوسفندان مرینوس نسبت به دیگر نژادها در ارتباط با بیماری اسکراپی، به‌علت ایجاد جهش در جایگاه مورد نظر دانست. جامعه مورد مطالعه در این آزمایش در حالت تعادل نمی‌باشد. این امرناشی از آن است که جهش ژنتیکی در دو جایگاه مذکور رخ داده و خود آن از عوامل بر هم‌زننده تعادل می‌باشد. نحوه نمونه‌گیری، عدم تعادل جهش- رانش و عدم تعادل پیوستگی (هر دو جایگاه در داخل یک ژن بوده و به‌هم پیوسته‌اند) از دیگر عوامل احتمالی چنین انحرافی می‌باشند.

به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که گوسفندان سنگسری سمنان در جایگاه ژنی مورد مطالعه دارای تنوع بوده و بیش از ۹۵ درصد این گوسفندان دارای ژن مقاوم به بیماری اسکراپی هستند، در نتیجه کمتر دچار این بیماری شده و می‌توانند مقاومت بالایی در

طی دوره زندگی نسبت به این بیماری نشان‌داده و تلفات کمی را ایجاد نمایند. اگرچه پیشنهاد می‌شود آزمایشی در قالب یک طرح جامع نسبت به شناسایی وضعیت نژادهای گوسفند ایران از نظر میزان حساسیت و مقاومت ژنتیکی نسبت به بیماری اسکراپی صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان برخود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه سمنان که مقدمات انجام این پژوهش را فراهم نمودند تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

Belt, P.B.G.M., Muileman, I.H., Schreuder, B.E.C., Bos-DE Rutter, J., Gielkens, A.L.J. and Smits, M.A. (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. Journal of General Virology, 76, 509-517.

Bossers, A., Belt, P.B.G.M., Raymond, G.J., Caughey, B., de-Vries, R.and Smits, M.A. (1997). Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms. Proceeding of the National Academy of Science, 94, 4931–4936.

Curtis, R. (2006). A Preliminary report on the frequency of scrapie susceptibility alleles in Hampshire sheep, PP: 1-9

Ewa, W., Gesine, L., Slawomir, M. and Georg, E. (2006). Prion protein (PrP) gene polymorphisms and breeding for resietance to scrapie in Polish Merino sheep. Arch. Tierz., Dummerstorf, 49, PP: 365-371.

Goldmann, W., Hunter, N., Smith, G., Foster, J. and Hope, J. (1994). PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. Journal of General Virology, 75, 989-995.

Gombojav, A., Ishiguro, N., Horiuchi, M., Serjmyadag, D., Byambaa, B. and Shinagawa, M. (2003). Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. Journal of Veterinary Medical Science, 65, 75–81.

Horgeirsdottir, S., Sigurdarson, S., Thorisson, H.M., Georgsson, G. and Palsdottir A. (1999). PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. Journal General Virology, 80, 2527–2534.

Ikeda, T.M., Horiuchi, N., Ishiguro, Y., Muramatsu, G. D., Kai-Uwe, and Shinagawa, M. (1995). Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. Journal General Virology, 76, 2577-2581.

Kutzer, T., Pfeiffer, I. and Brenig B. (2002). Identification of new allelic variants in the ovine prion protein (PrP) gene. Journal of Animal Breed Genetic, 119, 201–208.

Laplanche, J.L., Chtelain,J. and Westaway,d. (1993). PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. Genomics 15, 30–37.

Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16, 12-15.

Ott, J. (2001). Program Het Version 1.8, Utility programs for analysis of genetic linkage. Rockefeller University, New York, NY, USA.

Prusiner, S.B. (1996). Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. Trends in Biochemical Sciences, 21, 482–487.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Van, M., Poucke, J., Vandesompele, M., Van, A., Zeveren, S., Luc, J. and Peelman, F. (2005). A dual fluorescent multiprobe assay for prion protein genotyping in sheep. BMC Infectious Diseases, 11, 5-13.

Zhang, L., Li, N., Fan, B., Fang, M. and Xu, W. (2004). PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds. Animal Genetics, 35, 457-461.