

שוונות בדנ"א וטיפוח בקר לחלב

אהוד ליפקין – קיבוץ גניגר, יחזקאל קשי – האוניברסיטה העברית בירושלים,
ד"ר ג'אק בקמן – מכון וולקני, אלונה נוה – האוניברסיטה העברית בירושלים.

העבודות המתוארות במאמר זה נעשו במעבדותיהם ובהדרכתם של פרופ' אדם פרידמן, פרופ' משה סולר וד"ר ג'אק בקמן, באוניברסיטה העברית בירושלים.

תקציר

קצב ההתקדמות הגנטית בטיפוח בקר לחלב מוגבל בגלל היותן של התכונות החשובות למגדל כמותיות, תלויות ברובן בגיל ובמין, ועקב טעויות בזיהוי נכון של ההורים. בעזרת טכניקות של הנדסה גנטית ניתן לנצל שונות ברצפי הבסיסים לאורך הדנ"א לצורך זיהוי סמנים גנטיים אשר יאפשרו לזהות גנים "כמותיים" בודדים. בעזרת סמנים אלה ניתן יהיה לערוך מבחני הורים והערכה מוקדמת של עגלים נבחרים.

במאמר מתוארת שיטת הזיהוי של שונות באורך מקטעי רסטרקציה (RFLP), אפשרויות ניצולה לטיפוח בקר לחלב, ותוצאות ראשוניות מעבודות שבוצעו בנושא זה בארץ.

"זו השיטה, מה הבעיה?"

פרי רביה בישראל נבחרים לפי הוריהם ונבחרים לפי בנותיהם (1,3). כל פרי הינו בן לפר נבחר ולאם עתודה. בגיל שנה נלקחת ממנו זירמה ומבוצעות הזרעות בכמות שתאפשר מבחן סטטיסטי. חמש שנים מאוחר יותר מתקבלות התוצאות של התחלובות הראשוניות של בנותיו, ואז מוכרע גורלו לשבט, כלומר לשחיטה, או לחסד, להיות פר נבחן. פרים נבחרים ממשיכים להיבחן מספר פעמים בשנה. אפשר להצביע על כמה מגבלות בשיטה הנוכחית.

א. הזמן. חמש שנים עוברות עד לקבלת התוצאות הראשונות. למשך הזמן הזה יש מספר השלכות:

□ זמן דור. קצב ההתקדמות הגנטית תלוי בקצב בו מתחלפים הדורות, וקצב זה מוגבל בעיקר על ידי אורך מבחן הפר (אם ניתן להפיק מפר זירמה בגיל שנה, והריון נמשך תשעה חודשים, בחמש שנים אפשר להגיע כמעט לנינים!).

□ בזבוז. במשך חמש שנים עומדים פרים משובחים, "במלוא אונם", ללא שימוש ברפתות. במקביל, פרים גרוועים מעמידים צאצאים ומוחזקים במשך אותו זמן, על מנת להישלח בסופו של דבר לשחיטה. בארה"ב נאמדת עלות הצבת פר נבחן לעבודה ב-100,000-150,000 דולר (6).

ב. מהימנות הנתונים. לתוצאות המבחן הראשון מהימנות מוגבלת בהתבססו על יחסית מעט פרות ופרות צעירות. מוכרים מקרים של השתנות ערך הפר עם התרבות בנותיו או עם התבגרותן (סנטור, שץ, לבלד...).

ג. מספר העגלים הנכנסים למבחן. לא כל בני הפרים הנבחרים והעתודות נלקחים למבחן, ממגבלות מקום ותקציב. לא פעם יש מידה לא מעטה של אקראיות בבחירת העגלים. לדוגמא, לעגל החמישים של פר נבחן יש פחות סיכוי להיבחן מאשר לעגל הראשון שנולד מאותו פר באותה שנה.

ד. זיהוי הורים. לשגיאות בזיהוי הורים סבירות רבה יותר ברפתות הקיבוציות. השגיאה יכולה

העבודות המתוארות במאמר זה נעשו במעבדותיהם ובהדרכתם של פרופ' אדם פרידמן, פרופ' משה סולר וד"ר ג'אק בקמן, באוניברסיטה העברית בירושלים.

התורשתי. לו היתה אפשרות "להסתכל" על חומר תורשתי זה היה עומד לרשותנו כלי אמין ביותר לפתרון הבעיות שנמנו לעיל. פתרון אפשרי, שיתואר להלן, הינה שיטה לזיהוי שונות בדנ"א וניצולה למציאת סמן גנטי, שיאפשר עריכת אומדנים מוקדמים לעגלים צעירים ובעקבות זאת שימוש מוקדם, בהקף רחב, במצטיינים שבהם. בעזרת סמן כזה תתאפשר גם עריכת מבחני הורות.

לצורך אומדנים מוקדמים ומבחני ההורות יש צורך בסמן שאינו תלוי בגיל, במין וברקמה, סמן המופיע בצורות שונות בפרטים שונים באוכלוסייה. סמן כזה צריך להיות זול ונח לעבודה באוכלוסיות גדולות.

דנ"א - החומר התורשתי

החומר התורשתי של (כמעט) כל עולם החי הינו הדנ"א (DNA). הדנ"א הינו פולימר - פרודת ענק המורכבת ממספר רב מאד של פרודות קטנות (איור 1). קיימים ארבעה סוגי פרודות המרכיבות את הדנ"א והנקראות "בסיסים": אדינוזין (A), ציטוזין (C), גואנוזין (G) ותימין (T). בסיסים אלה מחוברים זה לזה

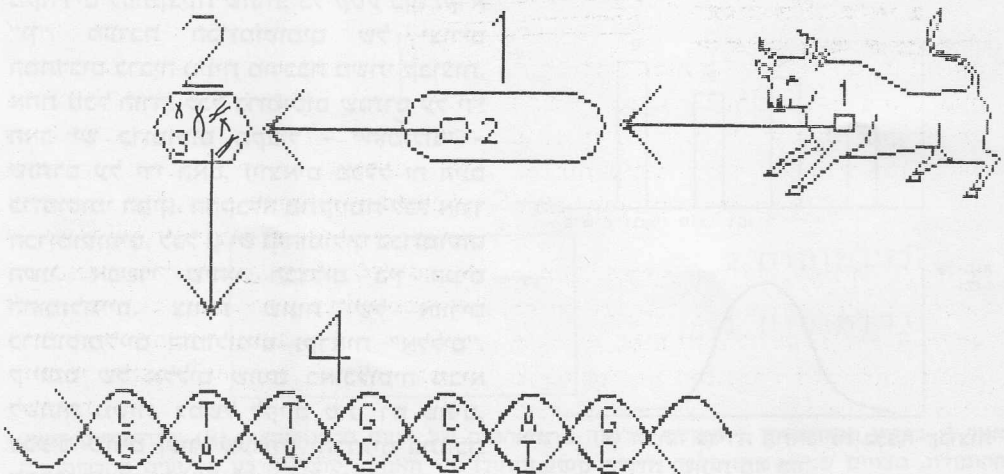
להתרחש החל מהכנת הזירמה במעבדת הפריה, וכלה ברישום הוולדות במשק. שגיאה בזיהוי ההורים יכולה:

- להביא את העגל הלא נכון למבחן.
- לפגום באיכות מבחן הפר על ידי הכללת פרות שאינן בנותיו.
- להגביר את מקדם השארות (הקרבה) בעדר על ידי הזרעת פרות בפרים קרובים. מקדם זה גבוה ממילא בגלל ההתבססות על מעט אבות לכל העדר (מניעת שארות גבוהה מדי היא הסיבה העיקרית לשימוש בזירמה מיובאת).

ה. גנים כמותיים. רובן של התכונות החשובות למטפח הינן "תכונות כמותיות" תכונות כאלה מזוהות בעזרת כלים סטטיסטיים, וקיימת בעיה במיפוי גנים המשפיעים עליהן. מיפוי כזה יכול לשפר את יכולת הברירה של העדר (נושא זה נידון בהרחבה בהמשך המאמר).

התשובה

הקוד לתכונות המעניינות אותנו, כמו גם הקשר בין הורים לצאצאים טמון בחומר



איור 1: בכ"א מתאי הגוף (1), יש גרעין (2), בו מצוי הדנ"א בחלקיקים הנקראים כרומוסומים (3). הדנ"א מורכב משתי שרשראות המלופפות זו סביב זו ויוצרות את הסליל הכפול (4). כל שרשרת בנויה משורת בסיסים (A, C, G, T) ומשלימה לשרשרת השנייה - מול כל A מופיע T ומול כל G מופיע C, ולהפך.

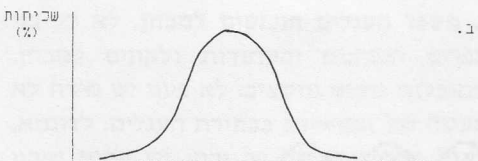
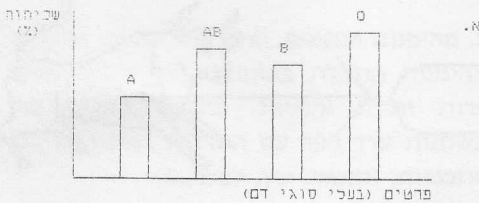
למעט כמה יוצאים מהכלל, תכולת הדנ"א מלאה ושווה בכל רקמות הגוף.

תכונות בדידות והכמותיות

את התכונות התורשתיות ניתן לחלק בצורה מאד כללית לתכונות בדידות ולתכונות כמותיות (איור 2).

תכונות בדידות הינן תכונות הנקבעות ע"י גנים בודדים. מבחינה חיצינית (פנוטיפית) הן מתאפיינות בהבדלים ברורים בין האללים השונים. האוכלוסיה תהיה מורכבת מכמה טיפוסים הנבדלים זה מזה בצורה חדה. סוגי הדם שהוזכרו למעלה הינם דוגמא יפה לתכונה בדידה. קל לערוך בירור לתכונות כאלה, תודות להבדלים הברורים בין הפרטים השונים. למעשה "רואים" את ההרכב האללי במראה החיצוני (אם גם "מראה" זה נראה רק בבדיקה מעבדתית). למשל, לו היינו מעוניינים בפרות עם סוג דם מסויים, ניתן היה להגיע לעדר הרצוי בתוך מספר קטן של דורות, על ידי בדיקת כל אחת מהפרות.

לעומת זאת, **תכונות כמותיות** מושפעות ממספר רב של גנים, כשלכל גן השפעה מוגבלת על התכונה. תכונות אלה מושפעות גם מתנאי



איור 2: (א) תכונה בדידה מתאפיינת בכמה קבוצות טיפוסים ברורות ושונות מזו מזו.

(ב) תכונה כמותית מתאפיינת ב"עקומת פעמון": מעט פרטים חורגים לשני הקצוות, ורוב האוכלוסיה מפוזר סביב לממוצע.

בשרשרת. שתי שרשראות נקשרות זו לזו ויוצרות את "הסליל הכפול" שהוא המבנה הנפוץ ביותר של הדנ"א. הקשר בין שתי השרשראות נעשה על ידי הבסיסים: A משרשרת אחת נקשר ל-T מהשרשרת השניה, ו-G נקשר ל-C. כדי ששתי שרשראות יוכלו להיקשר זו לזו, הן חייבות להיות "משלימות" – מול כל A חייב להופיע T, מול כל G חייב להופיע C, ולהפך. לקשר בין השרשראות עוצמה רבה: ניתן אמנם להפריד ביניהן (על ידי חימום, למשל), אבל אם ניתן להן להיפגש שוב, הן ישובו וייצמדו ספציפית זו לזו. בתערובת של חוטים בודדים שונים "תמצא" כל שרשרת את השרשרת המשלימה לה ותיצמד רק אליה. תהליך זה נקרא "הכלאה" (hybridization) וחשיבותו מכרעת לבדיקות שיתוארו להלן.

בסדר הבסיסים בשרשרת מוצפן המידע התורשתי לסוגיו השונים – מבנה מרכיבי התא, ויסות ייצורם, פעילותם וכד'. כדי לשמר מידע זה, על סדר הבסיסים להיות ספציפי ונתון לשינויים מעטים ככל האפשר.

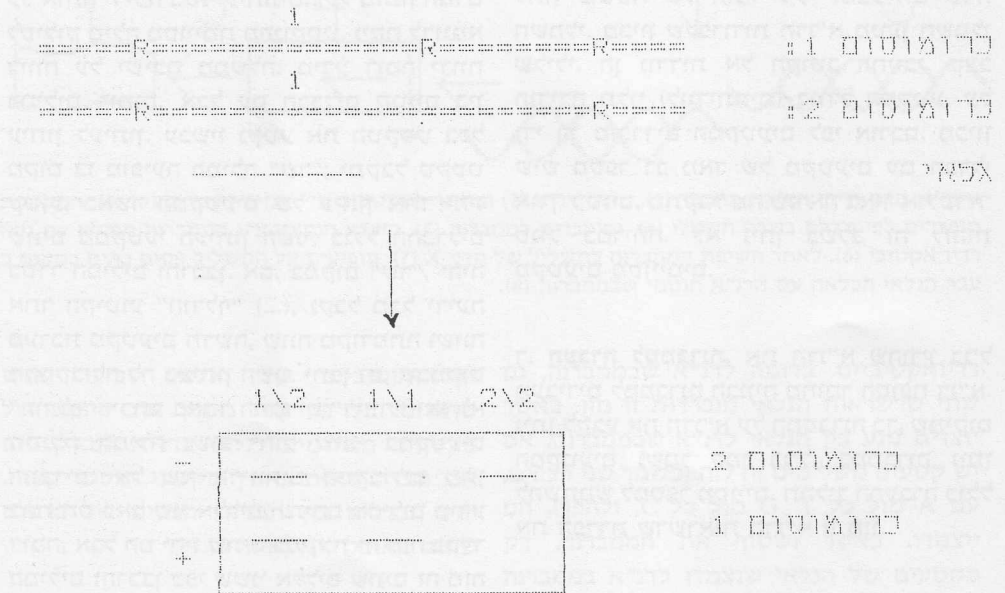
בתוך הגרעין של התא החי מצוי הדנ"א ברובו המכריע בתוך חלקיקים הנקראים "כרומוסומים". קטעים שונים בכרומוסום מקודדים לפונקציות שונות; כל קטע כזה נקרא "גן". מערכת הכרומוסומים של יצורים המתרבים ברביה מינית מורכבת משתי קבוצות, אחת מכל הורה. לכל כרומוסום שנתרם על ידי האב יש כרומוסום מקביל – "הומולוג" – שנתרם על ידי האם, (יוצאים מכלל זה הינם כרומוסומי המין). ההקבלה מתקיימת לכל אורך הכרומוסומים, לכל גן יש גן הומולוגי בכרומוסום השני. אפשרי שיהיו הבדלים בין הגנים ההומולוגיים. צורות שונות של אזורים כרומוסומליים הומולוגיים נקראות "אללים". קיומם של אללים שונים באוכלוסיה מביא לשונות גנטית, למשל לקיום סוגי דם שונים, צבעים שונים (עור, שערות) והבדלים בתנובת החלב. כאשר שני האללים של גן מסויים בתא זהים יהיה בעל החיים "הומוזיגוט" לאותו הגן, כאשר הם שונים זה מזה, מדובר ב"הטרוזיגוט".

סטטיסטי, כגון סיכומי תחלובות. התוצאה לבחירה כזאת הינה ברירה גסה יחסית; בוחרים הרכב אללי ב"עיסקת חבילה" - רוב הגנים יהיו טובים מן הסתם, אבל תמיד יהיו כמה "טרמפיסטים" פחות טובים שיכוסו על ידי השאר. עקב כך תהיה ההתקדמות הטיפוחית הדרגתית ואיטית יחסית. כדי לנקות את המערכת לחלוטין מאללים פחות מוצלחים ולזרו את קצב ההתקדמות, יש צורך בסימון האללים השונים של הגנים הכמותיים.

רפ"פ - "טביעת האצבעות של הדנ"א"

אנוימים הינם חלבונים המאפשרים תגובות כימיות בתא. קיימים אנוימים, הנקראים "אנוימי רסטריקציה", החותכים את הדנ"א החותכים את הדנ"א בנקודות ספציפיות. אנוימים אלה מסוגלים לזהות רצף מיוחד של בסיסים בתוך פרודת הדנ"א ("אתר ההכרה" של

הסביבה הרבה יותר מאשר התכונות הבדידות. דוגמא לכך הינה תנובת החלב. ההבדלים בין הפרטים השונים באוכלוסיה הינם הדרגתיים. במקום כמה קבוצות מבודדות של סוגי טיפוסים (פנוטיפים), מתקבלת אוכלוסיה עם מספר רב של טיפוסים השונים רק במעט זה מזה. אוכלוסיה כזאת ניתן לתאר בעזרת עקומה דמוית פעמון (עקומת גאוס, איור 2). כאן קיים מצב המוכר לכל רפתן - מעט פרות גרועות במיוחד, מעט מצטיינות במיוחד, והרוב מפוזרות סביב לממוצע. המעבר מהגרועות למצטיינות הינו הדרגתי. מכיון שלכל גן יש רק השפעה מוגבלת על הפנוטיפ, ומכיון שהשפעה זו מוסתרת על ידי השפעת הסביבה והגנים האחרים המשפיעים על אותה תכונה, לא ניתן לזהות על פי הפנוטיפ את הגנוטיפ, כלומר, את הרכב האללים של כל פרט. את הבחירה בעדר מבצעים לפי הביצוע הכולל, בעזרת ניתוח



איור 3: בקטע מכרומוסום 1 מצויים שלושה אתרי הכרה של אנוים הרסטרקציה (R) ובכרומוסום השני, ההומולוג, מצויים שני אתרים בלבד. לאחר עיכול (חתוך) ע"י האנוים, יוצרו ארבע מקטעים מהכרומוסום הראשון ושלושה מהשני. מספר וגודל המקטעים תלוי ברצף הבסיסים בדנ"א. אם מקטע 1 מזוהה ע"י הגלאי, אז הפס שמתקבל מכרומוסום 1 יהיה רחוק יותר מראשית התנועה מאשר הפס של כרומוסום 2 (פרטים בטקסט). אצל פר הנושא שני כרומוסומים הומולוגיים זהים (הומוזיגוט לאחד משני הכרומוסומים, 1/1 או 2/2) יופיע פס יחיד; אצל זה הנושא שני כרומוסומים שונים (הטרוזיגוט, 1/2) יופיעו שני הפסים.

"מחפשים את המטמון..."

השלבים העיקריים בשיטת הזיהוי של תבניות המקטעים הינם (איור 4):

א. **הפקת דנ"א.** כפי שנתבאר, כמעט בכל רקמות הגוף יש דנ"א בכמות מלאה וזהה, ולכן כל אחת מהן יכולה לשמש מקור להפקתו. הרקמות הנוחות ביותר לדגימה בבקר הינן הדם וזירמה קפואה. משלושים מיליליטר דם ניתן להפיק כמות דנ"א שתספיק לבדיקות רבות. את הדנ"א ניתן לשמור בקירור לזמן רב.

ב. **עיכול רטריקציה.** דוגמא מהדנ"א עוברת עיכול (חיתוך) על ידי אנזים רטריקציה, בתנאים המבטיחים שבכל אתר הכרה יתבצע חיתוך.

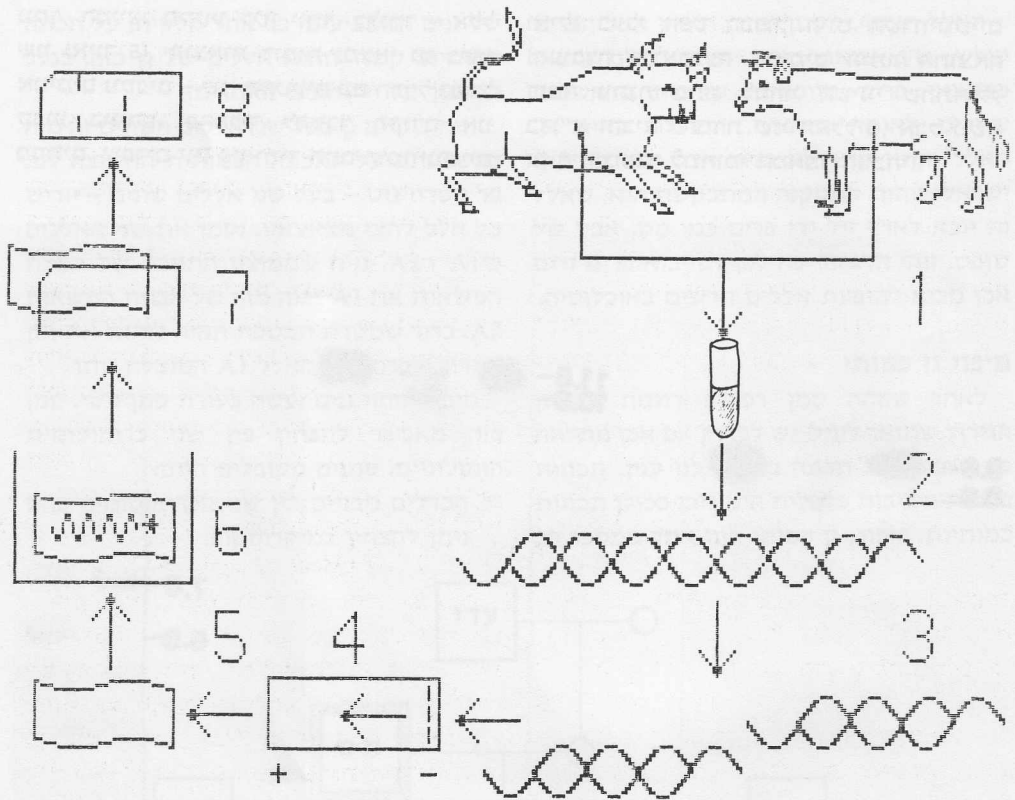
ג. **אלקטרופורזה.** את הדנ"א המעוכל מכניסים לתוך משטח של חומר ג'לי ומפעילים שדה חשמלי. מכיון שלפרודות הדנ"א מטען חשמלי שלילי, הן נודדות אל הקוטב החיובי. קצב הנדידה תלוי (לוגריתמית) בגודל המקטע. על ידי כך מופרדים המקטעים לפי אורכם. מכיון שיש מספר רב מאד של מקטעים עם הבדלי אורך קטנים, מתקבל מה שנראה באור אולטרא-סגול כמריחה. לא ניתן בשלב זה לזהות מקטעים מסויימים.

ד. **העברה לממברנה.** את הדנ"א שהורץ בג'ל מעבירים לממברנה הבנויה מחומר הסופח דנ"א. ניתן לקבע את הדנ"א על הממברנה כך, שמיקום המקטעים נשמר כמו בג'ל. בממברנה ניתן להשתמש למספר ניסויים. תהליך ההעברה כולל את הפרדת שרשראות הדנ"א זו מזו.

ה. **הכלאה עם גלאי.** כאמור, נמצאים על הממברנה מקטעי דנ"א רבים. כדי להבחין במקטע ספציפי יש צורך ב"פנס" שיגלה את קטע הגנום המעניין אותנו. "גלאי" הינו מקטע דנ"א שבודד קודם לכן. בתגובה מיוחדת מוחלפים חלק מהבסיסים שלו בבסיסים

האנזים), ולחנות פרודה זו באתר ההכרה או בסמוך לו. לדוגמא, אנזים בשם BamHI מזהה את הרצף GGATCC וחותר בין שני ה-G. מכיון שהחיתוך הינו ספציפי, אז מכל פרודת דנ"א תתקבל תבנית מקטעים ספציפית. תבנית זו תהיה תלויה באנזים החותר ובהנפעת אתרי ההכרה, כלומר ברצף הבסיסים. לשני אללים שונים יתכן ויהיו תבניות מקטעים שונות. התבניות יכולות להיות שונות, אם חל שינוי בסדר הבסיסים וכתוצאה מכך הופיע אתר הכרה חדש או נעלם אתר הכרה ישן (איור 3), יתכנו גם שינויים מסיביים יותר בדנ"א שיכללו הופעה או היעלמות קטעים שלמים של הפרודה. התוצאה משינויים כאלה תהיה "שונות באורך מקטעי רטריקציה", או בראשי תיבות של השם באנגלית רפל"פ (RFLP - Restriction fragment length polymorphism)

ניתן להדגים את עקרון הרפל"פ, אם נחשוב על אותה ידיעה בשני עיתונים, ועל מנגנון הגורם לסילוק מילה מסויימת מהטקסט. ניקח לדוגמא דיווח על ישיבת ממשלה: מידע דומה ידווח במילים דומות, אבל עם הבדלים קטנים בין עיתון לעיתון. עכשיו נקטע את הטקסט בכל מקום בו מופיעה המילה "שר"; יתקבל טקסט קטוע, כאשר המקטעים של עיתון אחד יהיו שונים ממקטעי העיתון השני, בגלל ההבדלים בסדר המילים והרכבן. אם, במקום "שר", יהיה אתר הקיטוע "הודלף" (...), נקבל מכל ידיעה מערכת מקטעים חדשה, שונה מקודמתה ושונה מהמקבילה לה בעיתון השני. יתכן גם, שבמקום "הודלף" ייכתב באחד המקרים "דיווח" ואז לא תסולק המילה ושוב יחול שינוי במקטעים הנוצרים. אל שני הדיווחים המקבילים ניתן להתייחס כאל שני אללים. שניהם מכילים מידע דומה, אבל הם יהיו שונים במקצת זה מזה בסדר המילים והרכבן כפי ששני אללים שונים זה מזה בסדר הבסיסים והרכבם. מנגנון סילוק המילים מקביל לאנזימי הרטריקציה: כל אנזים מכיר ומסלק מלה אחרת, או - במציאות - חותר את הדנ"א ברצף בסיסים ספציפי. התוצאה הינה מקטעים יחודיים לרצף הבסיסים/מילים ולאנזים החותר.



איור 4: מדם ורידי הנלקח מהבקר (1), מופק דנ"א (2) הנחתך למקטעים ע"י אנזים רסטרקיציה (3). המקטעים מופרדים לפי גודלם בשדה חשמלי (4), ומועברים לממברנה (5). הדנ"א הנמצא ע"ג הממברנה מוכלא עם גלאי רדיואקטיבי (6). לאחר חשיפת הממברנה לתשליל של קרני X (7). מופיעים על התשליל פסים כהים במקום בו עבר הגלאי הכלאה עם הדנ"א הגנומי שבממברנה (8).

הרדיואקטיביים של הגלאי יופיעו פסים שחורים. כל פס כזה מסמן את קיומם של מקטעים משלימים לגלאי בדנ"א הנבדק. אם אכן נוצרה שונות באורך מקטעי הרסטרקיציה, יהיו הבדלים בין תבניות הפסים של פרטים שונים באוכלוסיה (איור 3).

ייבוא?

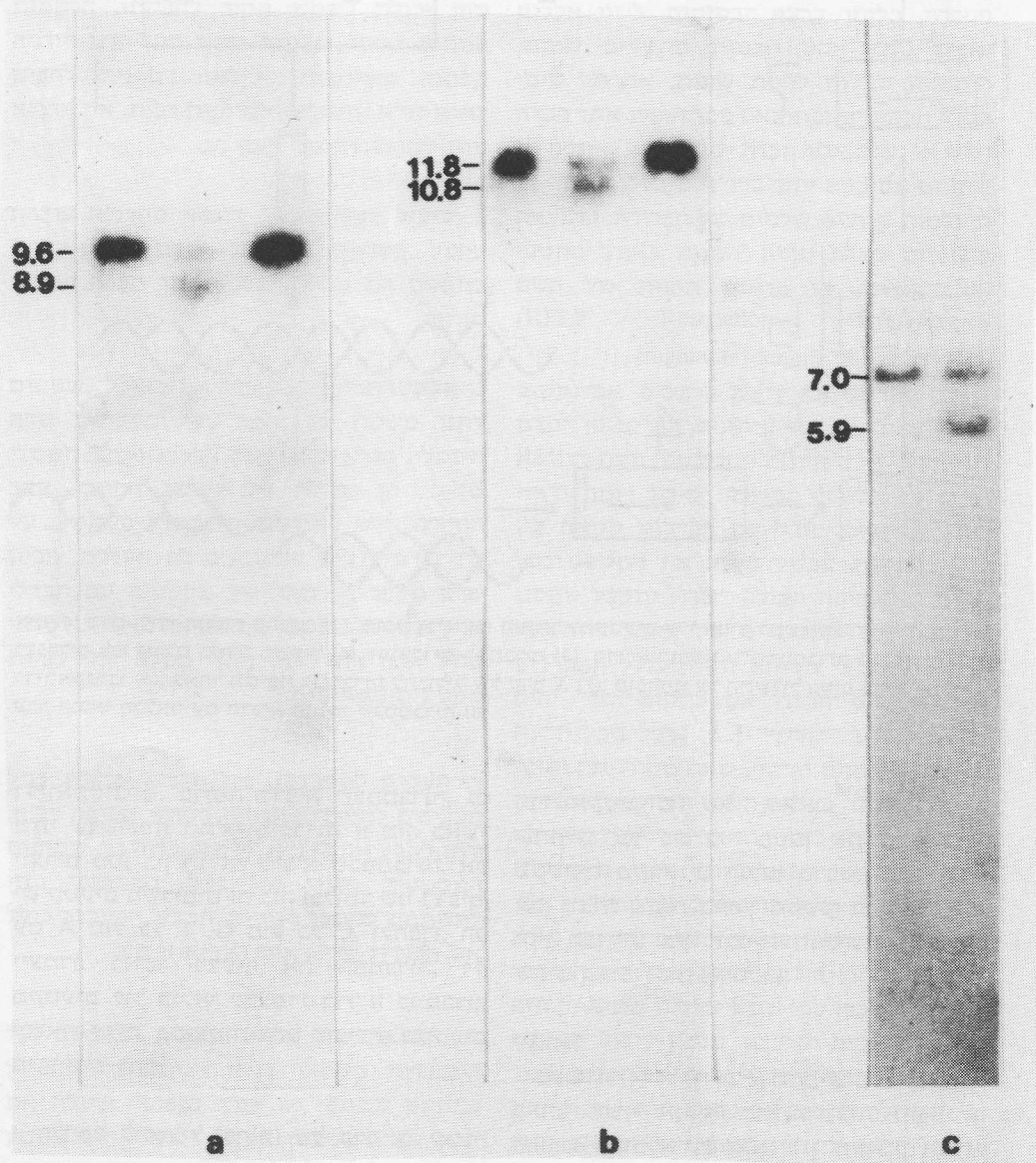
בעבודה (4) נלקח דנ"א מחמישים פרים, עוכל באחד משני אנזימי הרסטרקיציה BglIII או BamHI והוכלא עם גלאי לגן להורמון הגידול (bovine Growth Hormone, bGH). אצל כולם הופיע פס משותף. אצל חמישה מהם הופיע פס

רדיואקטיביים. בדומה לדנ"א שבממברנה, גם שתי שרשראות הגלאי מופרדות זו מזו. כאשר יוצרים מגע בין הגלאי לדנ"א שבממברנה, אם יש קטעים משלימים זה לזה (כלומר שני רצפים, עם A מול כל T, G מול כל C, ולהפך), הם ייצמדו. כאשר נשטוף את הממברנה, רק מקטעים של הגלאי שניצמדו לדנ"א בממברנה יישארו עליה, במקומות בהם מופיעים מקטעים משלימים להם.

1. **חשיפה לתשליל (פילם) של קרני X.** קרינה רדיואקטיבית משחירה את התשליל שהונח על הממברנה. בכל מקום בו יימצאו המקטעים

וואילו בעלי הפס הכפול הינם הטרוזיגוטיים (העובדה שלארבעה אנוזימים היתה התוצאה דומה נותנת פתח לזיהוי השינוי שהתחולל בדנ"א והביא ליצירת שני האללים, אבל נושא זה הינו מעבר לתחומי המאמר הנוכחי).

נוסף, המייצג מקטע קטן יותר, כלומר - אלל שני (איור 5). תוצאות דומות נמצאו גם בשני אנוזימים נוספים - שני מקטעים עם הבדל בגודל קבוע ביניהם. בהמשך להסבר הקודם אנו מניחים, שפרים עם פס יחיד הינם הומוזיגוטיים



איור 5: דוגמאות לתוצאות עיכול דנ"א של פרים באנוזימי הרסטריקציה BGIII או BamHI והכלאתו עם הגן של הורמון הגידול (bGH).

של גנים המשפיעים, כל אחד חלקית, על תכונה כמותית. קשה לזהות אללים של גן כזה, בגלל המיסוך על ידי הגנים האחרים.

נניח שקיים גן בעל שני אללים השונים זה מזה בהשפעתם על התכונה הכמותית החשובה לנו. פר הטרזיגוט - בעל שני אללים שונים - יוריש כל אלל לחצי מצאצאיו. נסמן את שני האללים כ-A1 ו-A2. נניח שממוצע התנובה של הבנות הנושאות את A1 גבוה מזה של הבנות הנושאות A2. ברור שמטרת המטפח תהיה לזהות את הגן הנידון ולברור את האלל A1 המוצלח יותר.

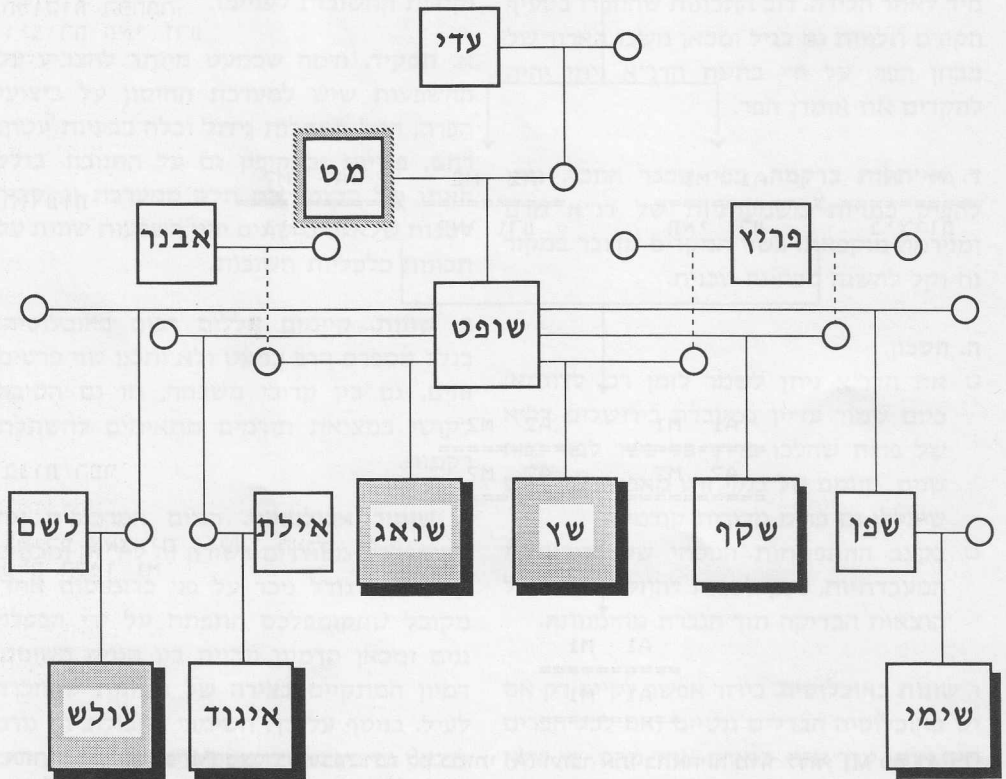
מיפוי וזיהוי גנים נעשה בעזרת סמן גנטי. סמן כזה מאפשר להבחין בין שני כרומוסומים הומולוגיים. סמנים מקובלים הינם:

- הבדלים מבניים בין שני הכרומוסומים בהם ניתן להבחין במיקרוסקופ.

האלל הנוסף, הקטן יותר, הופיע אצל הפרים עולש, שץ, שואג, מערב ופרש. כולם נמצאו כצאצאי פרים מיובאים. שלושת הראשונים שייכים לאותה משפחה, המוצגת באיור 6. האלל הקטן יותר לא זוהה אצל שום פר מקו ישראלי טהור. המסקנה המתבקשת היא, שאלל זה יובא לארץ על ידי פרים כמו מט, אביו של שופט. זוהי הדגמה יפה לכך, שייבוא פרים זרים אכן מביא להופעת אללים חדשים באוכלוסיה.

מיפוי גן כמותי

לאחר שזוהה סמן רפ"פ דוגמת הורמון הגידול שתואר לעיל, יש לבדוק אם אכן מתלווה לו השפעה על תכונה בה יש לנו ענין. תכונות בעלות חשיבות כלכלית הינן רובן ככולן תכונות כמותיות. כזכור, גן כמותי הינו אחד ממספר רב



איור 6: משפחת שופט. פרים מסומנים בריבועים, פרות בעיגולים, ריבועים ריקים - פס יחיד (הומוזיגוטיים); ריבועים מקווקיים - שני פסים (הטרזיגוטיים); מסגרת כהה - מקורות משוערים לפס הנדיר, "המהיר".

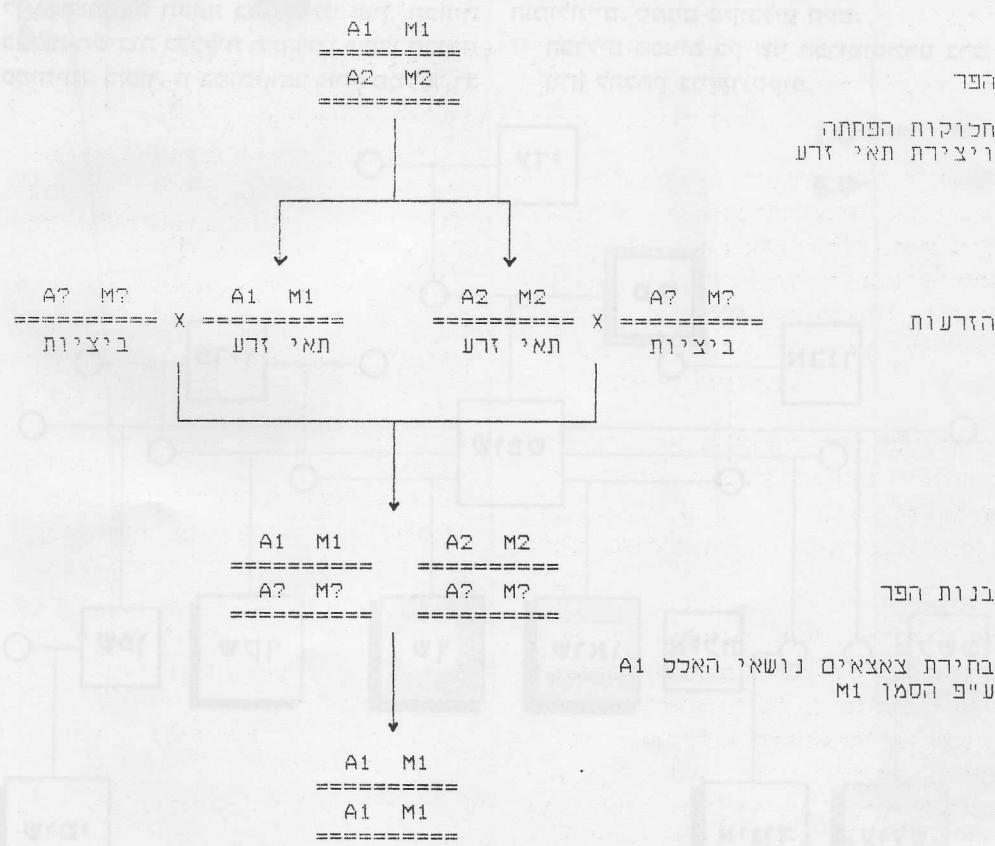
מהתאחיה יתקבל הבדל בתנובה בין הבנות נושאות M1 לנושאות M2. ההפרש בין שתי הקבוצות יהיה שווה להבדל בין A1 ל-A2, ולמעשה תוצאה שלו. מכיוון שאין אפשרות אחרת לזהות את הגן הכמותי, ואת הסמן כן ניתן לזהות ישירות, אפשר להשתמש בסמן כתו זיהוי לגן הכמותי. לכן, הבירור יהיה לטובת הצאצאים הנושאים את הסמן M1.

יתרונות השיטה

א. אי-תלות בניטוי הפנוטיפי. ההסתכלות הינה ישירות על החומר התורשתי עצמו. לחלק ניכר מהשינויים בדנ"א אין ביטוי פנוטיפי כלל, ולכן

הבדלים בין אללים של גנים הידועים כנמצאים על הכרומוסום הנידון (לא כאן המקום לפרט איך ידוע שהגנים נמצאים על הכרומוסום). בהבדלים כאלה ניתן להבחין או לפי המראה החיצוני או לפי בדיקות מעבדה. הזיהוי האחרון כולל כמובן גם את שיטת הרפ"פ.

נניח שקיים סמן בעל שני אללים - M1 ו-M2 - על כרומוסום מסויים. כמו כל גן יעבור כל אלל לחצי מהבנות. אם הגן הכמותי A נמצא על אותו כרומוסום ובסמוך לסמן M, יעברו האללים שלו **בתאחיה** לאללים של הסמן; למשל - A1 עם M1 ו-A2 עם M2 (איור 7). כתוצאה



איור 7: סמן רפ"פ (M) מצוי בסמיכות רבה לגן כמותי (A) ועובר את התאחיה מדור לדור: עם A1 ו-M2 עם A2. פר הטרוזיגוטי יוריש כל כרומוסום לכחצי מבנותיו. בהנחה שהגנים האמהיים (A?M?) של כל חצי מהבנות שווים זה לזה בממוצע, אם יש הבדל בין שתי קבוצות הבנות ניתן ליחסו להבדל קטע המסומן ע"י M ולבצע בירור לטובת בני הבקר נושאי האלל המתאים (A1) ע"פ הסמן הצמוד אליו.

בשיטת הרפ"פ צפוי להיות גדול, יחסית לשיטות אחרות לזיהוי סמנים גנטיים, למשל וריאנטים של חלבונים. בנוסף לכך קיימים בגנום (מערכת הגנים) אזורים המגלים שונות גבוהה במיוחד. שימוש בגלאים מאזורים אלה צפוי לחשוף שונות גבוהה באוכלוסיה ובכך לספק אמצעים לעריכת סלקציה ומבחני הורות. דוגמא לאזור עם שונות גבוהה במיוחד הינו קומפלכס תואם-הרקמות, וזה אכן היה נושא העבודה המתוארת להלן.

קומפלכס-תואם-הרקמות

קומפלכס-תואם-הרקמות כולל מספר רב של גנים המשתתפים במערכת החיסון. מבנה הקומפלכס ותפקידי הגנים השונים הינם נושא מורכב, ולכן לא נפרט. נסתפק בהצבעה על נקודות החשובות לענייננו.

א. תפקיד. נדמה שכמעט מיותר להצביע על ההשפעות שיש למערכת החיסון על ביצועי הפרה, החל ממחלות גידול וכלה בבעיות עטין, רחס, פוריות ובעקיפין גם על התנובה. בגלל היותו של הקומפלכס חלק ממערכת זו, סביר לצפות שלא לאלים שונים יהיו השפעות שונות על תכונות כלכליות חשובות.

ב. שונות. קיימים אללים רבים באוכלוסיה. בגלל מספרם הרב כמעט ולא יתכנו שני פרטים זהים, גם בין קרובי משפחה, וזו גם הסיבה לקושי במציאת תורמים מתאימים להשתלת רקמות.

ג. שימור אבולוציוני. הגנים המרכיבים את הקומפלכס מסודרים בשורה זה ליד זה ומכסים קטע בעל גודל ניכר על פני כרומוסום אחד. מקובל שהקומפלכס התפתח על ידי הכפלת גנים ומכאן הדמיון הקיים בין הגנים השונים, דמיון המתקיים בצידה של השונות שהוזכרה לעיל. בנוסף על כך, השימור האבולוציוני גורם לדמיון גם בין גנים ממינים זרים, למשל, בין גנים של האדם לגנים של הבקר. לשימור האבולוציוני לשימור האבולוציוני יש שתי השלכות חשובות:

אין שינויים אלה חשופים לבידור. כתוצאה מכך צפוי מספר רב, בלתי מוגבל למעשה, של סמנים. מספר האללים תלוי באנזימי הרסטריקציה ובגלאים.

ב. אי-תלות במין. רוב התכונות החשובות לרפתן תלויות במין ומתבטאות בנקבות בלבד, תנובה, מבנה עטין וכד'. זו הסיבה לצורך בקיום מבחן בנות. הגנים האחראיים לתכונות אלה נמצאים כמובן גם באב. בשיטת רפ"פ ניתן לזהותם ולערך אומדן של ערכו הגנטי.

ג. אי-תלות בגיל. מכיון שתכולת הדנ"א שלמה ברוב רקמות הגוף לאורך כל החיים, למעשה אפשר להשתמש בשיטת הרפ"פ אפילו לאיבחון טרום-לידתי, כפי שאכן נעשה באדם או מיד לאחר הלידה. רוב התכונות שהוזכרו בסעיף הקודם תלויות גם בגיל ומכאן משכו הארוך של מבחן הפר. על ידי בחינת הדנ"א ניתן יהיה להקדים את אומדן הפר.

ד. אי-תלות ברקמה. כפי שכבר הוזכר, ניתן להפיק כמויות משמעותיות של דנ"א מדם ומזירמה מוקפאת. בשני המקרים מדובר במקור נח וקל להשגה מבחינה טכנית.

ה. חסכון.

- את הדנ"א ניתן לשמר לזמן רב. לדוגמא: כיום שמור עדיין במעבדה בירושלים דנ"א של פרות שהלכו בדרך כל בשר לפני כמה שנים. קיומם של בנקי זרע מאפשר מחקרים שיכללו גם פרים מדורות קודמים.
- בקצב ההתפתחות הנוכחי של הטכניקות המעבדתיות, ניתן לצפות להזולה ניכרת של הוצאות הבדיקה תוך הגברת מהימנותה.

ו. שונות באוכלוסיה. בירור אפשר לקיים רק אם יש באוכלוסיה הבדלים גנטיים (אם לכל הפרים היה אותו ערך גנטי, בחירת אחד מהם, מי שלא יהיה, לא תשנה את הערך הגנטי של העדר). ההבדלים הגנטיים חיוניים אף יותר לגבי עריכת מבחני הורות. כאמור, מספר האללים הנחשפים

זו אכן מתנהגת כהפלוטיפ. לכל פרט יהיו שני הפלוטיפים, המתיחסים זה לזה כמו אללים של גן "רגיל". זיהוי ההפלוטיפ מסובך, יחסית לזיהוי אללים של גנים כמו הגן של הורמון הגידול, בגלל ריבוי הפסים של כל הפלוטיפ.

ב. זיהוי הורים. בכל אחת משתי המשפחות הוגרלו לכל בת ולכל אם מספרים אקראיים. בהנחה של אב ידוע, היו לכל בת עשר אמהות אפשריות. בעזרת תבניות הפסים, נעשה נסיון לזהות את האם האמיתית.

תוצאות הניתוח העקריות היו:

א. זיהוי הפלוטיפים.

□ למרות כמות הפסים הרבה ומספר הבנות המועט, זוהו במלואם שני ההפלוטיפים של כל אחד מהפרים. תוצאה זו היתה מעבר לצפוי. אם היא אכן מייצגת את כושר ההבחנה של השיטה, אז אפשר יהיה לאפיין אזור כרומוסומלי זה בעדר הישראלי על ידי בדיקת פרי הזרעה בלבד, במחקר מצומצם יחסית.

□ לגיוס ולפרוח זוהה הפלוטיפ משותף. מכיון שאין ביניהם קרבת משפחה, ועל ערכם הגנטי אין צורך להרבות במילים, יתכן ששתי תצורות זו מצביעה על חשיבותו של הפלוטיפ זה לתכונות כלכליות כלשהן. בדיקת אפשרות זו הינה ענין למחקר נפרד.

ב. זיהוי הורים.

ב-75% מהמקרים נותרה האם האמיתית כאם האפשרית היחידה. בשום מקרה לא נפסלה האם בטעות. תוצאה זו נופלת אמנם מתוצאות זיהוי הורים המתבסס על השיטות הנוכחיות (זיהוי סרולוגי, בעזרת נוגדנים), אבל היא מבטיחה מאד בהתחשב בכך, שהזיהוי היה מבוסס רק על גלאי אחד ושלושה אנזימים. בנוסף על כך היו תנאי התרגיל – עשר אמהות אפשריות – קשים הרבה יותר מהצפוי בשטח.

כאן המקום להזכיר, כי לאחרונה קיימת התרגשות רבה בין מדעני הרפ"פ כתוצאה

□ גלאי שבוודד מאחד הגנים בקומפלכס יגיב גם עם גנים אחרים, שכונים. כתוצאה מתגובה זו יכללו תבניות הפסים בתשלילים של קרני X מספר רב של פסים, והן יהיו מורכבות יחסית לתבניות הנחשפות על ידי גלאי מהגן של הורמון הגדילה (לדוגמא, השווה את איורים 6 ו-7).

□ ניתן להשתמש בגלאים זרים. למשל, אפשר לסרוק גנום בקר עם גלאי שבוודד מדנ"א אנושי. נקודה זו נכונה לגנים רבים אחרים.

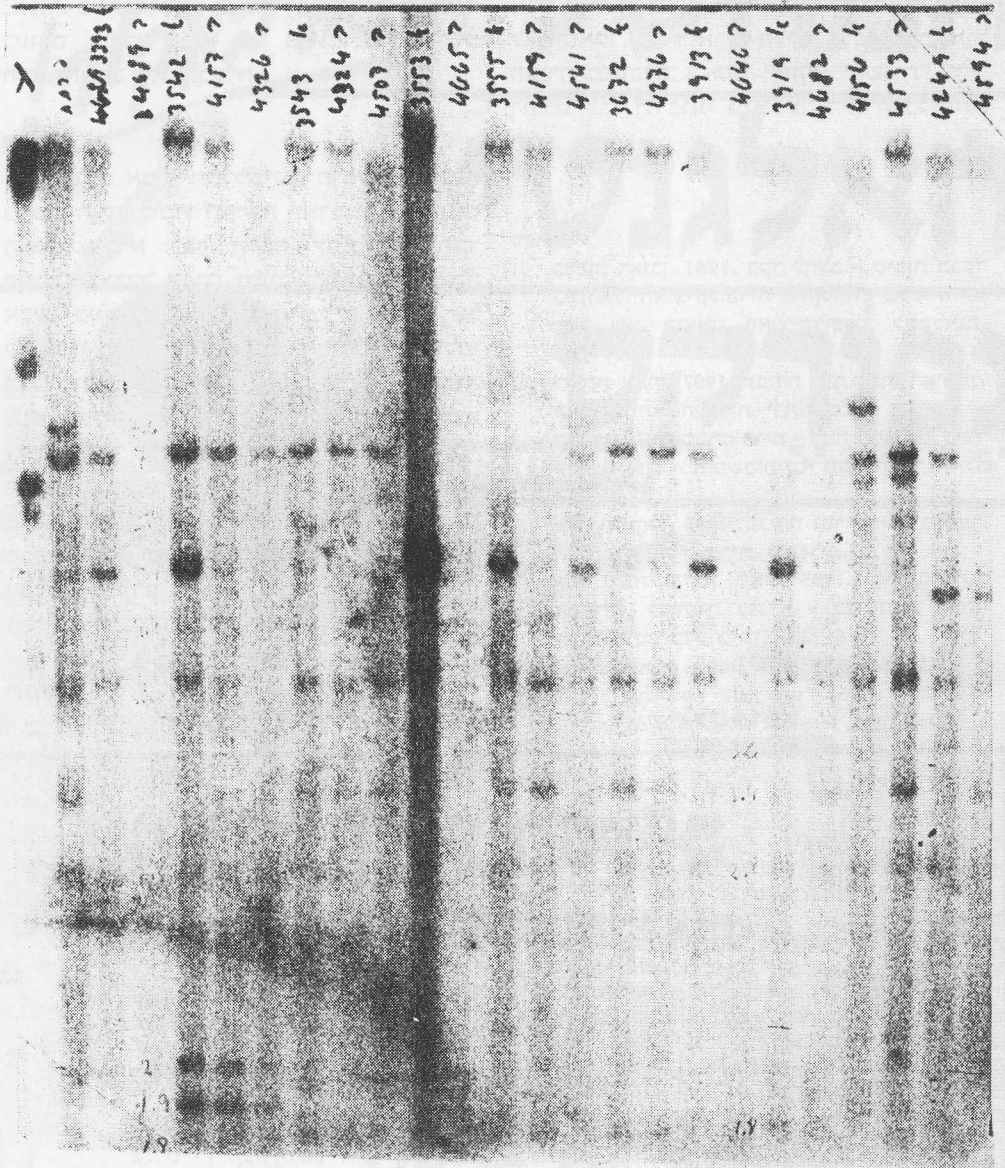
ד. תאחיזה. במחקרים של הזמן האחרון הולך ומצטבר מידע על נוכחות גנים בעלי חשיבות מרובה על אותו כרומוסום, ובקרבה יתרה לקומפלכס. קרבה זו גורמת לכך שגנים אלה והקומפלכס נמצאים בתאחיזה. תודות לתאחיזה זו אפשר להשתמש בקומפלכס כסמן של הגנים השכנים, כפי שתואר בפרק הדן במיפוי גנים כמותיים.

שימוש בגלאי אנושי מקומפלכס-תואם-הרקמות לבדיקת דנ"א של בקר

בעבודה (2) נבדקו שתי משפחות פרים. כל "משפחה" כללה פר, קבוצה מבנותיו ואמהותיהן. שני הפרים היו גיוס ופרחה, הפרות היו מהרפת של קיבוץ נוגר. דנ"א של כל פר ופרה עוכל באנזים רסטריקציה ועבר הכלאה עם גלאי שבוודד מדנ"א אנושי. ניסוי זה בוצע בשלושה אנזימים שונים. דוגמה לתוצאות שנתקבלו מוצגת באיור 8. על משמעות הביטוי "טיביעת האצבעות של הדנ"א" מעידה העובדה, שלמרות קרבת משפחה משמעותית בין ההורים בכל משפחה ובודאי בין הבנות, אין שתי תבניות פסים זהות לחלוטין.

ניתוח התוצאות, שהיה כרוך בתרגיל הדמיה (סימולציה), כלל שני חלקים:

א. **זיהוי הפלוטיפים.** "הפלוטיפ" מוגדר כקבוצה של אתרים בכרומוסום הנמצאים בתאחיזה מלאה זה לזה ועוברים מדור לדור כ"סופרגן". כזכור, גלאי מגן בקומפלכס-תואם-הרקמות מזהה גם גנים אחרים בקומפלכס, וקבוצת גנים



איור 8: תבניות הפסים של פרוחה, קבוצה מבנותיו ואמהותיהן, כפי שנתקבלו לאחר עיכול הדנ"א באנזים רסטריוקציה (PvuII) והכלאתו עם גלאי אנושי מקומפלקס-תואם-הרקמות. שם הפר ומספרי הפרות מסומנים מעל ראשית התנועה, א"א, ב"ב. כל בת נמצאת מימין לאם (לכמה אמהות יש שתי בנות מפרוח). למרות קרבת המשפחה בין הפרטים השונים, אין שתי תבניות זהות לחלוטין!

מגילוי רצפים בעלי מידה רבה מאד של שונות גנטית בגנום האנושי. תגליות אלה פתחו אפשרויות חדשות בעולם הגנטיקה הרפואית. יש להניח, ותוצאות ראשונות מאמתות זאת, שכך המצב גם בבע"ח. לסמנים אלה תהיה עוצמה העולה בהרבה על סמנים דוגמת ה-

אדם פרידמן בעבור ההדרכה בעבודה וההערות על המאמר, לד"ר אריק הלרמן ולפאני שפר על העזרה במעבדה, לאנשי "און", "השרות", ד"ר רוברט כהן ולרפתני גניגר על העזרה בלקיחת הדם.



MHC. כעת מושקע מאמץ רב במספר מעבדות בעולם ובארץ (כמו גם במעבדתנו) ליישם התפתחויות אלה בבע"ח.

סיכום

לא נגזים אם נייחס לשיטת הרפל"פ השפעה מהפכנית על לימוד תורשת האדם ומיפוי הגנום האנושי. היא כבר חדרה לתחום המחקר החקלאי, ובכל חברת זרעים רצינית באמריקה אפשר כיום למצוא מעבדת רפל"פ. היותה של שיטה זו באחד ממוקדי המחקר הגנטי העולמי מבטיחה התקדמות טכנולוגית מהירה שתוצאותיה יהיו ייעול והוזלה. כבר עכשיו אפשר לדבר על "דור שני" של גלאי רפל"פ. כלי חדש ורב עוצמה זה יכול וצריך לעמוד לרשות מטפחי הבקר. ניתן לצפות כבר היום למצב, בו מבחני הורים, מיפוי גנים בעלי חשיבות כלכלית ושיפוט מוקדם ואמין של עגלים צעירים יהיו חלק חשוב ממערכת הטיפוח.

תודות

ברצוננו להודות לפרופ' משה סולר ולפרופ'

- ספרות**
1. ברענן ראובן. 1981. בקר לחלב - טיפוח הבקר בישראל. האנציקלופדיה לחקלאות, בעלי חיים, חלק שני. הוצאת האנציקלופדיה לחקלאות. 577-568.
 2. ליפקין אהוד. 1987. עבודת גמר לתואר מוסמך. האוניברסיטה העברית, ירושלים.
 3. קלי דן. 1979. מבחני פרים - למה לעשותם, כיצד הם מבוצעים ומה משמעותם? משק הבקר והחלב 11-9, 161.
 4. קשי יחזקאל. 1985. עבודת גמר לתואר מוסמך. האוניברסיטה העברית, ירושלים.
 5. רום משה ובקמן ג'אק. 1985. האוניברסיטה העברית. רבגוניות בדני'א - כלי חדש לזיהוי ומיפוי גנטי. מדע כ"ט, 3, 128-123.
 6. P.L. Senger. 1987. Bull's mammary glands may speed up sire proving. Hoard's Dairyman, October 1987, p. 823.

שלכם טובה
אסף זרמון

יעקב לוין ובניו בע"מ טחינת מינרלים לתעשייה וחקלאות הודעה לרפתות!!!

הננו להודיעכם על הספקה סדירה של חומרים לפיזור תחמיץ והזנה לפי הפירוט הבא:

1. סידן קמחי - לתחמיץ.
 2. סידן קמחי 20 - פחמת סידן 98.7%, תמיסות 31%.
 3. סידן קמחי 100 - פחמת סידן 98.7%, תמיסות 45%.
 4. סידן 325 - פחמת סידן 98.7%, תמיסות 66.8%.
 5. תערובת מלח-סידן - כל הרכב אפשרי לפי דרישת הלקוח.
- האספקה אפשרית בתפוזרת או בשקים גדולים של 1 טון.

בדבר פרטים נא לפנות למשרד מפעלנו

רח' השיש 10 מפרץ חיפה 26291

טל: 721283, 04-722143 בערב: 04-388236 (ליאור)