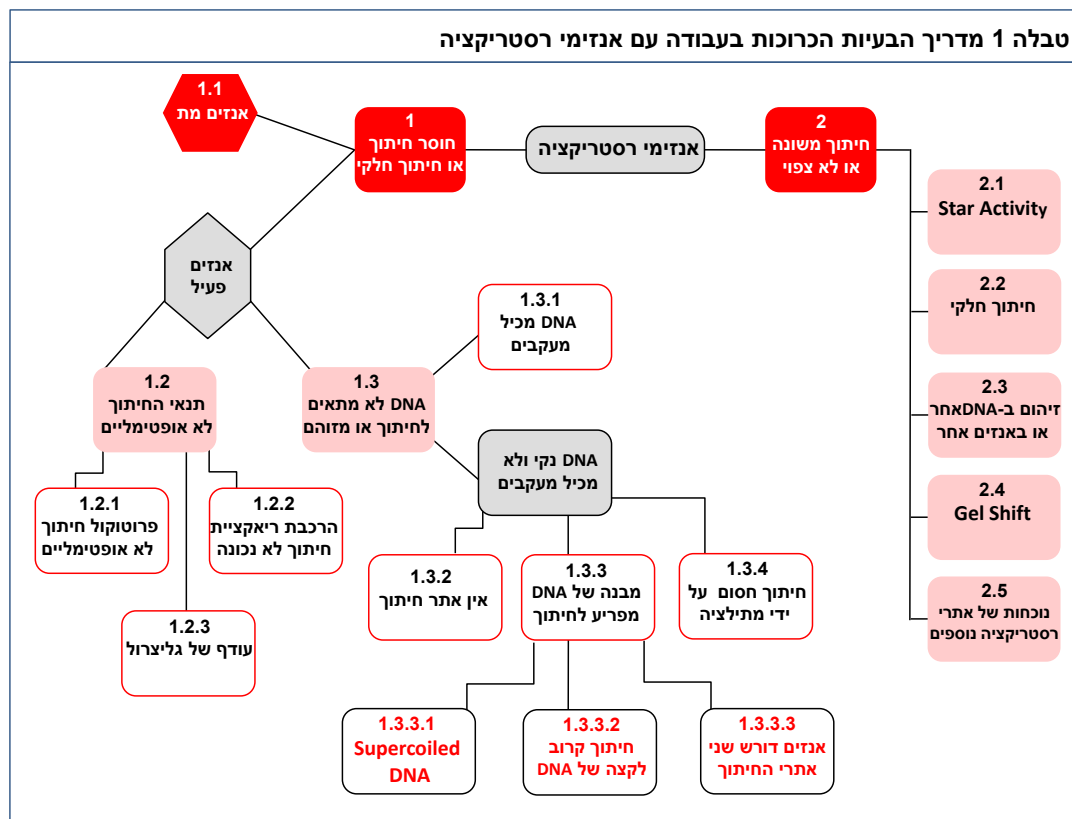


אנזימי רסטריקציה: סוסי העבודה של הביולוגיה המולקולרית (חלק II)

אנזימי רסטריקציה (restriction enzymes) הפכו בשנים האחרונות ל"סוסי העבודה" של הביולוגיה המולקולרית. אנזימי הרסטריקציה הם אנזימים המזהים רצפים ספציפיים ב-DNA דו-גדילי וחותכים אותו, אם בתוך אתר ההכרה ואם בסמוך לו. טור זה הוא כתבה שנייה על אנזימי רסטריקציה (ראו גיליון קודם לכתבה הראשונה), ובו אציג בפניכם מידע וטיפים על הבעיות והפתרונות הקשורים לעבודה באנזימי רסטריקציה. במהלך הקריאה תוכלו גם להיעזר ב"מדריך" הבעיות שמופיע בטבלה 1.



אנזים רסטריקציה לא חותך בכלל

מה לעשות כשאנזים רסטריקציה לא חותך בכלל? יותר נכון לשאול מה לא לעשות במקרה כזה – לא להתקשר לחברה המפיצה ולבקש להחליפו, כי ייתכן ואותן הבעיות תחזרנה גם בשימוש באנזים חדש. הדבר הראשון שעל חוקרות לעשות, זה לבדוק בקטלוג או באינטרנט את המידע על האנזים שהוא עושה בו שימוש. אפשר שאתר ההכרה של האנזים חסום על ידי מתילציה, כמו במקרה של אנזימי *XbaI*, *EcoRII*, *ClaI*, *BclI* ואחרים (1.3.4 במדריך הבעיות שבטבלה 1). יכול להיות שהאנזים דורש 2 אתרי הכרה לכל הפחות על מנת לחתוך לפחות באחד מהם, כגון אנזימים *FokI*, *EcoRII*, *NaeI*.

ואחרים (1.3.3.3). ייתכן והאנזים פשוט מת, כמו במקרה עם אנזים *FseI* שמת אחרי חודש ימים ב- -
20 °C (1.1). כמו כן, ה-DNA אותו אנו רוצים לחתוך יכול להיות פשוט לא מתאים לחיתוך (1.3.3) או
מזוהם בפנול או במלח קאוטרופי שאף אנזים לא יהיה מסוגל לחתוך אותו (1.3.1). אומנם, הסיבות
לחוסר חיתוך ע"י אנזים רסטריקציה הן בעיקר הבנאליות ביותר. הסיבה הכי נפוצה לחוסר חיתוך
היא טעות בבחירה טמפרטורת החיתוך. ישנם אנזימים שחותכים DNA בטמפרטורות גבוהות, כגון
55 °C או 65 °C, אך אנחנו, כהרגל, מעמידים את החיתוך ב- 37 °C (1.2). הסיבה נפוצה השנייה היא
חוסר אתר הכרה של האנזים ב-DNA שלנו (1.3.2). הסיבה השלישית לחוסר חיתוך היא בשכחה
להוסיף תוספים לריאקציית החיתוך (כגון BSA, SAM או DTT) או את האנזים עצמו (1.2.1 ו-1.2.2).

טיפ: איך לבדוק אם אנזים הרסטריקציה הפסיק לפעול או מת? פשוט קנו מחברות NEB או
Fermentas, DNA של פאג' למבדא (Lambda) שהופק מחיידקי *E. coli dam-dcm-* וחיתכו את ה-
DNA באנזים הבעייתי. ה-DNA הזה הוא מאוד נקי ולא ממותל, ורוכשים אותו בעיקר להכנת
מרקרים "ביתיים" במעבדה, אך במקרה הנתון, ה-DNA הפאג'י הזה, יכול לשמש גם בתור פלסמיד
ביקורת.

היה ואנזים הרסטריקציה לא חתך את DNA הביקורת, סביר להניח שהאנזים מת או שהשתמשם
בטמפרטורה לא מתאימה לחיתוך. שימו לב – לא לכל אנזים רסטריקציה ישנם אתרי הכרה ב-DNA
של פאג' למבדא. למשל, בפאג' למבדא לא קיים אתר של אנזים *NotI*. אם האנזים חתך בהצלחה את
DNA הביקורת, סביר להניח שאין אתר הכרה של האנזים הזה ב-DNA שלכם.

טיפ: תמיד לפני החיתוך תבדקו את הטמפרטורה האופטימלית של האנזים בו אתם הולכים
להשתמש. למשל, אנזים רסטריקציה רגיל *BseGI* מחברת Fermentas חותך בטמפרטורה 55 °C,
כאשר טמפרטורת החיתוך של מקביל שלו *Fast™ Digest BseGI* היא 37 °C!

טיפ: במקרה ואתם עושים חיתוך כפול (double digest) עם 2 אנזימים בעלי טמפרטורה אופטימלית
שונה, חיתכו ראשית את ה-DNA עם האנזים שפועל בטמפרטורה נמוכה, ולאחר החיתוך הראשון
תעלו את טמפרטורה לזו שמתאימה לאנזים השני.

טיפ: אם אתם חותכים DNA ב-65 °C, עשו שימוש במכשיר PCR ולא באמבט חימום. זה ימנע את
אידוי המים וכתוצאה מכך עליה בריכוז המלח, שעשויה לפגוע בפעילותו של האנזים.

טיפ: אם נתקלתם בבעיה עם חיתוך באנזים רסטריקציה מסוים, תעמידו כ-"ביקורת פנימית" את
אותה ריאקציית חיתוך, אך ללא אנזים, ותריצו אותה בגיל אגרוז יחד עם ריאקציית חיתוך אמיתית.
כך תוכלו להבחין בלפחות 10-20% של חיתוך, או לחלופין, לזהות זיהום בנוקלאז הלא-ספציפי,
למשל ב-*endonuclease A*.

טיפ: לעולם אל תקפיאו אנזימי רסטריקציה עד מצב הקרח. אנזימים אלו מכילים 50% גליצרול על מנת להישאר לא קפואים ב-20 °C. לאחר 3 הקפאות והפשרות, אנזימים רסטריקציה פשוט "מתים". היות ואנזימי רסטריקציה מגיעים לישראל מוקפאים על קרח יבש, אסור לנו להקפיא אותם שנית לאחר תחילת האחסון ב-20 °C. בנוסף לכך, לא כדאי לאחסן אנזימי רסטריקציה במקררי "non-frost", מפני שמקררים האלו כל הזמן מתממים ומקררים את המקפיא שלהם – הדבר שפוגע הכי הרבה בפעילותם של אנזימים. לבסוף, השתדלו לא להחזיק אנזימי רסטריקציה בקופסאות פלסטיק או קרטון, אלא בקולרים המיוחדים.

גם אנזימי רסטריקציה דורשים "תוסף מזון"

ישנם אנזימי רסטריקציה שבכדי להשיג 100% מפעילותם, עלינו להוסיף תוספים מיוחדים לריאקציה החיתוך. כך למשל, כמחצית מאנזימי הרסטריקציה המסחריים דורשים לפעילותם את החלבון BSA (Bovine serum albumin), ביניהם אנזימים פופולאריים ביותר כגון *PstI*, *NotI*, *EcoRV*, *BamHI* ואחרים. מהו התפקיד של BSA? התפקיד העיקרי של BSA הוא לייצב את אנזימי הרסטריקציה בריאקציה החיתוך. תפקיד המשנה שלו הוא בקשירת חומרים מזהמים שעלולים להימצא בהפקות ה-DNA – בדומה לתפקידו של BSA בדם כאשר הוא קושר חומרים טוקסיים. איך בעצם מייצב BSA את אנזימי רסטריקציה? כשמוסיפים BSA בכמות גדולה הרבה יותר מאנזימי הרסטריקציה, הוא מונע את הידבקותו של האנזים לדפנות של מבחנת הפלסטיק. כאשר אנזימי רסטריקציה נדבק לדופן המבחנה, הוא עובר שינוי במבנה שלו (denaturation) ובכך מאבד מפעילותו.

טיפ: ניתן להוסיף BSA לכל ריאקציות החיתוך. במקרים מסוימים זה לא יעזור, אבל אף פעם לא יפריע. חברת Fermentas עשתה דבר מאוד חכם – הם הוסיפו את BSA לכל הבופרים של אנזימי הרסטריקציה שלהם – גם באנזימים הרגילים וגם באנזימי ה-Fast™ Digest. הקפאות והפשרות רבות של הבופרים האלו לא פוגעות באיכות ה-BSA.

טיפ: אם "לא בא" לכם להוסיף BSA, השתמשו במבחנות "Low protein binding" מחברות Eppendorf או Sarstedt.

ישנם אנזימים כגון *MmeI*, *Bcgl*, *Alfi*, *Acui* ואחרים שדורשים לפעילותם SAM (S-adenosylmethionine), ואף ישנם אנזימים הדורשים ATP או DTT. בנוסף לכך, ישנם אנזימים (*BspMI*) שעלינו להוסיף להם אוליגו (oligonucleotide) המכיל את אתר הכרה שלהם בריכוז סופי של 0.5 μM. ללא הוספת האוליגו הזה, *BspMI* לא יחתוך בכלל פלסמידים כגון pUC19 או pBR322,

מפני שהאנזים צריך 2 אתרי הכרה לפעילותו, ובפלסמידים האלו אתר ההכרה של *BspMI* מופיע רק פעם אחת.

טיפ: במקרים של חיתוך כפול (double digest) אם אחד מהאנזימים דורש "תוסף מזון", הוסיפו אותו תמיד לריאקציה. ברוב המקרים התוסף לא יפריע לאנזים השני.

מתילציה – האויב המידי של חיתוכים באנזימי רסטריקציה

רבים מאתנו למדו עוד בתואר הראשון, שחיידקים שונים מזהים את DNA זר שחודר לתוכם ע"י השוני שב"דפוס" המתילציה שלו. ה-DNA הזר נחתך ע"י אנזימי רסטריקציה בדיוק באותו האתר שאנזים אחר המכונה מתילאז, הקשור לאותו אנזים רסטריקציה, ממתל אותו. ביחד, שני האנזימים האלה – מתילאז ורסטריקטאז – מהווים מערכת restriction and modification בחיידק. אנזים מתילאז, שומר אפוא על הכרומוזום של החיידק מפני אנזים הרסטריקציה שלא יחתוך את ה-DNA הגנומי של עצמו, ע"י כך שהוא ממתל את ה-DNA הכרומוזומלי שניות אחרי הרפליקציה שלו. אנו יודעים גם כן, שלמתילציה מסוג "CpG" יש תפקיד חשוב בוויסות של ביטוי גנים ובהתמיינות של תאים אנימאליים. המדע המודרני שחוקר תופעה זו נקרא אפיגנטיקה (epigenetics). המתילציה והשפעותיה על תהליכי השיבוט – זה עדיין נושא "המעורפל" לרוב מאתנו. יתר על כן, קשה ודאוב להסתכל בעיניים של סטודנט ולהגיד לו שהאנזים שלו, לדוגמה *BclI*, לא יחתוך לעולם פלסמיד שהופק מחיידק DH5alpha, כי האנזים *BclI* חסום ע"י מתילציה מסוג Dam או שהספרייה הגנומית שהוא בונה מ-DNA של עכבר או חולדה בחיידק XL1-Blue ממש לא תהיה טובה ויצוגית כי 90% מ-DNA הכרומוזומלי יחתך ע"י מערכת מתילציה – רסטריקציה מסוג *Mcr*. הבעיה היא בעצם שהסטודנט עושה את ניסויו כבר כמה שבועות או אפילו חודשים, מבלי לדעת שנגזרה עליו אי-הצלחה מהרגע הראשון שהוא התחיל בפרויקט שלו.

השפעותיה השליליות של מתילציה בשיבוטים ו/או בשיטות מחקר אחרות של ביולוגיה מולקולרית היא בשני נתיבים - בטרנספורמציה של פלסמידים לתוך חיידקי *E. coli* ובחיתוכים ע"י אנזימי רסטריקציה. בטרנספורמציה של פלסמידים מהונדסים לתוך חיידקי *E. coli* ישנן 2 בעיות – הראשונה היא שיבוט של DNA לא-ממותל במידה ומשבטים תוצרי ה-PCR (תוצרי ה-PCR הם לעולם לא ממותלים). הבעיה השנייה היא בשיבוט של DNA גנומי כלשהו ישירות ל-*E. coli*, היות והמתילציה שלו שונה מזאת של *E. coli* (כעיקר מדובר פה על מתילציה מסוג CpG) (ראו גם כתבה על טרנספורמציה לתוך חיידקים בגיליון 6 ב*BioInform*).

טיפ: על מנת להסיר מכם את כל כאבי הראש הקשורים לקלונינג וטרנספורמציה של מקטעי ה-DNA ממותלים או לא-ממותלים, עשו שימוש בחיידקי *E. coli* שמוטנטים **בכל הגנים** האחראים ל"משטרת הגירה" של החיידק *E. coli*. דוגמאות לחיידקים האלה הם DH10B, GeneHogs ו-XL10 restriction and modification של *mcrA Δ(mcrCB-hsdSRM-mrr)*. מערכת של Gold, והמוטציות הן *mcrA Δ(mcrCB-hsdSRM-mrr)*. כאשר מוטציות בגנים *hsdSRM* (מערכות מסוג Mcr חותכת DNA הנושא עליו מתילציה מסוג CpG, מאשר מוטציות בגנים *hsdSRM*) (מערכות EcoB או EcoK שהם שייכים לאנזימי רסטרקציה מ-Type I) מאפשרות שיבוט של מקטעי PCR לא-ממותלים.

ישנם רק 2 אנזימי רסטרקציה שדורשים לפעילותם DNA ממותל – *DpnI* ו-*SgeI*. בגלל התכונה המיוחדת הזאת, *DpnI* הוא האנזים הנפוץ ביותר בשיטות מוטגנזה שונות, היות והוא חותך DNA זן הבר ממותל בלבד, ומשאיר את ה-DNA המוטנטי "ללא פגע" ובכך מעלה את סיכויי ההצלחה של המוטגנזה. בשאר המקרים עם ~300 אנזימי רסטרקציה אחרים – מתילציה יכולה לחסום את החיתוך, או לא להשפיע בכלל. חסימת החיתוך יכולה להיות טוטלית או חלקית.

מערכות מתילציה של חיידקי *E. coli* K12 שעשויים להפריע לחיתוכים ע"י אנזימי הרסטרקציה הן מערכות מתילציה מסוג Dam, Dcm ו-EcoK (בחיידקי *E. coli* B מערכת נקראת EcoB). מתילאז Dam (DNA adenine methylase) ממתל אדנין ברצף GA^mTC שמופיע לפחות פעם אחת בכל 256 בסיסים ב-DNA, כאשר מתילאז מסוג Dcm (DNA cytosine methylase) ממתל ציטוזין השני שברצף CC^m(A/T)GG שמופיע לפחות פעם אחת בכל 512 בסיסים ב-DNA כרומוזומלי או פלסמידי. אתר הכרה של מתילאז EcoK הוא A(^mA)CN₆GTGC וברצף המשלים שלו - GC(^mA)CN₆GTT. האתר הזה מופיע בערך כל 8000~ בסיסים על DNA ולא מהווה בעיה גדולה לאנזימי רסטרקציה. אכן, ישנם רק 8 אנזימים שחסומים ע"י EcoK מתילאז (*HpaI*, *HincII*, *DraI* ואחרים).

טיפ: לפני שאתם קונים או מוציאים את אנזימי הרסטרקציה מהמקפוא, בדקו תמיד בקטלוג או באתר האינטרנט, האם האנזים שלכם רגיש למתילציה מסוג CpG, Dam, Dcm או EcoK.

טיפ: אם אכן, אנזימי הרסטרקציה חסום ע"י מתילציה, בדקו אם ישנם isoschizomer או neoschizomer שלו שאינם רגיש למתילציה, והשתדלו להשתמש רק בהם. כך לדוגמה, אנזימי *MboI* חסום ע"י Dam methylation, כאשר איזוסכיזומר שלו *Bsp143I* חותך מעולה את האתר שלהם – GATC. כך גם אנזימי EcoRII חסום ע"י Dcm methylation, כשאנזימי *MvaI* (נאוסכיזומר שלו) לא רגיש בכלל למתילציה מסוג זה. כדוגמה נוספת – אנזימי *HpaI* חסום ע"י CpG methylation, כאשר איזוסכיזומר שלו *MspI* לא מושפע בכלל ע"י CpG methylation.

טיפ: ישנם אנזימים שחותכים אתרים שונים אך משאירים קצוות דביקים שיכולים להסגר על עצמם ולעבור ליגציה. למשל אנזימי רסטריקציה *BclI*, *BamHI* ו-*BglII* כולם משאירים לאחר החיתוך קצה 5' בולט שהוא GATC. היות ו-*BclI* חסום ע"י Dam methylation, ניתן לחתוך את התוצר PCR שהוא לא ממותל באנזים *BclI* ואז לשבט את המקטע PCR לפלסמיד לתוך אתרים *BamHI* או *BglII*. שיבוט שכזה יהיה מוצלח, אך האתרים יתבטלו ולא יהיה אפשר לשוב ולהשתמש בהם.

בכתבה הבאה, אנו נשלים את הפתרונות לבעיות בעבודה עם אנזימי רסטריקציה וכן נדבר על טיפים יישומיים מאוד לשיטות בהם משתמשים באנזימי הרסטריקציה.

ד"ר יבגני ברדיצ'בסקי הוא מרצה בקורס "שיטות מחקר בסיסיות בביולוגיה מולקולרית" באוניברסיטת תל-אביב. כדי לשאול שאלות או להציע טיפים משלכם, אנא כתבו ל: yevgenybe@gmail.com