

## המשך מיפוי גנים המשפיעים על ייצור חלב וחלבון

אהוד ליפקין, גלינה חוטורצקיה, לנה צ'ורזינה, גילי גרוזמן, משה סולר, אדם פרידמן  
המחלקה לגנטיקה, האוניברסיטה העברית בירושלים  
אפרים עזרא, התאחדות מגדלי בקר

### מבוא

אחיד. אם יש קשר, אם הסמן נמצא על יד גן שמשפיע על התכונה, יהיה הבדל מובהק בין שתי קבוצות הקצה; אחד האללים של הפר יהיה נפוץ בפרות הטובות, ואילו השני יתרכז בנמוכות.

תוצאות התערובות מאומתות על ידי בדיקות פרטניות שוטפות (בדיקה פרטנית של חלק מהפרטים בתערובת), על ידי השוואה בין סמנים שכנים על אותו כרומוזום, ועל ידי השוואה לעבודות דומות בעולם. בשיטה זאת אפשר לקצץ בהוצאות המחקר והיישום פי מאה ויותר!

מלכתחילה היה ברור מאליה שהחלבון בחלב, מהיותו התכונה החשובה ביותר מבחינה כלכלית, הוא הנושא הראשון למיפוי. כיום אנחנו נמצאים בשלב השני של המחקר, לקראת השלב השלישי.

### שלב ראשון

בשלב הראשון בחרנו להתרכז באחוז חלבון בחלב, מכיוון שלתכונה זאת התורשתיות הגבוהה ביותר, מכאן ההשפעה הגנטית היחסית הרבה ביותר, ולכן הסיכוי הרב ביותר למצוא גנים המשפיעים עליה.

בסוף 1995 בחרנו שבעה פרים שהיו אז אבות ליותר מ-1800 פרות חולבות: בוטה, גולית, גנדי, מפי, פירט, פצפון ותמים. סידרנו את הבנות של כל פר בליגה לפי אומדן התורשה לאחוז החלבון. בתחילת 1996 אספנו 2300 דוגמאות חלב של הבנות שנכללו בקבוצות הקצה לאחוז החלבון (את הצמרת והתחתית של הליגה). הדוגמאות נאספו במהלך שקילות החלב הרגילות בעדרים הקיבוציים, עברו את הבדיקות הרגילות במעבדת החלב (אז עדיין בביתן אהרון), והמשיכו לירושלים. בירושלים הכנו תערובות לכל קצה, כאשר על סמך

בחודשים הקרובים עומד להסתיים פרויקט מגנט למיפוי גנים כמותיים (QTL) בגנום הבקר. הדיונים על מבצע המיפוי החלו בשנת 1995, והוא יצא לדרך בתחילת 1996. מטרת המחקר היא למפות גנים המשפיעים על תכונות חשובות כלכלית ("תכונות משקיות"). מיפוי כזה יכול לאפשר בחירה של פרים, עגלים ועתודות מוקדמת יותר, מושכלת יותר, מדויקת יותר, וחסכונית יותר, מאשר זאת הנהוגה כיום.

הקושי העיקרי במיפוי גנים המשפיעים על תכונות משקיות הוא בכך, שאלה תכונות כמותיות. תכונות כאלה מושפעות מהרבה גנים, ובמידה משמעותית מהסביבה. קשה להבדיל בין השפעת הגנים להשפעת הסביבה (האם הפרה טובה בגלל שהרפתן טוב? או בגלל שהגנים טובים?), וקשה להבחין בין השפעה של גן אחד למשנהו. בגלל מורכבות התכונות המדוברות פותחו בעולם שיטות שונות למיפוי גנים כמותיים המשפיעים עליהן. השיטה שאנו משתמשים בה, "תערובת חלב של קבוצות קצה", פותחה על ידנו במעבדת ירושלים. בשיטה זאת אנחנו מכינים ליגה של כל בנות הפר, אוספים חלב מהבנות המצויות בצמרת או בתחתית של הליגה, מכינים תערובת לכל קצה, ובדקים את התערובת עם סמנים גנטיים, מיקרוסְטְלִיטִים. בשיטה מקורית {ליפקין וחובריו, 1995, 1997, 1998} אנו מקבלים אומדנים של שכיחות האללים של הפר בשתי קבוצות הקצה של בנותיו. אנחנו משווים את פיזור האללים של הפר בשתי קבוצות הקצה: אם אין קשר בין הסמן לתכונה, יהיה פיזור

שכן.

**לימוד גודל האפקטים הכלליים** נחוץ מסיבה המוכרת לכל רפתן, המתאם הקיים בין תכונות הייצור השונות. ככל שעולה כמות החלב, יורד הריכוז (יותר חלב, פחות אחוזי חלבון ושומן). לפני שאנחנו בוחרים בני פר לפי האלל שנמצא קשור בעליה באחוז החלבון, כדאי לוודא שלא מדובר גם בנפילה גדולה מדי של כמות החלב. כדי ללמוד על כל האפקטים הקשורים לחלבון בחלב, אספנו בשלב השני קבוצות קצה גם לק"ג חלבון ולק"ג חלב. במילים אחרות, כל התכונות הקשורות לחלבון בחלב.

בקיץ 1998 אספנו 6500 דוגמאות חלב של בנות פרים השייכות לקבוצות הקצה של האחוז וק"ג חלבון, וק"ג חלב. הפרות היו בנות לעשרה פרים, אבות לכל הפחות לאלפיים בנות חולבות: בוטח, טבע, מפוי, סינבד, סיר, סף, ספורט, פירט, פלור ותמים (ארבעה מהם היו גם במדגם הראשון). כיום אנחנו נמצאים בשלב מתקדם של בדיקת התערובות משני השלבים, באזורים שזוהו בשלב הראשון.

### תוצאות שני השלבים

עד היום בוצעו 1887 מבחני פר-סמן-תכונה, 300 מבחני סמן-תכונה, 59 מבחני כרומוזום-תכונה. סף המובהקות של 5% שחושב לסריקה של גנום שלם היה, בהתאמה, 0.005 0.020, 0.040. שימו לב, אם היינו קובעים סף נומינלי של 5%, היינו מקבלים 94 מבחנים מובהקים במקרה, אפילו אם אין כלל גנים כמותיים בסביבה! כדי לקבל סף מובהקות של 5% לניסוי כולו, יש לקבוע סף של חצי אחוז לכל מבחן פר.

באזורים 1-3 מוצגות התוצאות בשלוש התכונות. נמצאו 183 מבחנים מובהקים ברמת ניסוי של פר-סמן-תכונה, 120 מבחנים מובהקים לסמן-תכונה, 47 מבחנים מובהקים לכרומוזום-תכונה. לפי ההגדרה המדויקת של FDR, 5% מתוך המבחנים המובהקים האלה מייצגים אזעקות שוא; כלומר, התוצאות של 18 ממבחני הפרים, 6 ממבחני הסמנים, 2 מבחני כרומוזומים, היו מקריות. זאת אי-ודאות שאין

ספירות התאים נלקחה מכל פרה כמות שווה של תאים. את התערובות בדקנו בסמנים גנטיים, מיקרוסטטליטים, המפוזרים על פני כל גנום הבקר.

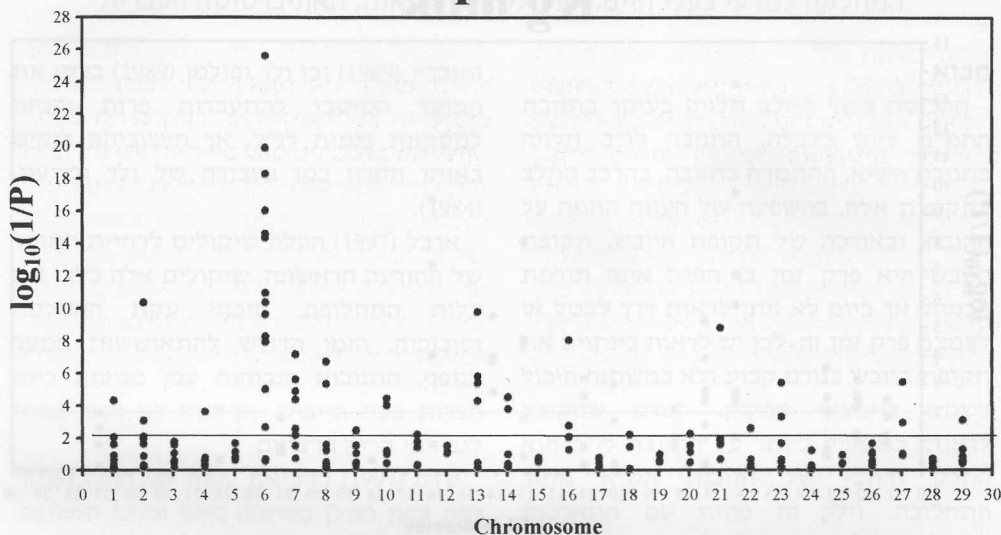
### שלב שני

השלב השני נועד לאמת את התוצאות של השלב הראשון, ולאפשר לימוד של האפקטים הכלליים של האתרים שנמצאו בשלב הראשון. **אימות התוצאות** חיוני, כיוון שמדובר במחקר הכולל מספר רב של מבחנים סטטיסטיים. צריך לזכור, כי החלטה במבחן סטטיסטי אינה החלטה הותכת (כן או לא), אלא מתקבלת על סמך סבירות מסויימת. השאלה היא, מה הסבירות לקבל במקרה תוצאה מסויימת באוכלוסיה בעלת ממוצע ושונות מסויימים. במקרה שלנו השאלה היא, האם ההפרש בין קבוצות הקצה בשכיחות האללים של הפר הוא מקרי? בניסוי בודד מקובל, כי אם הסבירות לקבל הפרש כזה פחותה מ-5%, התשובה תהיה: לא, ההפרש אינו מקרי, יש בסביבה גן שגורם לו. החלטה כזאת מביאה בחשבון, כי במקרים נדירים אנחנו טועים, ובכל זאת ההפרש היה מקרי. כאמור, מדובר בסבירויות, ולקייחת סיכון מחושב (לא גדול!) היא בלתי נמנעת. המצב משתנה כאשר מדובר בריבוי מבחנים; כאן הטעות הנדירה הופכת בלתי נמנעת. למשל, מאלף מבחנים נקבל **במקרה** 50 (!) מבחנים מובהקים ברמה של 5%. חשוב להדגיש, כי זאת בעיה מובנית בכל מערכת מרובת מבחנים, בכל סריקה של גנום שלם, ולא דוקא בניסוי הנוכחי.

טיפולנו בבעיה של ריבוי המבחנים על ידי הוספת משפחות פרים והוספת סמנים סביב לאזורים שנמצאו בשלב הראשון, ועל ידי חישוב סף מובהקות מחמיר, שיאפשר מובהקות כללית של 5% לניסוי כולו, ולא לכל מבחן לחוד. החישוב בוצע בשיטת FDR לפי ולר וחובריו (1998). בשיטה זאת מחושב "שיעור הגילוי השגוי" (False Discovery Rate): איזה אחוז מבין התוצאות המובהקות הוא למעשה אזעקות שוא, מקרה, לא תוצאה של גן

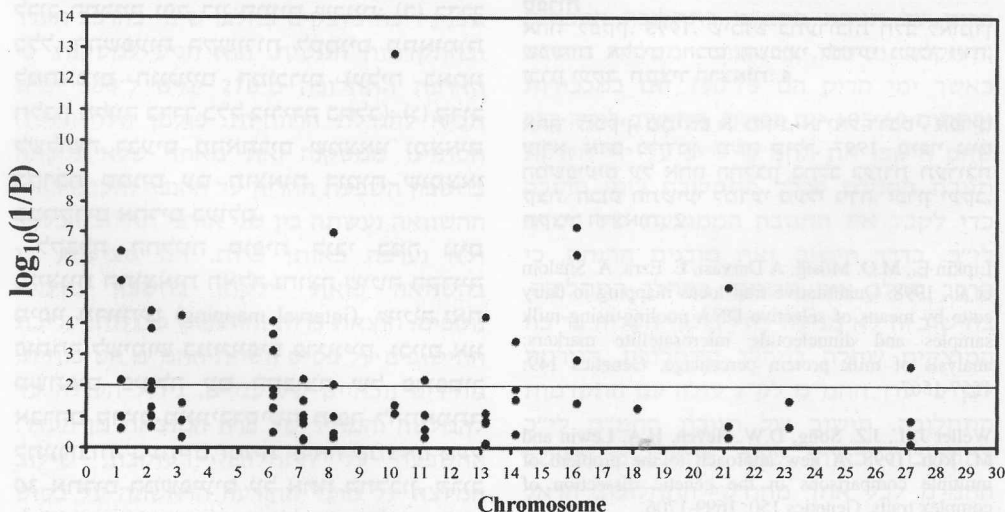
איור 1. תוצאות המיפוי לאחוז חלבון. כל נקודה היא מבחן סמן, כולל כל הפרים שהיו הטרוזיגוטים באותו סמן. בציר ה-X מוצגים 29 הכרומוזומים האוטוזומים של הבקר, ובציר ה-Y המובהקות. הקו הרצוף הוא סף המובהקות המחושב של 5%.

### % protein

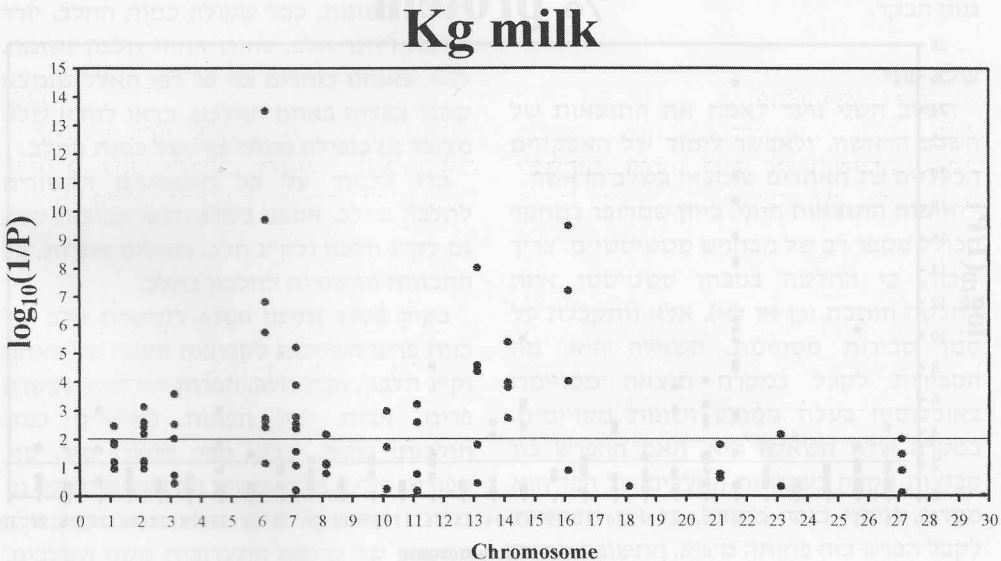


איור 2. תוצאות המיפוי ל"ק"ג חלבון. כל נקודה היא מבחן סמן, כולל כל הפרים שהיו הטרוזיגוטים באותו סמן. בציר ה-X מוצגים 29 הכרומוזומים האוטוזומים של הבקר, ובציר ה-Y המובהקות. הקו הרצוף הוא סף המובהקות המחושב של 5%.

### Kg protein



איור 3. תוצאות המיפוי ק"ג חלב. כל נקודה היא מבחן סמן, כולל כל הפרים שהיו הטרוזיגוטים באותו סמן. בציר ה-X מוצגים 29 הכרומוזומים האוטוזומים של הבקר, ובציר ה-Y המובהקות. הקו הרצוף הוא סף המובהקות המחושב של 5%.



20 אתרים המשפיעים על ק"ג חלב (המילה "אתרים" באה לציין שאיננו יודעים בכמה גנים מדובר). האתרים המשפיעים על אחוז החלבון מסבירים את רוב השונות הגנטית המתגלית בעדר הישראלי.

#### ספרות

אהוד לפקין, 1995. שימוש בתערובות חלב לאומדן שכיחות אללים. הכנס השביעי למדעי מעלי גירה, זכרון יעקב, תקציר הרצאות: 4.

אהוד ליפקין, מתיאס א. מוויג, אריאל דרבסי, אפרים עזרא, אדם פרידמן, משה סולר. 1997. מיפוי גנים המשפיעים על אחוז החלבון בחלב בעזרת תערובת קצה. הכנס התשיעי למדעי מעלי גירה, זכרון יעקב, תקציר הרצאות: 2.

Lipkin E., M.O. Mosig, A Darvasi, E. Ezra, A. Shalom et al., 1998. Quantitative trait locus mapping in dairy cattle by means of selective DNA pooling using milk samples and dinucleotide microsatellite markers: analysis of milk protein percentage. *Genetics* 149: 1557-1567.

Weller J. I., J.Z. Song, D.W. Heyen, H.A. Lewin and M. Ron. 1998. A new approach to the problem of multiple comparisons in the genetic dissection of complex traits. *Genetics* 150: 1699-1706.

להתחמק ממנה, תולדה של ריבוי מבחנים, והיא אינה ייחודית לשיטה שלנו. כאמור, אפשר להקטין את אי-הוודאות בדרכים שונות, כמו, למשל, השוואה בין סמנים שכנים, בין ההשפעות על התכונות השונות, והשוואה לעבודות מיפוי אחרות בעולם. ואכן, (א) מצאנו לרוב הסכמה יפה בין סמנים שכנים; (ב) בדרך כלל, ההשפעות הקשורות לסמנים מתאימות למתאמים הגנטיים המוכרים (עליה באחוז חלבון מלווה בדרך כלל בירידה בחלב); (ג) קרוב לשלושה רבעים מהאתרים שמצאנו נמצאים בקרבת סמנים עם תוצאות דומות שנמצאו במחקרים אחרים בעולם.

לקבלת החלטה סופית לגבי כמה גנים מייצגות התוצאות האלה נחוצה שיטה הקרויה מיפוי מרווחים (interval mapping). שיטה זאת פותחה לשימוש בגנוטיפים פרטניים, וכיום אנו משתפים פעולה עם הקבוצה של פרופסור אברהם קורול מאוניברסיטת חיפה להתאמתה לתערובות. בינתיים, זמנית, נראה שמצאנו מעל 30 אתרים המשפיעים על אחוז החלבון, קרוב ל-20 אתרים המשפיעים על ק"ג חלבון, ומעל