



פשוט ונקי: הפקות DNA פלסמידי "minipreps"

נשארים קשורים זה לזה, ונראים כשתי חוליות של שרשרת. בשלב זה ה-RNase מתחיל לפעול, כיוון שה-RNA של החיידק חשוף כעת לאנזים, שאינו רגיש כלל וכלל ל-pH הגבוה.

• **טיפ:** ערבבו את החיידקים בבופר II בעדינות רבה, שאם לא כן יישר ה-DNA הכרומוזומלי לקטעים קצרים יחסית (shearing), לא ישקע בשלב הנטרול (ראו להלן) ובהמשך ירד מן הקולונה יחד עם ה-DNA הפלסמידי, ובכך יזהם אותו. טיפ זה רלוונטי גם לשימוש בבופר III, שנתאר בהמשך.

• **טיפ:** על שלב זה להימשך 2 דקות לכל הפחות, כדי לאפשר ל-RNase לפעול, אך לא יותר מ-5 דקות, שאם לא כן יעבור ה-DNA הפלסמידי דנטורציה בלתי הפיכה ולא יהיה אפשר להשתמש בו לרסטריקציה, משום שאנזימי רסטריקציה חותכים רק DNA דו-גדילי. לפיכך אסור לענות לטלפונים בשלב זה.

• **נטרול:** מטרת שלב זה היא נטרול מהיר של pH גבוה על ידי אצטט של אשלגן, הנמצא בבופר III. כשה-pH יורד במהירות ל-pH ניטרלי, כל מולקולות ה-DNA שבות למבנן הטבעי, הדו-גדילי. מכיוון שגדילי ה-DNA הפלסמידי היו קשורים זה לזה, הם שבים ונצמדים זה לזה בלי קושי ונשארים מסיסים, בעוד שה-DNA הכרומוזומלי מתקשה לעשות כן. יתרה מזו, בין גדילי ה-DNA הכרומוזומלי נלכדים שברי תאים, המונעים מן הגדילים להתאחות. ה-DNA הכרומוזומלי שוקע, אפוא, יחד עם חלבונים, ממברנות וריבוזומים. בשלב זה, יוני האשלגן והדודציל סולפט שבתמיסה יוצרים את המלח קשה התמס אשלגן דודציל סולפט (K Acetate + NaSD = KDS↓ + Na Acetate). המשקע של מלח זה ממלא גם הוא תפקיד חשוב בשיקוע מרכיבים לא-רצויים, כיוון שמרכיבים אלו פשוט נדבקים עליו.

אחרי שלב הנטרול, אנו מסרכזים את הליזאט. DNA כרומוזומלי ימצא בבלט, ואילו הנוזל העליון (supernatant) יכיל DNA פלסמידי מסיס, חלבונים מסיסים, סוכרים ופיסות RNA חתוך. את הנוזל הזה נעביר דרך קולונה עם ממברנת סיליקה (ראו להלן).

הורדה של DNA פלסמידי מהקולונה. כעת ה-DNA המנוקה מוכן לשימושים הבאים, כגון ריצוף, חיתוך באנזימי רסטריקציה או טרנספקציה.

ליזיס של חיידקים

שלב זה מורכב משלושה תת-שלבים, המשותפים לכל סוגי ההפקות של DNA פלסמידי (mini/midi/maxi) ואף כמעט לכל סוגי הערכות המסחריות. השלבים הם: (1) הרחפת החיידקים, (2) ליזיס של התאים ו-(3) נטרול ה-pH.

• **הרחפת החיידקים:** בשלב זה, 1-3 מ"ל של תרבית החיידקים מורחפים בנפח קטן של בופר, שמטרתו דווקא לשמור על התאים בפני שברה. בופר זה (Solution I) מכיל גם אנזים RNase, אך האנזים אינו יכול לפעול על ה-RNA, כיוון שהתאים טרם נפתחו וה-RNA טרם נחשף לאנזים.

• **ליזיס של התאים:** ליזיס של חיידקים נעשה על ידי שימוש בבופר המכיל SDS (סודיום דודציל סולפט) ו-NaOH (Solution II). בגלל נוכחות ה-NaOH, ה-pH של הבופר הוא ~12, ומכאן שם השיטה כולה - "ליזיס אלקליני". השילוב בין NaOH ל-SDS גורם לדנטורציה של חלבונים ממברנליים (בדומה לבישול של ביצה). ממברנות

כמעט כל דבר שאנו עושים בתחום הביולוגיה המולקולרית מחייב אותנו, כשלב ראשון, להפיק DNA או RNA. מעבדות רבות יותר ויותר מפסיקות כיום להשתמש בשיטות ישנות, כשימוש בפנול ושיקוע אתנולי או שיקוע בצזיום כלוריד (CsCl), ועוברות להשתמש בערכות מסחריות (קיטים) להפקות חומצות גרעין.

אף שערכות אלה הן פשוטות וזריזות יחסית, יש שאנו ניצבים חסרי אונים בפני קשיים בהפעלתן. זאת משום שרוב מרכיבי הקיטים הם סודיים או קנייניים, ואנו איננו יודעים, פשוטו כמשמעו, מה מתרחש בשלבים מסוימים של ההפקה. אני סבור שהבנה טובה יותר כיצד פועלות הפקות DNA פלסמידי תסייע לכם להתגבר על קשיים בהפקה בכוחות עצמכם, מבלי להתקשר לחברות ולבקש להחליף את הקיט.

טיפ-טיפה היסטוריה

זה 30 שנים ידוע, כי DNA בנוכחות מלח קאוטרופי וב-pH נמוך יכול להיספח לסיליקה (צורן דו-חמצני), לחלקיקי זכוכית או לאצות צורניות מאובנות (Diatomaceous earth). את ה-DNA הנספח ניתן לשטוף ואחר-כך

ערכות להפקת DNA הן פשוטות יחסית, אך קשה להתמודד עם קשיים בהפעלתן, משום שרוב מרכיביהן סודיים ולא ידוע לנו מה מתרחש בשלבי ההפקה השונים

החיידק נשברות, מים חודרים לתוכו והחיידק "מתפוצץ". אך לא רק חלבונים עוברים דנטורציה, אלא גם ה-DNA. משמעותה של דנטורציה ב-DNA היא פתיחה של מבנה ה-DNA הדו-גדילי למולקולות חד-גדיליות. ואולם, DNA כרומוזומלי ו-DNA פלסמידי עוברים דנטורציה בצורה שונה, ושוני זה הוא אבן היסוד של האפליקציה המאפשרת לנו להפריד או לנקות DNA פלסמידי מ-DNA כרומוזומלי בשלבים הבאים. אם DNA כרומוזומלי "נפתח" למולקולות חד-גדיליות גדולות והגדיל כולו מאבד את בן-זוגו, הרי שגדילי ה-DNA הפלסמידי המעגלי

להוריד בבופר ללא מלח ב-pH גבוה מ-8 או אפילו במים. בתחילה השתמשו למטרה זו במלחים הקאוטרופיים סודיום יודיד (NaI) או סודיום פרכלורט (NaClO₄), ואחר-כך החליפו אותם בגואנידיניום תיציאנט או בגואנידיניום הידרוכלוריד. חלקיקי הזכוכית או הסיליקה הוחלפו לאחרונה בקולונות צנטריפוגליות, המכילות פילטר או ממברנה העשויים מסיליקה. השיטה הנפוצה ביותר ברחבי העולם להפקת DNA פלסמידי נקראת ליזיס אלקליני ושלביה העיקריים הם: (1) ליזיס של חיידקים, (2) ספיחת ה-DNA לקולונה, (3) שטיפה, (4) אלוציה או



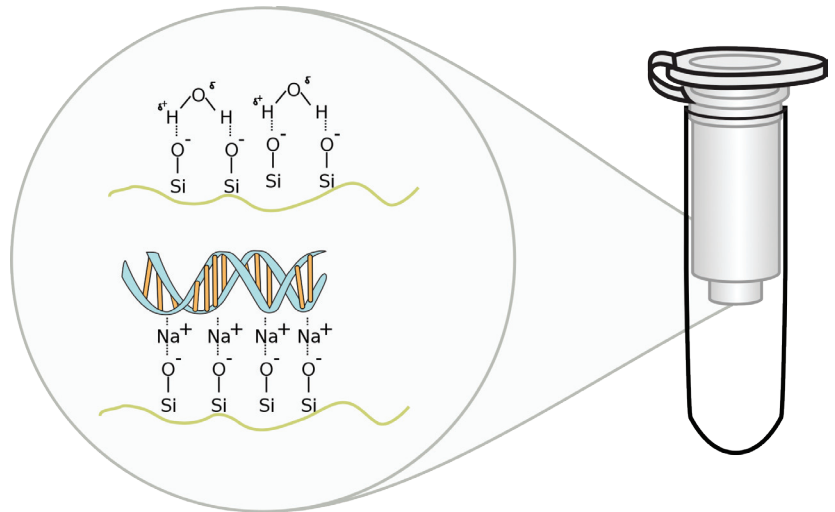
וכמה טיפים כלליים לדרך:

- הצלחה בהפקת DNA פלסמידי תלויה מאוד בבחירה נכונה של חיידקים (ראו מדור זה בגיליון 6). כדרישה מינימלית, על החיידקים להיות מוטנטים בשני גנים לפחות - *recA* ו-*endA*.
- השתמשו תמיד בתרבית טרייה בלבד, והתחילו את ההפקה מהר ככל האפשר.
- אל תגדלו את תרבית החיידקים יותר מ-15 שעות. אחרי זמן זה החיידקים מתחילים למות ולשחרר למצע את הליפופוליסכריד המכונה אנדוטוקסין, היכול לגרום למוות של תאים אנימליים בניסויי הטרנספקציה.
- אל תעמיסו את הקולונה בחומר רב מדי. השתמשו בכמות חיידקים לפי המלצתו של יצרן הקיט.
- זכרו שבסביבה מימית, DNA נהרס על ידי נוקלאזות, קרינת UV, pH נמוך מ-5.0 או גבוה מ-9.0, מתכות כבדות ורדיקלים חופשיים. ■

ד"ר יבגני ברדיצ'בסקי הוא מרצה בקורס 'שיטות מחקר בסיסיות בביולוגיה מולקולרית' באוניברסיטת תל אביב. אם תרצו לשאול שאלות או להציע טיפים טובים בתחום הביולוגיה המולקולרית, אנא כתבו כ: yevgenybe@gmail.com

לקריאה נוספת:

- Birnboim, H.C. and Doly, J., "A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA", *Nucleic Acids Research* 7(6):1513-1524 (November 1979).
- Marko, M.A., Chipperfield, R. and Birnboim, H.C., "A Procedure for the Large-Scale Isolation of Highly Purified Plasmid DNA Using Alkaline Extraction and Binding to Glass Powder", *Analytical Biochemistry* 121(2):382-7 (April 1982). PMID: 6179438.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J., "Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids", *Journal of Clinical Microbiology* 28(3):495-503 (March 1990). PMID: 1691208.



עמודת סיליקה מוטענת בדגימת DNA בבופר קאוטרופי.

אתאנוול על הסיליקה, הרי שבשלב האלוציה, לא תתרחש הידרציה נאותה של הקולונה בבופר TE או במים, ולכן נאבד כמות מסוימת של DNA. יתרה מזו, אתאנוול מפריע מאוד גם לרסטריקציה, לטרנספורמציה ולטרנספקציה.

כיצד אפשר להבחין ש-DNA פלסמידי מזוהם באתאנוול, שהרי לא רואים אותו בספקטרופוטומטר NanoDrop? ניתן להבחין בנוכחות האתאנוול בשתי דרכים: (1) להטעין DNA פלסמידי על ג'ל אגרוז - הדוגמה תצוף ותצא מהבארית למרות נוכחות בופר הדגימה (sample buffer); (2) ה-DNA הפלסמידי לא יקפא ב-20°C.

אלוציה של ה-DNA מהקולונה

בופר האלוציה הטוב ביותר הוא 5-10 mM Tris, pH 8.5-8.0, אך אפשר להשתמש גם במים מזוקקים. כיצד ה-DNA נפרד מהסיליקה? כאשר אין על הסיליקה מלח קאוטרופי "גונב" מים, הן ה-DNA והן הסיליקה עוברים הידרציה (ראו איור). ה-DNA אינו קשור עוד לסיליקה ואפשר להורידו מהקולונה בסרכוז.

• טיפ: השתדלו להוריד DNA בבופר Tris, ולא במים. ה-pH של מים מזוקקים הוא בסביבות 5.5-5.0, וה-DNA, שהוא חומצה בעצמו, אינו נשמר היטב בסביבה חומצית.

• טיפ: DNA הנמצא במים יש לשמור ב-20°C! הקפידו תמיד להדגיר את קולונת הסיליקה עם בופר האלוציה לפחות דקה אחת, כדי לאפשר הידרציה טובה של הקולונה, במיוחד בהפקות של פלסמידים גדולים.

בהפקות של פלסמידים גדולים ניתן לחמם את בופר האלוציה ל-60°C. הדבר עשוי לשפר את ניצולת ההפקה ב-10-20%. ■

קשירה לקולונת סיליקה

בשלב זה אנו מעבירים את הליזאט, באמצעות סרכוז, דרך קולונה המכילה ממברנת סיליקה. המלח שבליזאט סופח את מולקולות המים הן מהסיליקה והן מה-DNA (dehydration), ויוני הנתרן מאפשרים יצירת גשרי מלח (O-Na-O) בין חמצן הפוספט שב-DNA לבין חמצן הצורן הדו-חמצני (ראו איור).

גם קשרי מימן O-H-O יכולים לקשור את ה-DNA הפלסמידי לממברנת הסיליקה. כך ה-DNA הפלסמידי נקשר לקולונה, ואילו חומרים אחרים (חלבונים, סוכרים, RNA) עוברים בה מבלי להיספח.

שטיפת הקולונה

בשלב זה אנו שוטפים את ה-DNA הקשור לקולונה בבופר שטיפה, המכיל בעיקר אשלגן פוספט ו-70-80% אתאנוול. שלב זה הוא קריטי: אם יישאר מלח קאוטרופי על הסיליקה, לא תתרחש הידרציה טובה של ה-DNA בשלב האלוציה, ה-DNA לא ייפרד כולו מהקולונה וההפקה תהיה "ענייה". נוסף על כך, שאריות מלח קאוטרופי עשויות להפריע מאוד לשימושים הבאים ב-DNA הפלסמידי.

• טיפ: השתמשו תמיד רק באתאנוול 100%, ומאיכות מצוינת.

• טיפ: הקפידו על הריכוז הנכון של אתאנוול בבופר השטיפה. DNA אינו מסיס באתאנוול, ולכן ה-DNA נשאר קשור לקולונה. אך כמות לא-מספקת של אתאנוול בבופר השטיפה תגרום לאלוציה מוקדמת של DNA פלסמידי ולאיבוד של חומר יקר.

• טיפ: בצעו תמיד סרכוז נוסף של הקולונה כדי לייבשה משיירי האתאנוול. אם יישאר