

## חלב כמקור לדנ"א

ליפקין א', שלום א', חטיב ח', סולר מ' ופרידמן א'  
המחלקה לגנטיקה, המכון למדעי החיים ע"ש אלכסנדר סילברמן,  
האוניברסיטה העברית בירושלים

### תקציר

טכניים מובנים באיסוף דם מפרה, קל וחומר  
ממספר רב של פרות המפוזרות בעדרים רבים  
על פני מרחקים גדולים.

חלב הפרה מכיל עשרת אלפים עד עשרה  
מיליון תאים סומטיים למ"ל, תלוי במצב הפרה  
(מספר המלטות, עונה, ימים מהמלטה, מצב  
הבריאות, ועוד). רוב התאים הם תאים לבנים  
(כמו בדם), מיעוטם (פחות מ-2%) תאי אֶפִּיְתֵל  
(13). מכיוון שחליבה היא חלק משגרת היום  
ברפת ואין שום צורך בעזרה מיוחדת, שימוש  
בתאים אלה היה מקל מאד על תהליך השגת  
דנ"א מפרות. בנוסף על כך, בעדר החלב  
בישראל, דוגמות חלב של כל פרה מכל הארץ  
נאספו בכל חודש במעבדה המרכזית  
בבית-אהרון לבדיקת תכולות החלבון, השומן,  
הלקטוז והתאים הסומטיים. איסוף זה חוסך אף  
את הצורך להגיע לכל עדר.

בעבודה הנוכחית אנו מראים, כי בחלק  
מהפרות דוגמות חלב יכולות לשמש כמקור נוח  
להפקת דנ"א, וכי לכל הפרות דוגמות חלב  
זמינות תמיד כמצע לייתור רצפים ספציפיים של  
דנ"א ב-PCR.

### שיטות וחומרים

דוגמות חלב בנפח של 25 עד 50 מ"ל נאספו  
בקיבוץ גניגר, במהלך שקילות חלב חודשיות,  
בתוספת החומר המשמר המשמש כרגיל  
בשקילות אלה. ספירות תאים סומטיים נערכו  
במעבדה המרכזית לחלב בבית-אהרון (9). מ"ל  
אחד מכל דוגמה נלקח ל-PCR, והשאר שימש  
להפקת דנ"א.

דנ"א הופק מחלב בתהליך דומה בעיקרו  
להפקה מזרמה (4), תוך שינויים קלים. תפוקת  
הדנ"א נקבעה לפי בליעת אור אולטרא-סגול.  
התוצאות הכמותיות נותחו בעזרת התוכנית

תאים סומטיים בחלב שימשו כמקור לדנ"א  
וכמצע (substrate) ליתור (amplification) דנ"א  
על ידי תגובת שרשרת (PCR). להפקות  
מוצלחות של דנ"א היו נחוצים לפחות 17  
מיליון תאים. תפוקת הדנ"א מהתאים  
הסומטיים בחלב היתה לא אחידה, וגמוכה עד  
בינונית יחסית לתפוקה מתאי-דם לבנים. הדנ"א  
שהופק נמצא מתאים לחיתוך באנזימי  
רסטריקציה, בדיקת "טביעת אצבעות של  
דנ"א", PCR וקביעת רצף הבסיסים. PCR ישיר  
של דוגמות חלב, תוך שימוש בשורה של זוגות  
תחלים (primers), הניב תוצרים בגדלים הצפויים  
והים לתוצרים המתקבלים מדנ"א שהופק  
מחלב או מדם. תוצר PCR מחלב שימש  
לקביעת רצף ישירה של חלק מהגן להורמון  
הגדילה של הבקר. דוגמות חלב עם חומר משמר  
נשמרו ב-4°C או -20°C במשך יותר מ-200 יום  
ללא פגיעה ביעילות ה-PCR. מסקנת המחקר  
היא, כי בחלק מהפרות (כ-50%, נכון לעכשיו)  
חלב יכול לשמש כתחליף לדם בתור מקור  
לדנ"א, וכי בכל הפרות חלב הוא מצע מועדף  
ל-PCR.

### מבוא

גיוון (polymorphism) ברמת הדנ"א נחשף על  
ידי עיכול באנזימי רסטריקציה והכלאה (RFLP);  
1, 2, 5, 12) או על ידי ייתור רצפים ספציפיים  
של דנ"א בתגובת שרשרת (1, 2, 6; PCR;  
Polymerase Chain Reaction). גיוון זה משחק  
תפקיד גדל והולך כאמצעי למבחני הורים (8)  
ומיפוי הגנום בבקר (11), וככלי אפשרי בעתיד  
לסלקציה בעזרת סמנים (7, 10, 12;  
marker-assisted selection). בבקר, ככרוב בעלי  
החיים, תאים לבנים (לויקוציטים) מדם הם  
המקור המקובל לדנ"א. עם זאת, ישנם קשיים

אָגרוֹ, ועל ידי שימוש בתוצר ה-PCR לשם קביעת רצף הבסיסים של חלק מהגן להורמון הגדילה של הבקר.

קביעת הרצף, לאחר השקעת תוצר ה-PCR באיזופורפונול, נעשתה בשילוב PCR ושיטת הדי־אֶאֶפְסִי של סנגר (2, 3), בעזרת הערכה לקביעת רצף של ביולאב.

### תוצאות

#### הפקת דנ"א

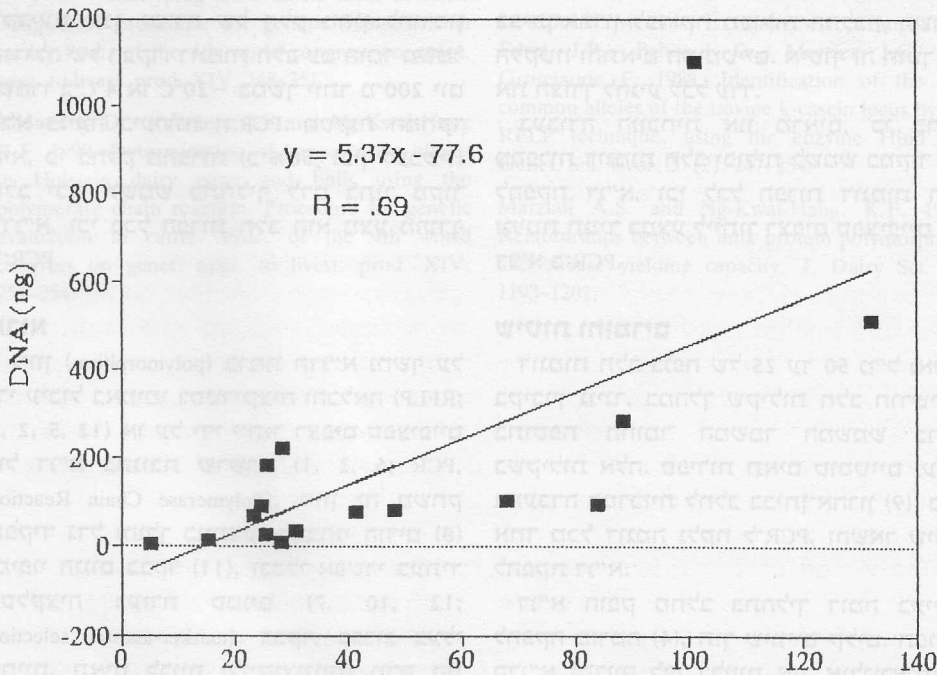
השקעה אֶתְנֹולִית של דנ"א מחלב יצרה משקע ברור ("מדוזה") שנאסף בקלות ב־15 מ' 31 דוגמות. התפוקה לדוגמה היתה בין 11 ל-1101 מיקרוגרם, ועלתה עם מספר התאים (איור 1). לפי מודל רגרסיה (איור 1) התקבל סף של 17 מיליון תאים בערך, לקבלת משקע דנ"א

קוטר־פר־3 (בורלנד). איכות הדנ"א, נבחנה לפי עיכול עם אנזים הרסטריקציה HaeIII ייתור על ידי PCR, וקביעת רצף בסיסי תוצר ה-PCR.

עם ארבעת זוגות תחלים המשמשים לעבודה במעבדתנו, בוצע על חלק מדוגמות החלב ששימשו גם להפקות הדנ"א, סה"כ קרוב ל-30 ריאקציות. דוגמות נשמרו בקירור (4°C) או בהקפאה (-20°C) למשך 14 עד למעלה ממאתיים יום. בהתבסס על ספירות התאים נלקחו בין אלף לאלפיים תאים לריאקציה, לכל היותר 16 מיקרו־ליטר, כשבמקרים מסויימים אף היה צורך בדילול החלב כדי להגיע למספר התאים המבוקש. התאים פוצצו על ידי הדגרה במשך חמש דקות במים רותחים, חמש דקות ב-50°C, ושוב חמש דקות במים רותחים. תוצרי ה-PCR נבחנו על ידי הרצה אלקטרופורטית בג'ל

#### איור 1. תוצאות הפקת הדנ"א.

תפוקת הדנ"א בתלות במספר התאים בדוגמה. רק 15 ההפקות המוצלחות, עם משקע בראיסוף של דנ"א, נכללו בחישוב משוואת הרגרסיה.

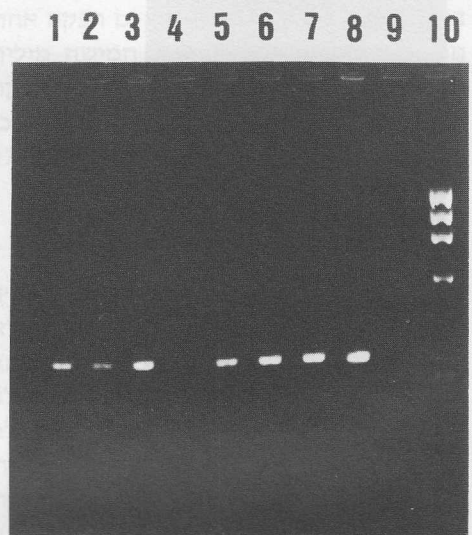
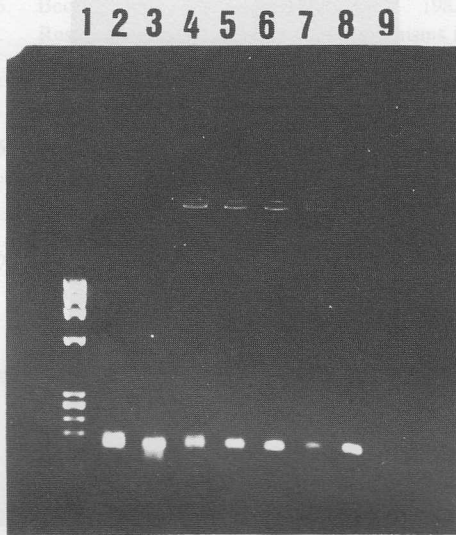


דנ"א (נ"ג) סה"ה תאים סומטיים בדוגמה (x 10<sup>6</sup>) Total somatic cells per sample

## איור 2. תוצאות ה-PCR שנבדקו על ידי הרצה בג'ל אגרוז.

ב. ייתור על ידי PCR של קטע אנונימי בגנום הבקר: ערוץ 1: דנ"א של הפאג'  $\times 174$  חתוך באזנים 99 HaeIII כמדד לגודל; חלב בן 33 יום (ערוצים 2-5), 99 יום (ערוץ 6), 69 יום (ערוץ 7) ודנ"א שהופק מדם (ערוץ 8). ערוץ 9: ביקורת.

א. ייתור על ידי PCR של קטע מהגן של הורמון הגדילה: דנ"א שהופק מחלב (ערוצים 1 ו-2), דנ"א שהופק מדם (ערוצים 3, 6-9), חלב קפוא בן מאה ימים (ערוץ 4). ערוץ 9: ביקורת, ערוץ 10: דנ"א של הפאג'  $\times 174$  (phage) חתוך באזנים HaeIII כמדד לגודל.



(איור 2ב); לא היה גם הבדל בין חלב שנשמר בקירור לחלב שנשמר בהקפאה. דוגמות החלב נשמרות עדיין במעבדתנו, ותוצר PCR של חלב בן יותר מ-200 יום שימש לקביעת רצף מוצלחת של חלק מהגן להורמון הגדילה (איור 2א).

### דיון

#### הפקת דנ"א

כאשר חלב שימש כמקור לדנ"א, ההפקות היו מוצלחות רק כאשר כלל הדוגמה ששימשה להפקה הכילה יותר מ-17 מיליון תאים סה"כ. הופקו בין 11 ל-1101 מיקרוגרם דנ"א. הדנ"א שהופק נמצא מתאים לעיכול רסטריקציה, PCR וקביעת רצף.

תוצאות ההפקות מראות, כי החלב הוא מקור דנ"א אמין פחות מאשר הדם. למספר רב של הפקות דנ"א, אם במסגרת מחקר ואם בעתיד

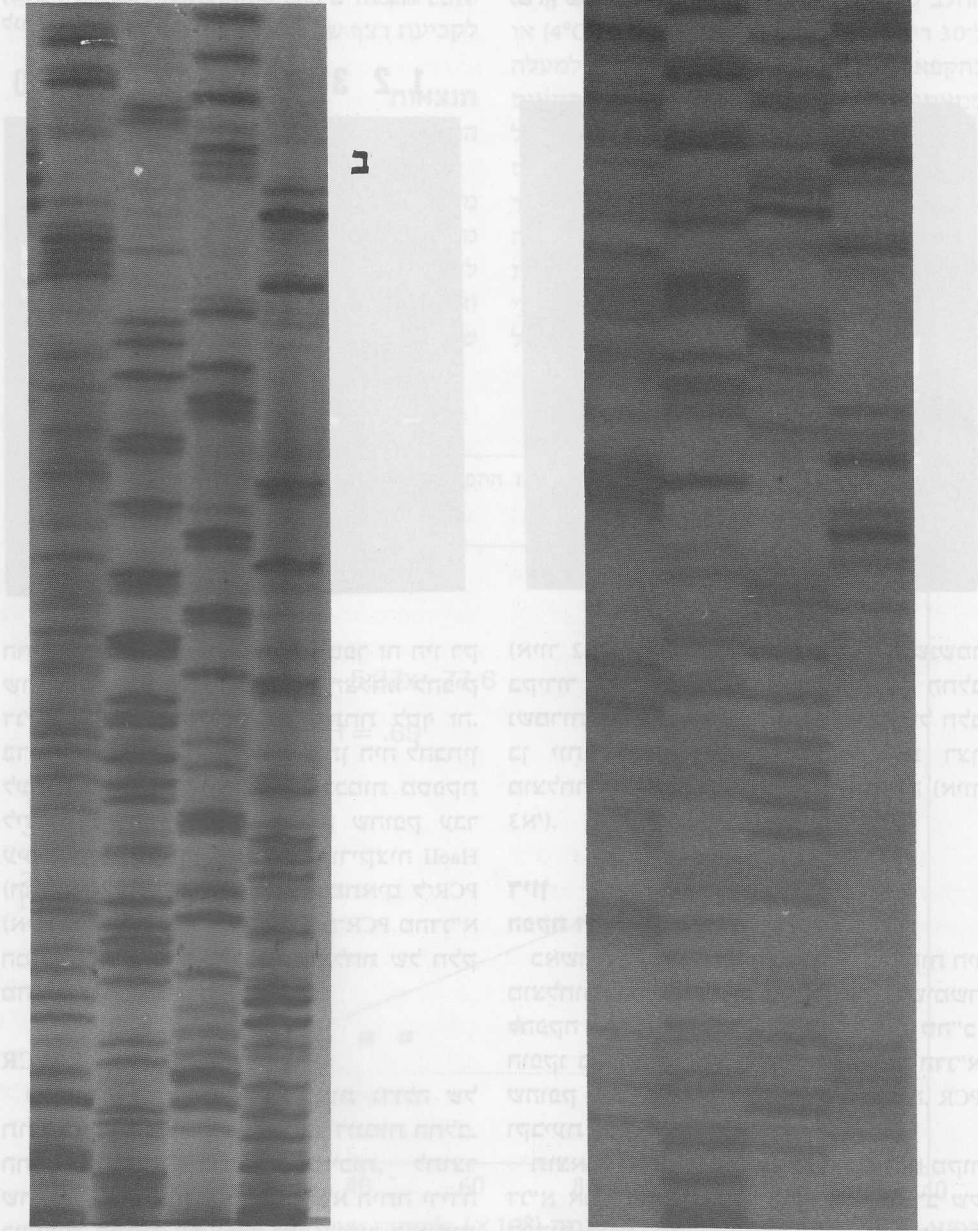
החיוני להפקה מוצלחת. מעל מספר זה היו רק שתי דוגמות מתוך 15 מהן לא הצלחנו להפיק דנ"א, לעומת 12 מתוך 13 מתחת לסף זה. בדוגמות מהן לא נאסף דנ"א ניתן היה להבחין לעתים בחוטי דנ"א, אבל לא בכמות מספקת ליצירת משקע לאיסוף. הדנ"א שהופק עבר עיכול תקין על ידי אנזים הרסטריקציה HaeII (התוצאות לא מוצגות), ונמצא מתאים ל-PCR (איור 2א' ערוצים 1 ו-2). תוצר ה-PCR מהדנ"א המופק שימש לקביעת רצף מוצלחת של חלק מהגן להורמון הגדילה (איור 2ב).

### PCR

כל זוגות התחלים הניבו כמות גדולה של תוצר באורך הצפוי (איור 2) מכל דוגמות החלב. התוצאות דמו, בכמות ובאיכות, לתוצר שהתקבל מדנ"א שהופק מדם. לא היתה ירידה בעילות הייתור עם משך זמן שימור הדוגמות

איור 3. תוצאות קביעת רצף ישירה של תוצר PCR.

תוצר PCR ישיר מחלב (א) או מדנ"א שהופק מחלב (ב) שימש לקביעת רצף של חלק מהגן להורמון הגדילה.



3. Adams S. and Blakesley R. 1991. Linear Amplification sequencing. Focus (BRL) 13 (2); 56-57.
4. Andersson L., Bohme J., Rask L. and Peterson P. A. 1986. Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility genes: 1. Extensive polymorphism of DQ $\alpha$  and DQ $\beta$  genes. Animal Genetics 17:95.
5. Beckmann J. S. and Soller M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and cost. Theoretical and Applied Genetics 67:35.
6. Beckmann J. S. and Soller M. 1989. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. Bio/Technology 8:930.
7. Kashi Y., Hallerman E. and Soller M. 1990. Marker-assisted selection of candidate bulls for progeny testing programs. Animal Production 51:63.
8. Kashi Y., Lipkin E., Darvasi A., Nave A., Gruenbaum Y., Beckmann J. S. and Soller M. 1990. Parentage identification in the bovine using "deoxyribonucleic acid fingerprints". J. Dairy Sci. 73:3306.
9. Ostensson K., Hageltorn M. and Astrom G. 1988. Differential cell counting in fraction-collected milk from dairy cows. Acta Veterinaria Scand. 29:493.
10. C. Smith, and Simpson S. P. 1986. The use of genetic polymorphisms in livestock improvement. J. of Animal Breeding and Genetics 103:205.
11. Soller M. 1990. Genetic mapping of the bovine genome using deoxyribonucleic acid-level markers to identify loci affecting quantitative traits of economic importance. J. of Dairy Science 73:2628.
12. Soller M. and Beckmann J. S. 1982. Restriction fragment length polymorphism and genetic improvement. In: Proceeding of the Second World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Madrid, 6:396.
13. Targowski S. P. 1983. Role of immune factors in protection of mammary gland. J. of Dairy Science 66:1781.

כחלק ממערכת טיפוח, דרושה שגרה סטנדרטית אמינה. התלות הנוכחית בספירת תאים לצורך קביעת נפח החלב המשמש להפקה מסבכת את התהליך ומקטינה את היתרון של החלב על פני הדם; יתר על כן, דרישות השוק ובריאות העדר עתידות להקטין את ריכוז התאים בחלב. לעומת זאת, השונות שהתקבלה ביעילות התפוקה (איור 1), כמו גם הפקה אחת מוצלחת מדוגמה שהכילה רק חמישה מיליון תאים, רומזות על הסיכוי לפתח תהליך הפקה יעיל יותר. בכל מקרה, התוצאות מראות כי התאמת הנפה, כך שמספר התאים יעלה על 17 מיליון, צריכה להבטיח הפקה מוצלחת.

#### PCR

חלב נמצא כמקור אמין לדנ"א ב-PCR. יציבות הדוגמות לתקופות ארוכות יחסית ללא תלות באופן האחסנה (קירור או הקפאה), והצורך בכמויות מזעריות, הופכים את החלב למקור דנ"א המועדף ל-PCR. השימוש בחלב יכול להקטין משמעותית את ההוצאות והמאמצים הכרוכים ביישום שיטות טיפוח עתידות המבוססות על סמני דנ"א (9, 10). בעזרת ציוד מתאים אפשר בקלות יחסית לשלב את תהליך ה-PCR במעבדה מרכזית כמו זו שבביתן-אהרון.

#### תודות

אנו מודים לאריאל דרבסי על העזרה באנליזה הסטטיסטית; לצוות הרפתנים של קיבוץ גניגר וליואב מסאמי על איסוף דוגמות החלב, ליאיר זליגר והצוות בביתן-אהרון על ביצוע ספירת התאים. המחקר נתמך על ידי Gesellschaft Für Biotechnologische Forschung ועל ידי מועצת החלב בישראל.

#### ספרות

1. ליפקין א', קשי י', נוה א', בקמן ג'. 1991. השבתת החי והצומח בעידן הגנטיקה הגנומית. מחקר חקלאי בישראל ה' (2-1): 125-144.
2. פרידמן א'. 1988/89. שיטות חדשות לאבחון מחלות. מדע ל"ב 5-6: 222-293.