

>>>כותרת:

תוספת מיוחדת לאתר לטור טיפים על קצה הטיפ בביולוגיה מולקולרית<<<

יבגני ברדיצ'בסקי

כותרת:

טרנספורמציה של DNA פלסמידי לתוך חיידקים

>>>טיפ<<<

• אל תוסיפו טרציקלין בהפקות פלסמיד

חיידקי *Escherichia coli* XL-1Blue ו-XL-10Gold מכילים טרנספוזון 10 (Transposon 10) או *Tn10* שהוחדר לתוך פלסמיד-F שלהם. טרנספוזון 10 מכיל גן עמידות לטרציקלין, ואלפי חוקרים בוחרים להשתמש בחיידקים אלה כחיידקים קומפטנטיים לטרנספורמציה רק בשל התכונה הזאת. אולם אותם חוקרים מוסיפים טרציקלין לא רק בהכנת התאים הקומפטנטיים, אלא גם בפלטות גידול ובמצעים נוזליים (starters) להפקות פלסמיד. וזה לא רעיון טוב. עמידות לאנטיביוטיקה טרציקלין מבוססת על יצירת חלבון TetA, שהוא חלבון ממברנלי המוציא את האנטיביוטיקה מהתא (antiporter protein). הוספת טרציקלין יחד עם האנטיביוטיקה לסלקציה של פלסמיד המטרה מקשה על החיידקים וגורמת לירידה בכמות ובאיכות של ה-DNA הפלסמידי המופק, כיוון שהחלבון TetA סותם את ממברנות החיידק ומפריע לסינתזת ה-ATP. לפיכך, הוסיפו טרציקלין רק בשלב הכנת התאים הקומפטנטיים, ולא בסלקציה או בגידול הטרנספורמנטים.

>>>טיפ<<<

• בחרו בחיידק המתאים ביותר לאפליקציה שלכם

החיידק *E. coli* K12 הוא חיידק לא-פתוגני שבודד ב-1922 מצואתו של ילד שחלה במחלת הדיפתריה. שנים רבות שימש חיידק זה כ"חיידק דוגמה" במעבדות הסטודנטים באוניברסיטת סטנפורד. אולי משום כך נבחר החיידק לשמש כ"שפן ניסיונות" במחקרם של אדוארד טאטום (Tatum) וגיושוע לדברג (Lederberg), שנערך בשנות הארבעים של המאה ה-20, ואשר נבדקו בו הגנטיקה והפיזיולוגיה של *E. coli* באמצעות שיטות שונות של מוטגנזה. החוקרים הפעילו על החיידק המסכן כמעט כל דבר שיכול לגרום לנזק ל-DNA, כגון קרינת UV, קרינת X וחומרים מוטגניים שונים. לפיכך, כיום זוהי משימה כמעט בלתי אפשרית למצוא חיידקי *E. coli* K12 מזן הבר.

הודות ל- 70 שנות מחקר על הגנטיקה של חיידקי *E. coli* K12, אנחנו יכולים היום לבחור במוטנט המתאים ביותר לאפליקציה שלנו. להלן נציג אחדות מן האפשרויות:

* למטרות שיבוט שגרות, השתמשו **אך ורק** בחיידקים שהם מוטנטים בגנים *recA1*, *endA1* ו-*hsdR*. זנים של החיידקים האלה הם: Top10, DH5alpha, JM109, NovaBlue, XL-1Blue ואחרים. הגן *endA1* מקודד לאנדונוקליאז לא-ספציפי, שהוא חלבון פריפלסמי ועמיד לחום. מוטציה בגן זה מאפשרת לקבל DNA פלסמידי בכמות גבוהה ובאיכות טובה. כשנפיק DNA פלסמידי מהחיידק שהוא זן הבר לגבי הגן הזה (*endA1*⁺) ללא טיפול בבופר מיוחד המכיל מלח קאוטרופי (chaotropic), ואם נוסיף אחר-כך ל-DNA פלסמידי זה אנזימי רסטריקציה ונדגיר אותם ב-37°, אזי, במקום חיתוך באנזימי הרסטריקציה, תתרחש דגרדציה של ה-DNA על ידי EndA. אם נריץ את התוצר בגיל אגרוז, נקבל כתם (smearing) ולא מקטעי DNA יפים. כתוצאה מכך, לא נוכל להשתמש ב-DNA הזה וכן התהליך השיבוט ייכשל.

מוטציה בגן *recA1* מורידה את שיעור הרקומבינציה ההומולוגית בחיידק בערך פי 10,000. אנו נעזרים במוטציה זו כדי להבטיח את יציבות הגן המשובט שלנו, בעיקר אם הגן מכיל מקטעי DNA הומולוגיים ל-DNA הגנומי של החיידק או אזורים חוזרניים (direct or inverted repeats).

מוטציה בגן *hsdR* מבטלת את פעילות הרסטריקטאז של האנזים EcoK, אך מותירה את יכולתו של אנזים זה למתל DNA (מוטציה זו מסומנת בגנוטיפ של חיידקים גם כ- *r_{K12}⁻m_{K12}⁺*, שמשמעותה *restriction_{K12}⁻ modification_{K12}⁺*). מוטנט זה הוא הכרחי לשיבוט של תוצרי PCR או DNA אחרי מוטגנזה, מפני שה-DNA באפליקציות אלה הוא **לא-ממותל**, ועלול להתפרק בחיידק מסוג *hsdR*⁺ (*r_{K12}⁺m_{K12}⁺*).

* לטרנספורמציה של פלסמידים גדולים מאוד, או בשיבוטים מורכבים ומסובכים, עשו שימוש בחיידק DH5alpha, הנושא מוטציה בגן *deoR*, או בחיידק XL-10Gold, המכיל את המוטציה *Hte*. *deoR* הוא גן רגולטורי לביטוי גנים האחראים לסיתתה של דאוקסיריבוז, שהוא כמובן מרכיב של DNA; מוטציה בגן *deoR* גורמת לביטוי תמידי של גנים אלה, ומאפשרת שכפול של פלסמידים גדולים. מיקומה המדויק של המוטציה *Hte* בגנום החיידק XL-10Gold אינו ידוע, והמוטציה קיבלה את שמה בשל הפנוטיפ של החיידק, המכונה High Transformation Efficiency. מוטציה זו מעלה במידה רבה את יעילות הטרנספורמציה של ריאקציות ליגציה או של פלסמידים גדולים כגון לנטיווירוסים (lentiviruses).

* לשיבוט DNA שנלקח ישירות מחיידק שאינו *E. coli*, או מרקמות או מתאים אנימליים, השתמשו רק בחיידקים DH10B, INV110, STBL4, SURE או XL-10Gold, שחסרים בהם כמעט כל הגנים המקודדים ל"משטרת ההגירה" של חיידקי *E. coli*. מוטציית חסר זו רשומה

בתעודת הזהות של חיידקי *E. coli* אלה כ- $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$, ומשמעותה שחיידקי *E. coli* הללו אינם יכולים לזהות DNA זר ולחתוך אותו, או במילים אחרות, אינם יכולים להגביל את שכפול ה-DNA הזר. משום כך נקראו אנזימים אלה בשם restriction enzymes (מילולית: "אנזימי הגבלה"). חרף העובדה שאיננו משתמשים באנזימים הללו לצורך השיבוט, מערכת של EcoK (*hsdSMR*) מכילה את אנזים הרסטרקטאז הראשון שתואר אי פעם בחיידקים

* לביטויי חלבונים רקומביננטיים, עשו שימוש רק בחיידקי BL21 או בנגזרות שונות שלהם. *E. coli* BL21 הם חיידקים מסוג B, ולא מסוג K12, והם מוטנטים טבעיים בפרוטאז מסוג Lon. נוסף על כך, החיידקים הללו הם מוטנטים גם בפרוטאז אחר, המכונה *ompT* (outer membrane protease), מוטציות בשני פרוטאזות אלה מייצבות חלבונים רקומביננטיים ומונעות את פירוקם ב-*E. coli*. כמו כן, ישנם חיידקי BL21Star, המתאפיינים במוטציה נוספת בגן *rne*, המקודד ל-RNase E. מוטציה זו מצמצמת מאוד את פירוק ה-RNA, ובכך מעלה את זמינות ה-mRNA לעבור תרגום. לפיכך היא מאפשרת קבלת חלבון רקומביננטי בכמות גדולה יותר.

<<<טיפ>>>

• איך טרנספורמציה כימית פועלת?

איש עדיין אינו יודע במדויק איך טרנספורמציה כימית פועלת. ההסבר המקובל הוא, שבמהלך הגדילה המהירה של *E. coli* על מצע עשיר, נוצרות בממברנה של החיידק נקבוביות (pores) רבות, המכונות אזורי אדהזיה (adhesion zones). הממברנה של חיידק מורכבת מפוספוליפידים הנושאים מטען שלילי. אף על פי שאזורי אדהזיה אלו הם גדולים מספיק כדי שה-DNA הפלסמידי יחדור פנימה, הפוספטים שבפוספוליפידים דוחים את הפוספטים שב-DNA, שאף הם טעונים מטען שלילי. פה "עולים על הבמה" כמה פקטורים חשובים. הפקטור הראשון הוא יוני Ca^{2+} , הנקשרים למטענים שליליים הן ב-DNA והן בממברנה של החיידק ומנטרלים אותם. היות וטרנספורמציה נעשית "על הקרח", הפקטור השני הוא הטמפרטורה הנמוכה, ה"מקרישה" את הממברנה הליפידית תוך ייצוב הפוספטים, ההופכים לנגישים יותר לסיכוך על-ידי יוני Ca^{2+} . הפקטור השלישי, והחשוב ביותר, הוא עלייה מהירה בטמפרטורה או heat shock. השוק התרמי גורם לחוסר איזון בין טמפרטורות בצדדיה השונים של הממברנה החיידקית, ובכך גורם להיווצרות של זרם חשמלי, שיחד עם הסיכוך היוני של Ca^{2+} , מאפשר ל-DNA הפלסמידי לעבור במהירות לתוך החיידק.

בשלב זה חשוב להקפיד על שתי נקודות: בשלב ה-heat shock, שניות ספורות מספיקות כדי לאפשר ל-DNA לחדור לתוך החיידק. לפיכך, אל תבצעו שוק תרמי של יותר מ-30 שניות. המשך המרבי של השוק התרמי הוא 45 שניות, ואם יימשך זמן רב יותר - יעילות הטרנספורמציה תפחת. כמו כן, אסור לבצע וורטקס של תערובת החיידקים עם ה-DNA הפלסמידי לפני ה-heat shock ובמהלכו. בפרוטוקול

הטרנספורמציה הקלאסית כתוב לערבב את ה-DNA הפלסמידי עם תאים קומפטנטיים ולהדגיר אותם במשך 30 דקות "על הקרח" לפני השוק התרמי (אפרופו 30 דקות - ניתן לקצר את השלב הזה לדקה אחת בלבד אם הפלסמיד הוא supercoiled). במשך 30 הדקות הללו, הפלסמיד מתקרב אט-אט לחיידק, נקשר לליפופוליסכריד שלו ונשאר שם עד לשלב ה-heat shock. אם נעשה וורטקס במהלך פרק הזמן הזה, נסלק את ה-DNA ה"דבוק" ממברנת החיידק – ונפגע ביעילות הטרנספורמציה.