

20.06.2025

דו"ח מדעי מסכם לתכנית מחקר של מועצת החלב (3620738)

**יישום מבחן גנטי לעמידות לסקרייפי בכבשים לצורך מינוף הטיפוח הלאומי ומיגור המחלה
בישראל**

חוקר ראשי: ד"ר חי דביר, המחלקה לחקר בקר וצאן, מכון וולקני

חוקרים נוספים: ד"ר אנדרי שיראק, המחלקה לחקר בקר וצאן, מכון וולקני
גב' מירב כוהן, המחלקה לחקר בקר וצאן, מכון וולקני
ד"ר איל סרוסי, המחלקה לחקר בקר וצאן, מכון וולקני
מר אלכס רוזוב, המחלקה לחקר בקר וצאן, מכון וולקני

תקציר

סקרייפי הינה מחלה עצבית מדבקת וקטלנית בכבשים הנובעת מקיפול לא תקין של חלבון הפריון. הנטייה לשינויי קונפורמציה הרגישים או העמידים לקיפול פגום של PrP נמצאה קשורה לפולימורפיזם טבעי ברצף חומצות האמינו שלו. האלל שמקנה את העמידות הגבוהה ביותר הוא (ARR) A136, R154, R171. שכיחותו של אלל זה בגזעי האוואסי המקומי, המשופר והאסף היא 10%, 5% ו-6%, בהתאמה. עבודות קודמות ומדגם של כ-370 פרטים שנערך במסגרת מחקר זה בשלושה עדרים, נמצא שהאלל המכיל V136 הוא נדיר מאוד, ולעומתו Q171, המקנה רגישות לסקרייפי נמצא מאוד שכיח בארץ. בהתאם לכך, המחקר הנדון עסק בפיתוח שיטה מולקולרית יעילה לבדיקות גנוטיפ לסקרייפי בכבשים במיקוד על העמדה 171, כדי לאפשר זיהוי וסלקציה של פרטים עמידים לצורך מיגור המחלה בישראל.

תחילה נערכה השוואה ביעילות הפקת DNA מרקמות דם, צמר, ותאי אפיתל פה שנאספו בעזרת מטוש. נמצא שדגימות דם מיובשות על נייר סופג הן המקור היעיל ביותר להפקת DNA לצורכי אנליזות PCR וריצוף סנגר. בשלב הבא הושוותה היעילות בקביעת הגנוטיפ ע"י שלוש שיטות, רצוף סנגר, הגברת אלל ספציפי (ASA), ואנליזת התכה ברזולוציה גבוהה (HRM). ASA נפסלה בשלבים ראשוניים לאור בעיות טכניות הקשורות באנליזת ג'ל אלקטרופורזה ברזולוציה גבוהה. ריצוף סנגר הראה דיוק גבוהה יותר (97.7% הצלחה), לעומת הצלחה של כ-83% בשיטת HRM. אולם, קביעה באמצעות HRM מהירה וכלכלית יותר, ולכן מתאימה לסריקת אוכלוסיות גדולות.

מבוא

סקרייפי הינה מחלה נויורולוגית מדבקת בכבשים הנובעת מקיפול לא תקין של חלבון הפריון (Prion protein - PrP). כפי המתרחש במחלות פריון אחרות, חשיפה של פרטים לחלבון פגום כזה גוררת תגובת שרשרת בחלבוני PrP תקינים במוח ולשקיעה בלתי הפיכה שלהם כאגרגט סיבי המוביל להרס תאים וניוון עצבי (1). הנטייה לשינויי קונפורמציה רגישים או עמידים לקיפול פגום של PrP נמצאה קשורה לפולימורפיזם טבעי ברצף חומצות האמינו שלו. בעוד שהגנוטיפ V136, H154, Q171 הינו בעל הנטייה הגבוהה להתפתחות המחלה, האלל שמקנה את העמידות הגבוהה ביותר הוא (ARR) A136, R154, R171 (2). שכיחותו של אלל זה בגזעי האוואסי המקומי, המשופר והאסף בישראל היא 10%, 5% ו-6%, בהתאמה (3). לפולימורפיזם בעמדות 136 ו-171 יש את האפקט החזק ביותר על הרגישות למחלה. בישראל, האלל המכיל V136 הוא נדיר מאוד, אולם גם שיעור האלל המקודד ל-R171 נמוך, ולכן המחלה נפוצה בארץ. לפיכך, כדי להגביר העמידות לסקרייפי באוכלוסיית הכבשים בישראל, ניתן באופן מעשי למקד הטיפוח בהעשרת האלל המקודד ל-R171, כיוון שהאלל הכולל A136 הוא שכיח ממלא, שכן תדירות האלל ARQ בגזעים האמורים היא 74%, 78% ,86% בהתאמה (3).

הממצא המעודד הוא שלא אלל ARR אפקט דומיננטי, שכן פרטים הטרוזיגוטיים עם הגנוטיפ ההפלואידי ARQ/ARR נמצאו עמידים למדי לסקרייפי (4). לכן האסטרטגיה של שימוש באילים הומוזיגוטיים (ARR/ARR) בתכנית הרבייה בעדר היא בעלת פוטנציאל למיגור המחלה גם בעדרים ששכיחות האלל ARR נמוך בקרב האימהות.

טיפול כזה מצריך הכלאות מכוונות מחד, ומאיךר בדיקות גנוטיפ של צאצאים כדי לכוון הסלקציה ולשפר את יעילותה. תכניות בין לאומיות לבדיקות גנוטיפ לסקרייפי הביאו להפחתה משמעותית של תפוצת המחלה באירופה ובארה"ב, אולם לצערנו אלה לא היו מספיק זמינות למגדלים בארץ. לפני מספר שנים החלה בעדר וולקני תכנית טיפוח לעמידות לסקרייפי במטרה להעשיר את האלל ARR. התכנית הושתתה על בדיקות שהתבצעו בחו"ל על בסיס מחקר. בעוד שהתכנית התקדמה יפה בעדר וולקני, שיעור האלל בכלל אוכלוסיית הכבשים בארץ לא גדל באופן משמעותי, כאמור בעיקר בשל היעדר נגישות לבדיקות גנוטיפ בישראל.

כדי להתגבר על חסם טכנולוגי זה, המחקר המוצע כאן עוסק בביסוס שיטה מולקולרית לבדיקות גנוטיפ לסקרייפי בכבשים במכון וולקני. יעילות התגברות החסם תלויה בשיטות לאיסוף דגימות ביולוגיות ובפרוטוקולים להפקת דנ"א, וכן בעלות השיטה אל מול תועלתה. כיוון שהעלויות לקביעת גנוטיפ בשיטות ריצוף דנ"א גבוהות יחסית, אנו נבחן התאמתם של שיטות אחרות. שיטה אלטרנטיבית נפוצה וכלכלית יותר, שאגב מיושמת כיום בענף לטיפול ולדנות גבוהה ע"י זיהוי מוטציית הבורולה, עושה שימוש בטכנולוגית התכה ברזולוציה גבוהה, High-

Real Time PCR, resolution Melting (HRM), ומכשור לסינתזה וכימות דנ"א בזמן אמת, (5). שיטה אלטרנטיבית פחות מהירה לזיהוי גנוטיפי מבוססת על הגברת אלל ספציפי, allele specific amplification (ASA) (6), נמצאת בשימוש נרחב ושמשה גם במעבדה שלנו לקביעת זוויג במספר מינים של דגים. המחקר שמתואר כאן בחן את התאמת שתי הגישות הללו לאבחון גנוטיפי של סקריופי, אל מול שיטת ריצוף סנגר, במטרה לאתר שיטה יעילה ואפקטיבית שתנגש לכלל המגדלים בארץ לצורך מינוף הטיפול הלאומי ומיגור המחלה בישראל.

מטרות המחקר

מטרה 1: בדיקת שיטות לאיסוף והפקת דנ"א ובחירת שיטה מתאימה מבינת אמינות, יעלות ומהירות הביצוע.

מטרה 2: קביעת הפולימורפיזם ברצף גן הפריון בעזרת ריצוף כדי לאפשר תכנון שיטה איתנה לקביעת העמידות לסקריופי באוכלוסיית היעד – גזעי אסף ומרינו הנפוצים ביותר בישראל.

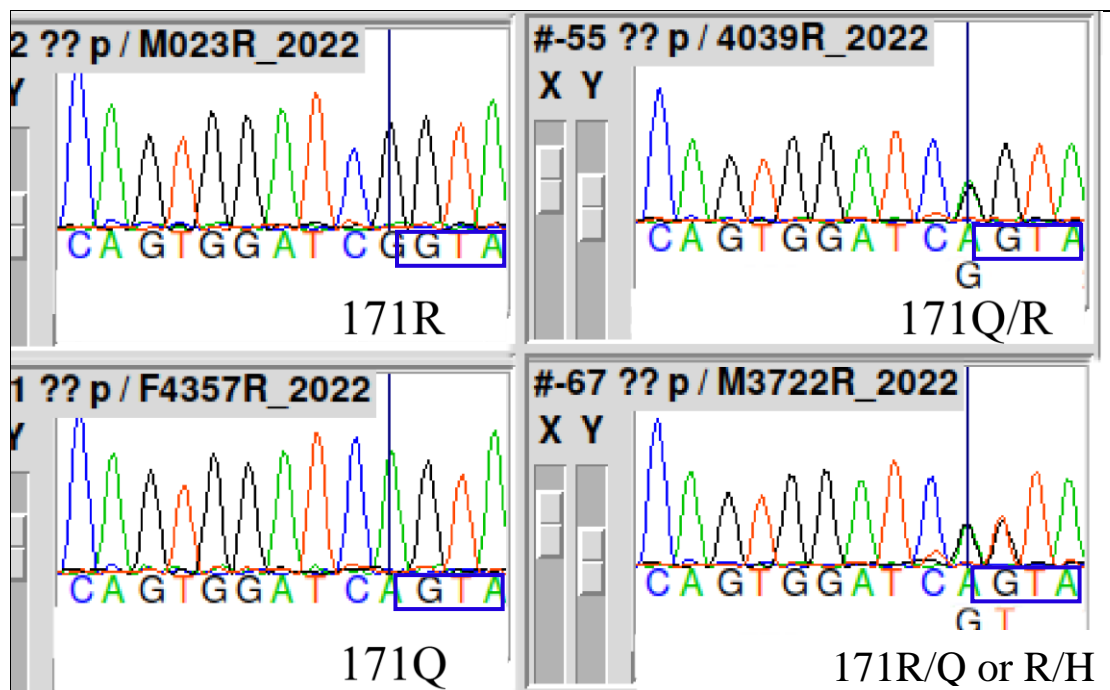
מטרה 3: ביסוס שיטות מולקולריות כלכליות לקביעת גנוטיפ העמידות לסקריופי קלאסי בכבשים: השוואת ריצוף סנגר, הגברת אלל ספציפי (ASA) ואנליזות התכה ברזולוציה גבוהה (HRM).

תוצאות ודין

1. השוואת כמות ואיכות דנ"א לאחר ההפקה בהתאם לסוג הרקמה בחנו יעילות של דיגום והפקת דנ"א משלוש רקמות: דם, רירית של חלל הפה ושיער. לצורך הפקת דנ"א מדם כ-3 טיפות דם יובשו על נייר סופג. דגימת רירית התבצעה ע"י חיכוך מטוש בחניכיים. שיער נאסף בשיטה של תלישה בפינצטה או ע"י הדבקה בסרט דביק. כבר בשלב העברת שערות למבחנות הפקה התגלו קשיים טכניים הקשורים להורדת שערות דקות מהסרט הדביק וסיכוי לא מבוטל לזיהום הדדי בין הדגימות בשלב חיתוך קצוות של השערות. נייר עם דם מיובש, קצה של מטוש וקצוות של שערות נאספו מכל אחד מ-6 פרטים ודנ"א הופק בעזרת ערכה ייעודית GeneAll-GeneEx Tissue. כמות ממוצעת גדולה של דנ"א התקבלה בהפקות מהדם. העבודה עם דם מיובש על נייר לפני יישום פרוטוקול ההפקה נמצאה כפשוטה ביותר, והפחיתה הסיכוי לזיהום הדדי בין דגימות.

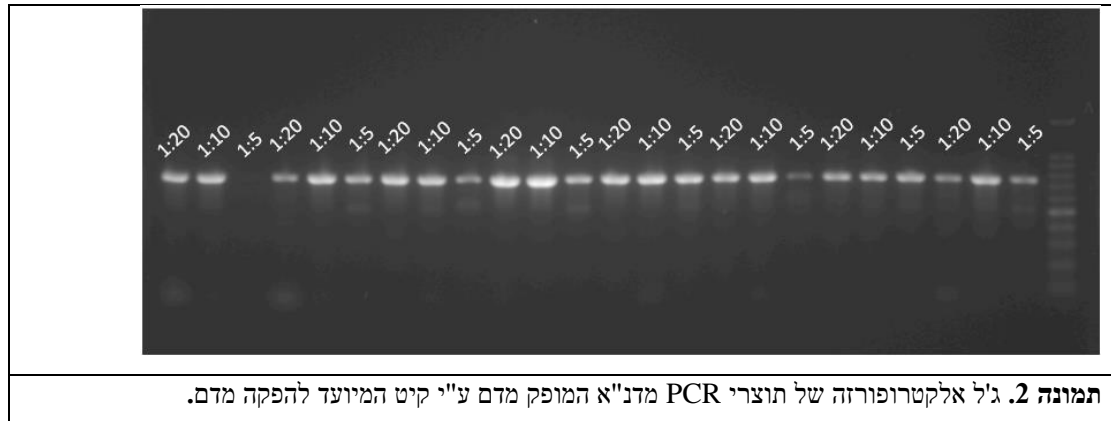
2. אמפליפיקציה באמצעות PCR של הגן ל-PrP (PRNP) לריצוף הדנ"א לזיהוי פולימורפיזם

זוג פריימרים (oaScF ו- oaScR) תוכננו לאקסון הראשון של PRNP (ראה טבלה מס' 1) שמעלה מקטע דנ"א בגודל של כ-780 בסיסים של המקודד לפולימורפיזם הקשור בסקרייפי (V/A136, H/R154, Q/R171). תוצרי ה-PCR הופרדו בג'ל אלקטרופורזה בריכוז 1.5% אגרוז. תוצרי PCR עברו ניקוי מג'ל ורצף הדנ"א נקבע לכל דוגמה בעזרת הפריימר oaScR. הרצפים עברו אנליזה ונמצאו ברוב המקרים בתוך רצף 780 בסיסים רק שני בסיסים פולימורפיים (תמונה מס' 1) – בסיס שני ושלישי בקודון 171. בסיס שני בקודון 171 מחליף חומצה אמינית בחלבון (מ-R ל-Q) וקשור לרגישות למחלת סקרייפי, מאידך בסיס שלישי בקודון 171 אינו מחליף את החומצה האמינית R, אך כן מחליף Q ל-H, וללא אפקט משמעותי בעמידות לסקרייפי. מסתמן כי שונות בבסיס שלישי של קודון 171 נפוצה יותר בגזע האוסי פחות באספ. למרות חוסר הקשר בעמדה שלישית למחלה, המידע על שונות בבסיס זה חשוב מבחינה טכנית לפיתוח מבחן עתידי שיתאים לשלל גזעי הכבשים בארץ.



תמונה מס' 1. פולימורפיזם בעמדה שנייה ושלישית בקודון 171 ברצף האקסון ראשון של PRNP. עמדה שנייה בקודון 171 הקשורה למחלה (מסומנת גם קו אנוכי) נמצאו פרטים עם כל שלושת הגנוטיפים אפשריים – G/G (הומוזיגוט עמיד למחלה), A/A (הומוזיגוט רגיש למחלה) ו-A/G (הטרוזיגוט די עמיד למחלה). בעמדה שלישית בקודון 171 גנוטיפ G/G נמצא ב-18 מתוך 20 פרטים ורק בשני פרטים נקבע מצב הטרוזיגוטי (G/T) כמו באיור התחתון-ימני.

3. התייעלות בהכנת DNA המופק מדם לתגובת ריאקציית PCR או HRM דם נדגם מ 8 פרטים, ודנ"א הופק מדוגמאות אלה באמצעות שימוש בקיט הפקה ייעודי לרקמת דם (GeneAll-GeneEx Tissue) על פי הוראות היצרן. יצרנו שלושה דילולים (1:10, 1:5, 1:20), של DNA מ-8 הפרטים ללא מדידת כמות. DNA מצאנו שדילול של 1:10 מעניק אמפליפיקציה אופטימלית שכן בכל אחת מהריאקציות ישנו תוצר (תמונה 2). שיטת דילול זו נבחרה להמשך הניסויים לאופטימיזציה של אנליזת HRM.



4. התמקדות בחומצה אמינית 171 בגן PRNP במדגם של כ-370 פרטים, שנעשה בעדר ישראלי במסגרת המחקר, בשיטת סנגר התגלתה מוטציה בעמדה 171, המחליפה חומצה אמינית R (עמידות למחלת סקרייפי) ל-Q (רגישות למחלה). השכיחות של החלפה זאת היא כ-91% מכלל ההחלפות בשלוש עמדות קריטיות (136, 154 ו-171) בגן PRNP, שמשפיעות על התנגודת למחלה. לכן, התברר שמבחן HRM, המתמקד רק בנוקלאוטיד אחד, מתאים לרוב המקרים בעדר הישראלי, ויכול להתחרות עם שיטת סנגר לזיהוי סקרייפי.

5. פיתוח מבחן ASA לקביעת גנוטיפ לסקרייפי בעמדה 171 שלושה פריימרים תוכננו לאמפליפיקציה ספציפית של האזור הפולימורפי בדנ"א לפי עקרונות שיטת ASA (7), כאשר פריימר אחד מתאים לאזור א-פולימורפי (ScrF1 בטבלה 1) והאחרים (reverse primers) דורכים על נקודת פולימורפיזם. כיוון שקיימות 2 נקודות פולימורפיזם (עמדות שניה ושלישית בקודון 171), תוכנן פריימר אחד לאלל עמיד למחלה (ScrRres) ושני פריימרים לאלל רגיש למחלה (ScrRsens1&2) (טבלה 1). בנוסף, בוצעו שני שינויים נוספים ב- reverse primers: (1) הוחלף בסיס אחד (A ל-T) להגדלת ספציפיות של פריימרים, (2) נוסף זנב של 20 בסיסים לשני פריימרים המתאימים לאללים רגישים למחלה כך שגודל המקטעים שיתקבלו בריאקציית PCR יהיה שונה, וניתן יהיה לזהותם באמצעות נדידה מובדלת בג'ל אגרוז סטנדרטי. בסדרת ניסויי כיוול נמצאה טמפרטורת הצמדת פריימרים אופטימלית של

C⁶⁵ להגברה ספציפית של אללים רגישים ולא רגישים. בנוסף, התברר שמספיק שימוש רק בסמן ScrRsens2 כדי לעלות כל אחד משני הווריאנטים של האלל הרגיש. שיטה זו דורשת הרצה ארוכה במיוחד בג'ל צפוף (3.5%) ולעיתים מובילה לארטיפקטים בעוצמות הצביעה של הבנדים והפרעות נדידה נוספות שנובעות מיציקה של הג'ל (תמונה מס' 3). לאור היעילות הנמוכה כפי שהתגלה בשלב זה, השיטה נזנחה להמשך פיתוח פרוטוקול לקביעת רגישות לסקרייפי.

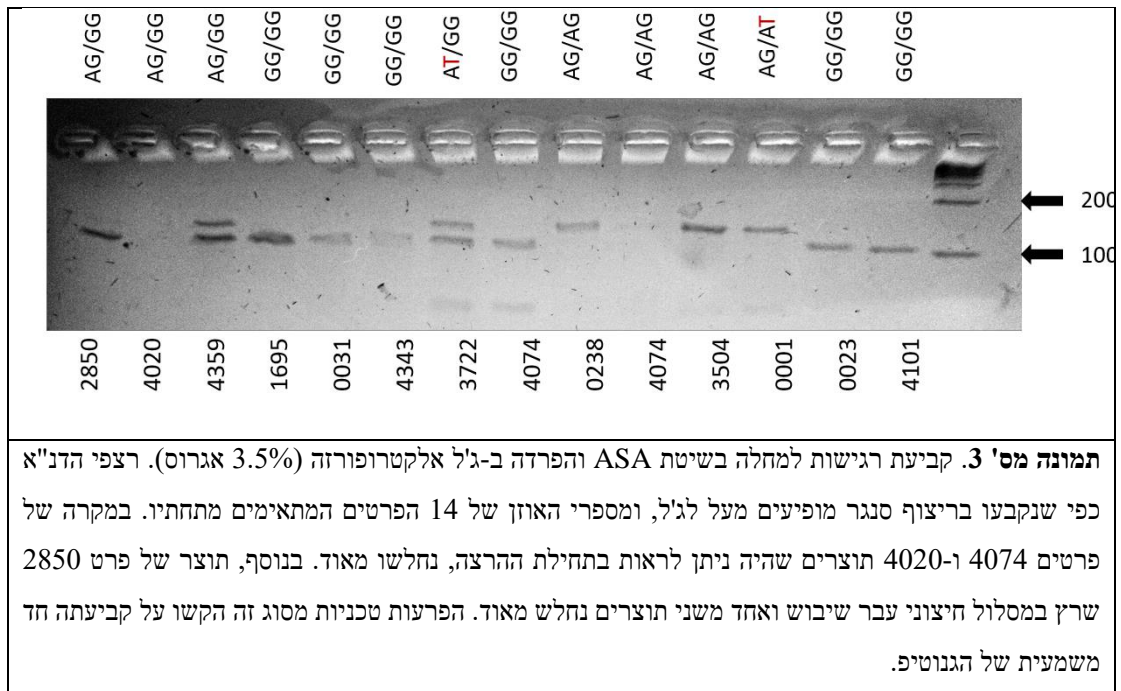
טבלה 1. פריימרים שפותחו ומטרתם במחקר

Name	Sequence	Use	Additional use
oaScF & oaScR	AAAGCCACATAGGCAGTTG AATGAGGAAAGAGATGAGGAG	Amplification of <i>PRNP</i> first exon (780bp)	Sequencing of 780bp fragment
ScrF1	CAATGACTATGAGGACCGTTACTA	Universal for ASA	HRM
ScrRres	CACAAAGTTGTTCTGGTTACAATAACC	Amplification resistant allele in ASA (110bp)	HRM
ScrRsens1	TTTGTTTTGTTTTGTTTTGCACAAAG TTGTTCTGGTTACAATAACT	Amplification sensitive allele in ASA (130bp)	
ScrRsens2	TTTGTTTTGTTTTGTTTTGCACAAAG TTGTTCTGGTTACAATAAAT	Amplification sensitive Awassi type allele in ASA (130bp)	HRM
HRM60F	AGTGTACTACAGACCAGTGG	Amplification of a short amplicon (60 bp)	HRM
HRM60R	ACACAGTCATGCACAAAGTT	Amplification of a short amplicon (60 bp)	HRM

בכחול מסומנים הנוקלאוטידים הספציפיים (שני ושלישי) בקודון 171.

בירוק מסומן קודון 172 לא פולימורפי.

בצהוב מסומן נוקלאוטיד לא תואם לרצף שהוכנס על מנת להנמיך טמפ' ההתכה.



6. ייעול קביעת גנוטיפ בשיטת סנגר, המשמשת כשיטת ייחוס ל HRM כדי ליעל הפרוטוקול מבחינת עלות, צריכת זמן ודיוק לקביעת הגנוטיפ בגן PRNP ביצענו סדרת ניסויים לקביעת גנוטיפ בשיטת סנגר. הפרוטוקול מכוון למקטע בו נמצאות המוטציות הקריטיות לרגישות למחלת הסקרייפי. שיטת סנגר אפשרה לזהות שינוי נוסף בקודון 171, המקשה על קביעת הגנוטיפ בשיטת HRM. אולם, שינוי זה נפוץ מאוד בגזע אוואסי ונדיר או לא קיים בגזעים אחרים.

פיתחנו פרוטוקול לאיסוף רקמה המתאים לתנאי שדה, להעברת דגימות מהדיר למעבדה תוך כדי זיהום מינימלי ולצמצום משך הזמן של ההכנת הדגימה להפקת הדנ"א, וכן ממזער פגיעה ברווחת החיה. הפרוטוקול מבוסס על הקזת טיפת דם ויבוש הדם על נייר סופג. דם מיובש על נייר מאפשר להפיק דנ"א כמו מכל רקמה מוצקה אחרת, ללא שלבי ההפחתה של תאי דם אדומים הדרושים בהפקה מדם נוזלי. לצורך הפקת דנ"א השתמשנו בקיט מהיר ויחסית כלכלי של חברת GENEALL BIOTECH (KOREA). קיט זה שייך לקבוצת קיטים תלת שלביים (עיכול ראשוני בפרוטאינאז K, השקעת בלתי מסיסים בסרכוז והשקעת דנ"א מהנוזל העליון בעזרת איזופרופנול). בידוד דנ"א בעזרת הקיט זה הניבה אחידות גבוהה בכמות ואיכות הדנ"א המופק מהדוגמה. כמו כן, השיטה מאפשרת הפקה בהיקפים גדולים לרבות הפקה בפלטות של 96 דוגמאות, ומתאימה לשתי השיטות (סנגר ו HRM). חישוב עלות חומרים בהפקת דנ"א מדם מיובש בפורמט פלטות 96 מקומות מפורט בטבלה 2.

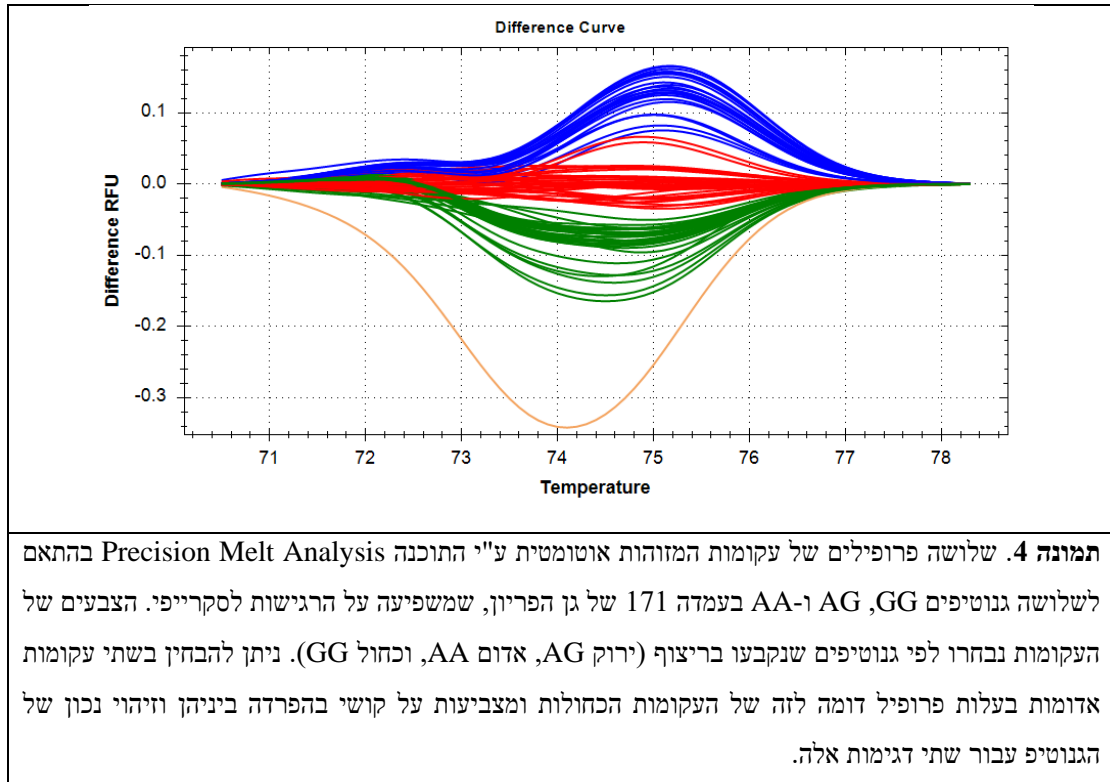
בסדרת ניסויים נמצא שדילול דנ"א שהומס בנפח סופי של 30 µl הוא קריטי להצלחת ה-PCR ללא תלות בריכוז דנ"א, ככל הנראה בשל הצורך לדלל מעכבי ריאקציית PCR. יחס הדילול

האופטימלי היה בין 1:10 ל 1:20, ונפח של $1 \mu\text{m}$ דנ"א מדולל הספיק להגברת PCR. לטובת שיטת סנגר, השתמשנו בקיט PCR של חברת BIORAD. התגובה בוצעה בנפח $30 \mu\text{m}$ כאשר $10 \mu\text{m}$ מתוכם השתמשנו בהרצה אלקטרופורטית לצורך בקרת הצלחה של תגובת PCR. תוצרי התגובה הופרדו בג'ל אגרוז 1.5%. בעיבוד של כ- 200 תוצרי PCR לריצוף הגענו להצלחה של 97.5% בהגברת ה-PCR באיכות הדרושה לריצוף. הריצוף בוצע בחברת MACROGEN ההולנדית בתיווך חברת SYNTEZZA הישראלית. מתוך 200 התוצרים, נשלחו לריצוף 190 והגנוטיפ נקבע בהצלחה ל- 186 מהדגימות (97.9%).

7. ייעול קביעת גנוטיפ בשיטת HRM

לייעול שיטת HRM נבחרו פריימרים המגבירים תוצרי PCR באורכים שונים 70, 110, 120 ו- 60 זוגות בסיסים. מדגם של 12 דגימות דנ"א עם גנוטיפים ידועים (שנקבעו בשיטת סנגר) נבחנו במכשיר Real-Time PCR system "CFX Duet", שמיוצג בישראל ע"י חברת BIORAD. ריאקציות HRM בוצעו באמצעות קיט Precision Melt Supermix (BIORAD) ועם 4 זוגות פריימרים שונים. הפרוטוקול הבסיסי של התוכנה CFX Maestro הותאם לתגובת PCR ע"י הוספת 10 מחזורי שכפול (מ-40 ל-50 cycles) והעלאת טמפרטורת הצמדה מ- 58 ל- 60 מעלות צלזיוס. התוכנה לאנליזה אוטומטית (Precision Melt Analysis v.3) שימשה לזיהוי פרופילים שונים של עקומות ההתכה וקביעת חלון טמפרטורות עם הפרדה מקסימלית (תמונה 4). צמד הפריימרים (F ו-R הם AGTGACTACAGACCAGTGGA ו- ACACAGTCATGCACAAAGTTG בהתאמה) המתאים לתוצר של 60 בסיסים נבחר כמוצלח ביותר מבין ארבעת הנבחים.

תנאי T_m לחלונות קריאה $70.0-70^\circ\text{C}$ (pre-melt range) ו- $78.3-78.8^\circ\text{C}$ (post-melt range), פרמטרים היעילים ביותר לרגישות וסף ההבדלים נקבעו ונשמרו במחשב האנליזה לכל אנליזות הבאות. קביעת גנוטיפ בשיטת HRM אינה בהתאמה מלאה לקביעת גנוטיפ בשיטת סנגר (תמונה 1). לצורך הגברת הדיוק בקביעת הגנוטיפ של דוגמאות חדשות, הוחלט על ביצוע בטריפליקטים.



8. קביעת יעילות הפרוטוקול בשיטת HRM
 בניסוי של 84 דגימות, שנבחנו בטריפליקטים, בפרוטוקול הסופי של שיטת HRM, נקבע גנוטיפ ל- 78 פרטים (92.9%). 70 מדגימות אלה נקבעו בהצלחה בהשוואה לתוצאות שהתקבלו בשיטת סנגר עבור מדגם זה. כך שניתן להעריך את אחוז ההצלחה בשיטת ה- HRM בכ- 83% (70/84). לא נמצאה סיבה ספציפית לכישלון ב- 15% מהדוגמאות.

9. השוואת עלויות והיתרונות של שתי השיטות
 כיוון ששלב ראשון, הפקת דנ"א, הוא אחיד לשתי השיטות ההשוואה בוצעה רק משלב ה-PCR. PCR system "CFX Duet" TimePCR היא חלק ממכשור של מכון ולקני ולא דורש שירות חיצוני כפי שנדרש במקרה של ריצוף סנגר, לכן ניתן לבצע בדיקה זאת מהר יותר. מאידך, יש להניח ששיטת ריצוף היא מדויקת יותר ו- 9.6% אי התאמות הם טעויות של שיטת HRM. ללא עלות המכשור והעבודה, קביעת גנוטיפ בטריפליקטים בשיטת HRM כלכלית יותר (15.35 ₪) מריצוף סנגר (25.57 ₪).

טבלה 2. השוואת מחירים בין שיטת HRM לבין שיטת ריצוף בפורמט פלטת 96.

מרכיב בדיקה לשיטת ריצוף סנגר	סה"כ (ש"ח) כולל מע"מ	עלות לדגימה
קיט ל-BIOLINE PCR (ל-1000 דגימות)	1502.3	4.51
פלסטיקה (פלטות, טיפים) ל-100 דגימות	25	0.26
חומרים נוספים ל-PCR: פריימרים, אגרוז, סמן גודל, מים אולטראפיור ל-100 דגימות	10.2	0.11
עלות שירות ריצוף ל-96 דגימות	1,965.6	20.69
סה"כ סנגר:	25.57	
מרכיב בדיקה לשיטת HRM	סה"כ (ש"ח) כולל מע"מ	עלות לדגימה
Precision Melt Supermix (BORAD) for 10 plates	3629	12.96
פלסטיקה (פלטות, טיפים) ל-96 דגימות	55	1.96
חומרים נוספים פריימרים, מים אולטראפיור ל-96 דגימות	12.1	0.43
סה"כ HRM:	15.35	

מסקנות

- נבחנו מספר רקמות, שיטות ופרוטוקולים שונים לאיסוף והפקת דנ"א. איסוף ויבוש מספר טיפות דם על הנייר והפקת דנ"א בעזרת ערכה GeneAll נמצאו יעילים ביותר להכנת תבנית אמינה להצלחת תגובה PCR לאחר דילול בין 1:10 ל 1:20.
- פרוטוקול המבוסס על תגובת ASA נפסל בשלבים מוקדמים בגלל הפרעות רבות בוויזואליזציה של התוצרים וקביעת הגנוטיפ.
- יעלנו שיטות HRM וריצוף סנגר לקביעת גנוטיפ בנוקלאוטיד קריטי לרגישות למחלה סקרייפי. בוצעה הכנה לסריקת אוכלוסיות ושיטות הושו בעלותן ודיוקן. לשיטת HRM דיוק והצלחה נמוכים יותר (83%) אך התאמה כלכלית טובה יותר לסריקת אוכלוסייה גדולה יותר.
- שיטת HRM בעזרת TimePCR system "CFX Duet" מאפשרת סריקה מהירה של אוכלוסיות גדולות. כמו כן, תתכן הוזלת השיטה ע"י רכישת קיטים גדולים יותר (ל-3000 או 5000 תגובות במקום קיט ל-1000 תגובות).
- שיטת ריצוף סנגר היא שיטה מדויקת יותר ומספקת מידע גדול יותר כיוון שקובעת גנוטיפ גם באתרים נוספים של רגישות לסקרייפי ודיוקה אינו מושפע מנוכות אללים נדירים או בלתי צפויים כמו במקרה של האלל שאופייני לגזע האווסאי.

- אנו מודים לקרן מועצת החלב על הסיוע הנדיב במחקר, ועל שיתוף הפעולה הפורה!

1. Brown P, Bradley R. 1755 and all that: A historical primer of transmissible spongiform encephalopathy. *British Medical Journal*. 1998.
2. Cassmann ED, Greenlee JJ. Pathogenesis, detection, and control of scrapie in sheep. *Am J Vet Res*. 2020;81(7):600–14.
3. Gootwine E, Abdulkhaliq A, Jawasreh KIZ, Valle Zárata A. Screening for polymorphism at the prion protein (PrP) locus (PRNP) in Awassi and Assaf populations in Israel, the Palestinian Authority and Jordan. *Small Rumin Res*. 2008;77(1):80–3.
4. Greenlee JJ, Smith JD, Hamir AN. Oral inoculation of neonatal Suffolk sheep with the agent of classical scrapie results in PrPSc accumulation in sheep with the PRNP ARQ/ARQ but not the ARQ/ARR genotype. *Res Vet Sci*. 2016;
5. Kim N, Kwon JS, Kang WH, Yeom SI. High-Resolution Melting (HRM) Genotyping. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) [Internet]. 2023. p. 337–49.
6. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1989;17(7):2503–16.
7. Liu Q, Thorland EC, Heit JA, Sommer SS. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: A rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. *Genome Res*. 1997;7(4):389–98.