

ברק פורת, יהודה ולר ומיכה רון – מכון וולקני, המחלקה לגנטיקה
משה בנד – המחלקה לגנומיקה, אוניברסיטת אילינוי, ארה"ב
micha@agri.huji.ac.il



שיטה חדשה לזיהוי איילוניות מקרים של תאומים, שלישייה ורביעייה

איילוניות היא עגלה שנולדה כתאומה לעגל זכר ועקב כך, סובלת מפגם בהתפתחות שבסופו של דבר מביא לעקרות. כמחצית מהזוגות התאומים הם צירוף של זכר ונקבה ורוב מכריע אינן נקבות תקינות. כרפתנים, יש לנו עניין להקטין את התופעה ולהוציא מהעדר, מוקדם ככל האפשר, את העגלות שאינן נקבות עקרות. במעבדה הגנטית של מכון וולקני פותחה, לאחרונה, שיטה מהירה ומוקדמת לבדיקת העגלות האיילוניות

התאומים ברפתות עולים ומגיעים עד מעל 7% בתחלובה רביעית. הדבר חשוב עוד יותר ברפתות גדולות, ששם לא תמיד ידוע למי לשייך את העגלות אשר נולדו יחד, באותו יום, בהמלטות יחידים ותאומים. נוסף על כך, לא ברור בדיוק מה קורה בהמלטות מרובות יותר של שלישיית ורביעיות.

קיימות כמה דרכים לזיהוי איילוניות: בדיקות קליניות – הבדיקה הרקטלית המקובלת ביותר בעייתית מכיוון שלא ניתן לבצעה בגיל מוקדם, בעוד שגידול העגלה יקר. בכדי לאבחן בגיל מוקדם יותר, ניתן למדוד את עומק הווגינה, אך גם במקרה זה הבדיקה אינה מדויקת, בגלל שונות גדולה בין האיילוניות עצמן ובשל חוסר מהימנות של מבצעי הבדיקה. כמו כן, קיימות עוד מספר בדיקות מעבדה שונות, כגון קריוטיפ, קבוצת דם, FISH ובדיקות הורמונליות, אך הבדיקה הגנטית לנוכחות כרומוזום Y זכרי היא המדויקת ביותר.



איילוניות

רקע

כימרה הינו אורגניזם המורכב משתי אוכלוסיות תאים שונות. בבקר, כימרות הן לא דבר נדיר וזאת בגלל מבנה השלייה הייחודי שלהן. במרבית ההריונות של תאומי בקר נוצרים גשרים בין כלי הדם העובריים הגורמים להחלפת דם ביניהם ולהשרשה צולבת של תאי אם של מערכת הדם והחיסון בין שני התאומים. המשמעות הקלינית היא בעיקר בתאומים שוני מין.

לאחרונה, פיתחנו שיטה חדשה לאבחון גנטי של כימרות בבקר. הבדיקה החדשה מאוד יעילה, זמינה ומדויקת, כאשר היתרון הגדול שלה הוא, שניתן לקבוע על-פיה את מצב העגלה החשודה כעקרה, כבר בגיל מוקדם מאוד ולהחליט אם לגדלה לחלב או לפיטום והאם לגדל את העגלים להזרעה

עפ"י מחקרים שונים, ב-85%-92% ממקרי תאומים שוני מין בבקר, הנקבה היא איילונית (Freemartin), כלומר עקרה, כתוצאה מהתפתחות לקויה של אברי הרבייה בשל רכישת תכונות זכריות, כתוצאה מחשיפה להורמונים זכריים מהעובר הזכרי, דרך החיבור בין השליות. ישנם מחקרים המראים פגיעה מסויימת גם בפוריות הזכרים הכימריים.

הרבה רפתנים פונים בבקשות לעזרה בזיהוי איילוניות. זיהוי מוקדם של איילוניות משמעותי ביותר, בגלל ההוצאות הכלכליות בגידול העגלות החשודות, או הצורך לפסול, באופן אוטומטי, את כל העגלות ולשלוח אותן לפיטום. המשמעות גדלה עוד יותר כיום, כאשר שיעורי המלטות

בר-מגן
מציע לרפתן
סל פיתרונות
מושלם

קרבווט - יותר בריאות 🐄
קרבווט - יותר חלב 🐄
קרבווט - יותר טבעי 🐄
קרבווט - פחות שלשולים 🐄

קרבווט - פחם לא פעיל ממקור
אלון צרפתי, הראה בתצפיות
מבוקרות, את התוצאות הטובות
ביותר, בספיחת מיקוטוקסינים
שבמזון ובמניעת שלשולים ממקור
אנדו טוקסינים, הנוצרים ע"י חיידקים
מזהמים במעיים.

קרבווט - הבריאות-הקטן, הקטן-הקטן

BAR-MAGEN LTD
בר-מגן
בע"מ
תרופות וטרינריות
הוספת סגן לבעלי חיים
תרכיב וטסינים-פיטור האנד ישראל
Animal Health & Nutrition, Feed Technology

בר-מגן איכות-אמינות-שירות

לפרטים: בר-מגן בע"מ 09-7603020



ארבעת העגלים בהמלטה של משק הבונים

שיטות

לאחרונה, פיתחנו שיטה חדשה לאבחון גנטי של כימרות בבקר. הבדיקה החדשה מאוד יעילה, זמינה ומדויקת, כאשר היתרון הגדול שלה הוא, שניתן לקבוע על-פיה את מצב העגלה החשודה כעקרה, כבר בגיל מוקדם מאוד ולהחליט אם לגדלה לחלב או לפיטום והאם לגדל את העגלים להזרעה.

לפני תאור השיטה, הסבר כללי:

בגנום של כל אורגניזם דיפלואידי ישנם 2 עותקים של דנ"א שעברו בהורשה מההורים. העותקים עלולים להופיע בווריאציות שונות (אללים). לנקבה, 2 עותקים של אותו כרומוזום מין X. לזכר, עותק אחד של כרומוזום X ועותק אחר של כרומוזום הייחודי רק לו Y. סמני דנ"א פולימורפיים מסוג מיקרוסטטיטים הינם מקטעים באורך עשרות עד מאות בסיסים, הבנויים בדרך כלל מיחידה חוזרנית של 2 בסיסים. מספר החזרות של אותה יחידה, הוא המקנה לאלל את ייחודו באתר המסויים בגנום.

השיטה החדשה מסתמכת על אנליזה בו-זמנית של 3 סמנים מיקרוסטטיטים על כרומוזום X ומקטע ייחודי על כרומוזום Y. השיטה פשוטה ומהירה ומורכבת מריאקציה אחת בלבד, כאשר מספיקה דגימת דם אחת מאחד התאומים. המכשור בשיטה זו מאפשר רגישות גבוהה מאוד של זיהוי מעבר של פחות מ-0.1% של תאים. בשיטה זו אנו עוקבים אחרי מעבר של כרומוזום Y זכרי לנקבה ומעבר של כרומוזום X נקבי לזכר.

הדבר מאפשר ביקורת פנימית כפולה של כרומוזום X על כרומוזום Y ולהפך. בנוסף, השיטה מאפשרת גם אבחון של הזכרים הכימריים, כך שהשיטה טובה לא רק ככלי יישומי, אלא גם ככלי מחקרי. הבחירה בסמנים על כרומוזומי המין ולא בכרומוזומי הגוף נובעת מהקושי לנתח עד 4 אללים שונים שמורשים מההורים לצאצא.

כדי לעקוב אחר הורשת האללים של הסמנים על כרומוזום ה-X נצטרך במקרה הקלסי שכל אלל יהיה בגודל שונה בשלושת כרומוזומי ה-X של ההורים (תמונה 1), אך קיימים גם מצבים אחרים, שבהם בהורים יופיעו רק 2 אללים שונים או במקרה הכי גרוע, שלושת האללים יהיו באותו גודל (תמונה 2). הפתרון בשיטה הנ"ל הוא שימוש ב-3 סמנים ה"מחפים" אחד על השני, כלומר מספיק סמן אחד מהשלושה שיציג אללים שונים בהורים, כדי להראות כימריזם. בכל מקרה, כדי להוכיח כימריזם בזכרים מספיקה נוכחות של יותר מאלל אחד. בנקבות, מספיקה נוכחות של יותר משני אללים.



תמונה 3



תמונה 1



תמונה 4



תמונה 2

הציגו את המקטע הייחודי על כרומוזום Y (תמונה 4). גם העגלים הראו נוכחות תאים נקביים בדמם כאשר כולם הציגו 3 אללים לסמן על כרומוזום X לפחות בסמן אחד מהשלושה. כמו-כן, בבדיקה וטרינרית, עומק הווגינה של כל העגלות החשודות נמצא קצר, לפחות פי-2 לעומת עגלות נורמליות בנות אותו גיל.

בהמשך המחקר בחנו את שיעור התאים הזכריים העוברים בין תאומים שוני מין. לשם כך השתמשנו במכשיר Real-Time PCR המסוגל לבדוק את כמות עותקים של מקטע דנ"א ספציפי (במקרה זה, המקטע הייחודי לכרומוזום Y). על-ידי השוואה של כמות העותקים בצאצאים הכימריים ביחס לכמות העותקים באביהם, נמצא כי שיעור התאים הזכריים בצאצאים הכימריים הוא בטווח של 25% עד 100%.

בהמשך, אנחנו מתכוונים להמשיך ולבחון גם מקרים שליליים של היעדר כימריזם כשאין מעבר, או כשיש מעבר מועט של תאים זכריים שלא משפיע על עקרות, ולבדוק האם קיים סף לשיעור התאים הזכריים הגורמים לאילוניות, ואם קיים, מהו? ■

תודות לרכזי הרפתות - גל בן-יוסף (הבונים), אסף בית-אריה (קבוצת יבנה), אבי דובדבני ויונתן אמיר (היוגב) ששלחו את דוגמאות הדם והשערות של התאומים. תודה לרופאים הווטרינרים - מוטי ליברבאום, אילן דגוני ואבנר שוהם שבדקו את התאומות.

להוריד את הסיכוי למקרים שבהם ההורים יציגו את אותו אלל בסמן עפ"י שכיחיות האללים שמצאנו, ב-98.3% ממקרי המלטות תאומים שוני מין באוכלוסיית ההולשטיין הישראלית ניתן להוכיח כימריזם בזכר כימרי באמצעות השיטה שפותחה. בהמלטות של שלישיות ורביעיות ההסתברות עולה עוד יותר. בנקבות, בגלל המקטע הייחודי לכרומוזום Y ניתן להגיע להסתברות של 100%. דרישות נוספות לבחירת הסמנים: מיקומם לכל אורכו של כרומוזום ה-X, יכולתם לעבוד יחד באותה ריאקציה ובאותם תנאים (טמפ' היצמדות), ושטווח גודל האללים שלהם אינו חופף, כך שלא יפריעו אחד לשני בקריאה. הסמנים קיבלו צבעים פלואורסנטים שונים (ירוק, צהוב וכחול) שיעזרו לקריאתם.

התהליך מתחיל במשלוח דגימת דם המשמשת להפקת דנ"א. לאחר מכן, משכפלים את מקטעי הדנ"א הספציפיים במכשיר PCR ומריצים את מקטעי הדנ"א על גבי ג'ל פוליאקרילאמיד במכשיר Sequencer, ולבסוף הג'ל עובר אנליזה על-פי קריאה פלואורוסנטית בעזרת תכנת מחשב. סוג הרקמה ממנו יופק הדנ"א חשוב מאוד, במקרה זה, מכיוון שרק בעזרת דנ"א מרקמה דמית נוכל לאתר כימריזם.

תוצאות

המחקר מציג ארבעה מקרים שונים: 2 מקרים של תאומים במושב היוגב (משק אמיר ודובדבני), שלישייה (קבוצת יבנה) ורביעייה (הבונים), תמונה 3). נמצא כי בכל המקרים, כל עשרת הצאצאים נמצאו כימרים. כל העגלות (2 העגלות מהיוגב, העגלה מקבוצת יבנה ו-3 העגלות מהבונים)