



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

משאירים קצוות דביקים היכולים לעבור ליגציה זה לזה. למשל, אנזימי הרסטריקציה *BamHI*, *BclI* ו-*BglII* כולם משאירים לאחר החיתוך קצה 5' בולט שרצפו GATC. השילוב בין אנזימים אלה נעשה מהותי כאשר אחד האנזימים, כגון *BclI*, חסום במתילציה מסוג dam. במצב כזה, יש לחתוך את תוצר ה-PCR, שלעולם איננו ממותל, באנזים *BclI*, ולהכניס אותו לפלסמיד החתוך באנזימי *BamHI* או *BglII*, שאינם רגישים למתילציית dam. השיבוט יהיה מוצלח, אך האתרים יתבטלו ולא יהיה אפשר לשוב ולהשתמש בהם.

באילו אנזימי רסטריקציה אנו משתמשים?

ישנם ארבעה סוגים של אנזימי רסטריקציה, הנבדלים זה מזה במבנה, בתפקוד ובקו-פקטורים שלהם. לצורכי עבודה במעבדה, אנו משתמשים רק באנזימי רסטריקציה מסוג II, שבהם הרסטריקטאז והמתילאז, המזהה במדויק את אתר החיתוך וממתל אותו, הם שני חלבונים שונים. המתילאז נחוץ לחיידק כדי למנוע מאנזים הרסטריקציה שלו-עצמו לחתוך את הכרומוזום שלו. שימו לב לעובדה מעניינת: אנזימי הרסטריקציה הם תמיד דימרים, אך המתילאז שלהם, המזהה אף הוא את אתר החיתוך, הוא תמיד מונומר. הסיבה לכך פשוטה למדי - אנזימי הרסטריקציה חותכים תמיד DNA דו-גדילי ובעיקר רצפים פלינדרומיים, אך המתילאזות שלהם צריכים למתל רק גדיל אחד של ה-DNA, משום שאחד משני הגדילים (הוותיק יותר) כבר ממותל הודות לשכפול השמרני-למחצה.

חלק מאנזימי הרסטריקציה מסוג II הם קטנים מאוד, כדוגמת *PvuII* (157 חומצות אמיניות) וחלקם ענקיים, כגון *CjeI* (1,250 חומצות אמיניות), אך המשותף להם הוא שלפעולתם נדרשים יוני Mg^{2+} , אתרי ההכרה שלהם

החיידק, אך במהרה הבין שאנזים המזהה רצף של שישה בסיסים ב-DNA אינו יכול להשתתף ברקומבינציה. במכתב לעמיתו דניאל נתנס (Nathans), שהיה אז בשבתון במכון ויצמן ולמד לגדל נגיפי SV40, כתב סמית שהוא מפסיק לעבוד על האנזים. נתנס, לעומתו, סבר שיש לאנזים פוטנציאל, וכששב לארצות הברית, השתמש ב-*R* endonuclease כדי לבנות מפת רסטריקציה של גנום הנגיף SV40. זו הייתה המפה הראשונה מסוג זה בתולדות האנושות. כעבור שמונה שנים זכו שלושת החוקרים, ארבר, סמית ונתנס, בפרס נובל על חלקם במחקר זה.

כמה אנזימי רסטריקציה יש כיום?

בשנת 1975 נוסדה חברת NEB (New England Biolabs) וכעבור שנתיים, ב-1977, נוסדה חברת Fermentas. שתי אלה הן כיום החברות הגדולות ביותר לייצור ולשיווק אנזימי רסטריקציה. עד היום בודדו יותר מ-3,800 אנזימים שונים מסוג II (ראו להלן), המזהים וחותכים יותר מ-290 אתרי חיתוך שונים. למעלה מ-60% מאנזימים אלו התגלו ושובטו בחברות NEB ו-Fermentas. מן העובדה שכ-4,000 אנזימים חותכים כ-300 אתרי חיתוך נובע בהכרח, כי ישנם אנזימים שונים החותכים אותו אתר עצמו. ואכן, כך הוא. אנזימים החותכים אותו רצף DNA וצורת החיתוך שלהם זהה (כלומר, אחרי החיתוך נותרים קצוות זהים) נקראים איזוסכיזומרים (isoschizomers), ואילו אנזימים החותכים אותו אתר בצורה שונה נקראים ניוסכיזומרים (neoschizomers).

טיפ: אם אתם מבצעים שיבוט בעזרת אנזימי רסטריקציה שונים המזהים אותו אתר חיתוך, השתמשו תמיד באיזוסכיזומרים, שאם לא כן הליגציה לא תעבוד.

טיפ: בנוסף לאיזוסכיזומרים ולניאוסכיזומרים, ישנם אנזימים החותכים אתרים שונים, אך

אנזימי הרסטריקציה הם אנזימים המזהים רצפים ספציפיים ב-DNA דו-גדילי וחותכים אותו, אם בתוך אתר ההכרה ואם לידו. כיום איננו יכולים לתאר לעצמנו מקפא במעבדה ללא אנזימי רסטריקציה ואנזימים אחרים הפועלים על חומצות גרעין. אך לפני פחות מ-40 שנים, המצב היה שונה לחלוטין: ריצ'רד רוברטס, מראשוני החוקרים של אנזימי רסטריקציה ולימים חתן פרס נובל על מחקרו בשחבור RNA, ואחרים, שלחו מבחור קטן מאוד של אנזימי רסטריקציה לחוקרים מועטים בלבד. בטור זה ובהמשכו, שיופיע בגיליון הבא, אחלוק מידע וטיפים על השימוש באנזימי רסטריקציה, שהפכו בשנים האחרונות ל"סוסי העבודה" של הביולוגיה המולקולרית.

מפת הרסטריקציה הראשונה

מקור המילה "רסטריקציה" בתופעה שגילו החוקרים ג'ו ברטאני (Bertani) וסלבדור לוריא (Luria) לפני כשישים שנה (מצע גידול החיידקים LB, שהוא הנפוץ בעולם, נקרא על שם חוקרים אלה). לוריא וברטאני גילו שישנם בקטריופאגים שאינם יכולים להדביק זנים מסוימים של חיידקי *Escherichia coli*. לוריא וברטאני קראו לתופעה זו "רסטריקציה" או "הגבלה", אך לא הצליחו להסביר איך חיידק מגביל התרבות של פאגים. הם שיערו שהתופעה קשורה למצב הפיזיולוגי של החיידק. בתחילת שנות השישים בודד ואפיין ורנר ארבר (Arber) את אנזימי הרסטריקציה הראשונים, הנקראים כיום *EcoK* ו-*EcoB*. אך עד היום נותרו אנזימים אלה בלא שימוש, כיוון שאיננו יודעים כיצד הם חותכים את ה-DNA. בסוף שנות השישים גילה המילטון סמית (Smith) את האנזים *R* endonuclease, שמקורו בחיידק *Haemophilus influenzae*. שני מרכיביו של אנזים זה נקראים כיום *HindII* ו-*HindIII*. תחילה סבר סמית, כי בודד אנזים המשתתף ברקומבינציה הספציפית של



טבלה 2 הרכבת ריאקציית חיתוך באנזימי רסטריקציה

נפח			מרכיבי הריאקציה
DNA פלסמידי	תוצר PCR	DNA גנומי	
15 µl	16 µl	33 µl	מים (nuclease-free)
2 µl	3 µl	5 µl	בופר 10x
2 µl	3 µl	5 µl	בופר 10x FastDigest®
2 µl (up to 3 µg)	10 µl (~0.5 µg)	10 µl (up to 5 µg)	DNA
1 µl (5-10 units)	1 µl (5-10 units)	2 µl (10-20 units)	אנזימי רסטריקציה רגילים Old Fermentas, NEB, NEB HF _s , (Promega, Takara, Roche)
1 µl	1 µl	2-5 µl	אנזימי FastDigest®
20 µl	30 µl	50 µl	נפח סופי
15-60 דקות	60 דקות	60 דקות	משך החיתוך (אנזימי רסטריקציה רגילים)
5-10 דקות	5-15 דקות	5-15 דקות	FastDigest®

המציאו חוקרים אמריקאים, כדי לעשות הפסקות אוכל ארוכות. למעשה, 30 דקות של חיתוך מספיקות לאנזימי הרסטריקציה כדי לעשות את עבודתם. ואם אתם רוצים חיתוך ב-5 דקות בלבד, השתמשו באנזימי FastDigest® של חברת Fermentas.

טיפ: בהרכבת ריאקציית חיתוך, הוסיפו תמיד את אנזימי הרסטריקציה אחרון.

טיפ: כדי לבצע חיתוך מלא, ריכוז ה-DNA צריך להיות בטווח של 0.02-0.1 µg/µl. כלומר: כמות ה-DNA המינימלית בריאקציית חיתוך צריכה להיות 400 ng.

טיפ: לעולם אל תמהלו אנזימי רסטריקציה במים או ב-10X reaction buffer, כדי לא לגרום לעיכוב של האנזים.

טיפ: הקפידו שריכוזו הסופי של הגליצרוול לא יהיה גבוה מ-5%. עודף גליצרוול יגרום ל-star activity, וישנם אף אנזימים, כמו EcoRI ו-NcoI, הרגישים לאחוזי גליצרוול גבוהים ואינם חותכים היטב.

טיפ: אם אנזים לא חתך כלל, בדקו לכל הפחות שני דברים: אם קיים בכלל אתר חיתוך, ואם האנזים חסום ב-dam או ב-dcm methylation.

ד"ר יבגני ברדיצ'בסקי הוא מרצה בקורס "שיטות מחקר בסיסיות בביוכימיה מולקולרית" באוניברסיטת תל אביב ועובד בתמיכה טכנית בחברת תמר. כדי לשאול שאלות או להציע טיפים משלכם, אנא כתבו ל: yevgeny@tamar.co.il

משך החיתוך: הפסקת אוכל

כמה זמן צריך לחתוך DNA? בכמה מיקרוגרמים של DNA יש להשתמש לחיתוך? בכמה יחידות (units) של אנזימי רסטריקציה יש להשתמש? אלו השאלות שאנו שואלים מישהו מנוסה בטרם נעמיד ריאקציית חיתוך בפעם הראשונה. אני מקווה שטבלה 2 תסייע לכם להתמודד עם שאלות אלה.

בטבלה מופיעה גם משפחה של אנזימים חדשים הנקראים FastDigest®, מתוצרת חברת Fermentas. כל האנזימים האלה (176 במספר) חותכים את ה-DNA בתוך 5 דקות בלבד, וכולם פועלים בבופר אחד המתאים לכל 176 האנזימים, ללא שום "star activity" (על תופעה זו, הנקראת גם relaxed specificity, נרחיב בחלקו השני של הטור, בגיליון הבא).

את נפח ה-DNA בריאקציית החיתוך ניתן להעלות עד 10 µl או להוריד עד 0.5 µl, בהתאם לריכוז ה-DNA. יש לתקן את נפח המים בהתאם.

טיפ: את החיתוך במשך שעה עד שעתיים

הם בעיקר רצפים פלינדרומיים באורך 4-8 בסיסים, ולרוב הם חותכים DNA בתוך אתר ההכרה או בקרבתו.

שמות משונים

לחלק מהרסטריקטאזות שמות מוזרים ביותר, שקשה לבטאם - NmuCI, TscAI, HpyF10VI ואחרים. הסיבה לכך היא הנומנקלטורה של שמות מערכות הרסטריקציה והמודיפיקציה, שהציעו סמית ונתנס ב-1973. על פי נומנקלטורה זו, שמות האנזימים מציינים את שם החיידק שבו נמצאו. בטבלה 1 מתוארת גזירת שמו של EcoRI.

שימו לב שרק אות אחת משם הסוג נכללת בשם האנזים, ואילו משם המין נכללת בשם האנזים שתי אותיות. האותיות שמקורן בשם הסוג ובשם המין נכתבות באות נטויה, כי הן שייכות לשמו הלטיני של החיידק. לדוגמה, האנזים הראשון שיתגלה בחיידק Streptomyces exfoliatus מין Y ייקרא פשוט SexyI.

טבלה 1 גזירת שם האנזים EcoRI

תיאור	שם	קיצור
סוג	Escherichia	E
מין	coli	co
זן	RY13	R
המספר הסיידורי של אנזימי הרסטריקציה שזוהו בחיידק הזה	זוהו לראשונה	I