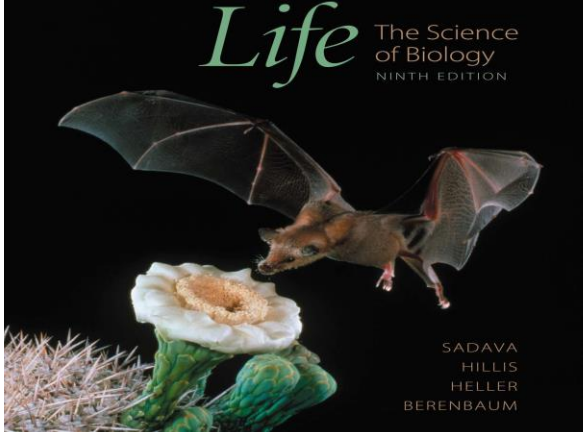


ביולוגיה 1

הנדסה גנטית

דר' אורנה עטאר

היחידה לנוער שוחר מדע

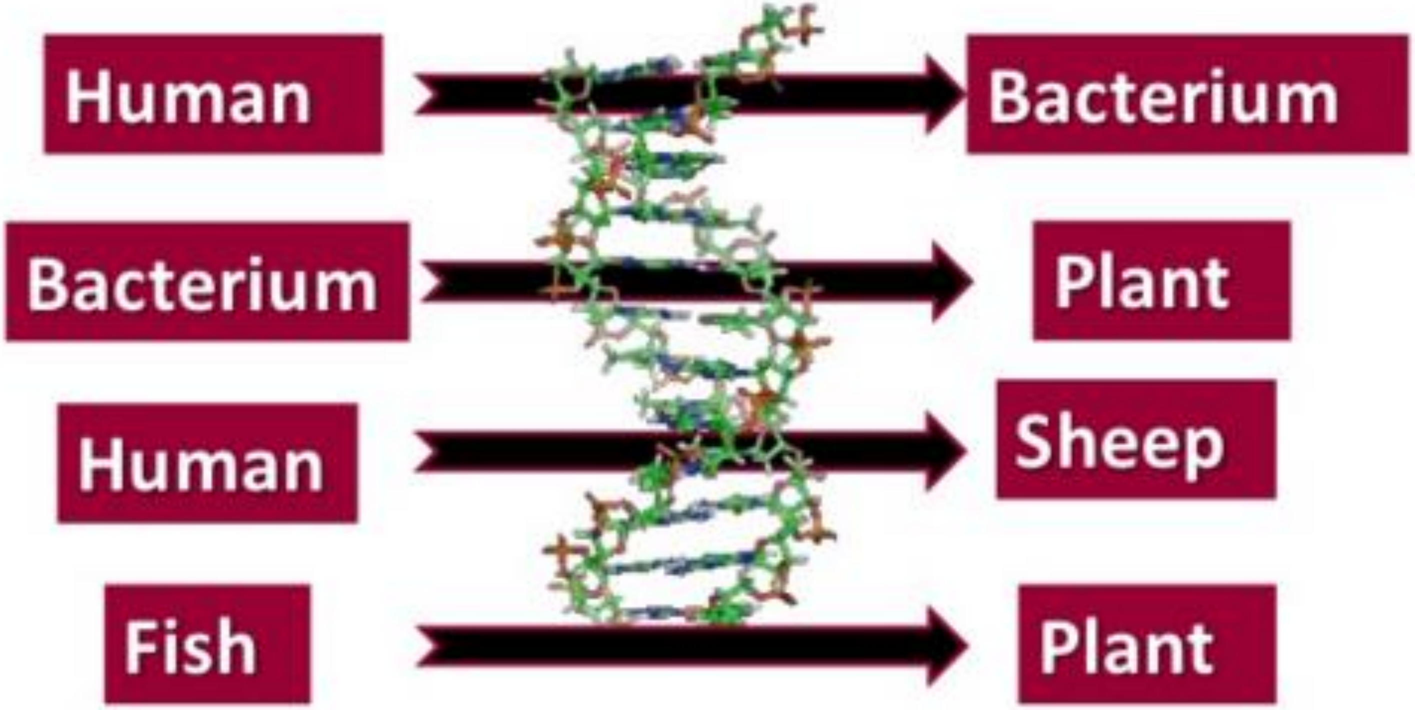
הטכניון
מכון טכנולוגי לישראל

הנדסה גנטית

הנדסה גנטית היא תהליך של שינוי גנים ביצורים חיים באופן מלאכותי על ידי האדם ובכך שינוי תכונותיהם. (וויקיפדיה)

Genetic engineering:

- is the process by which pieces of DNA are transferred from one organism to another

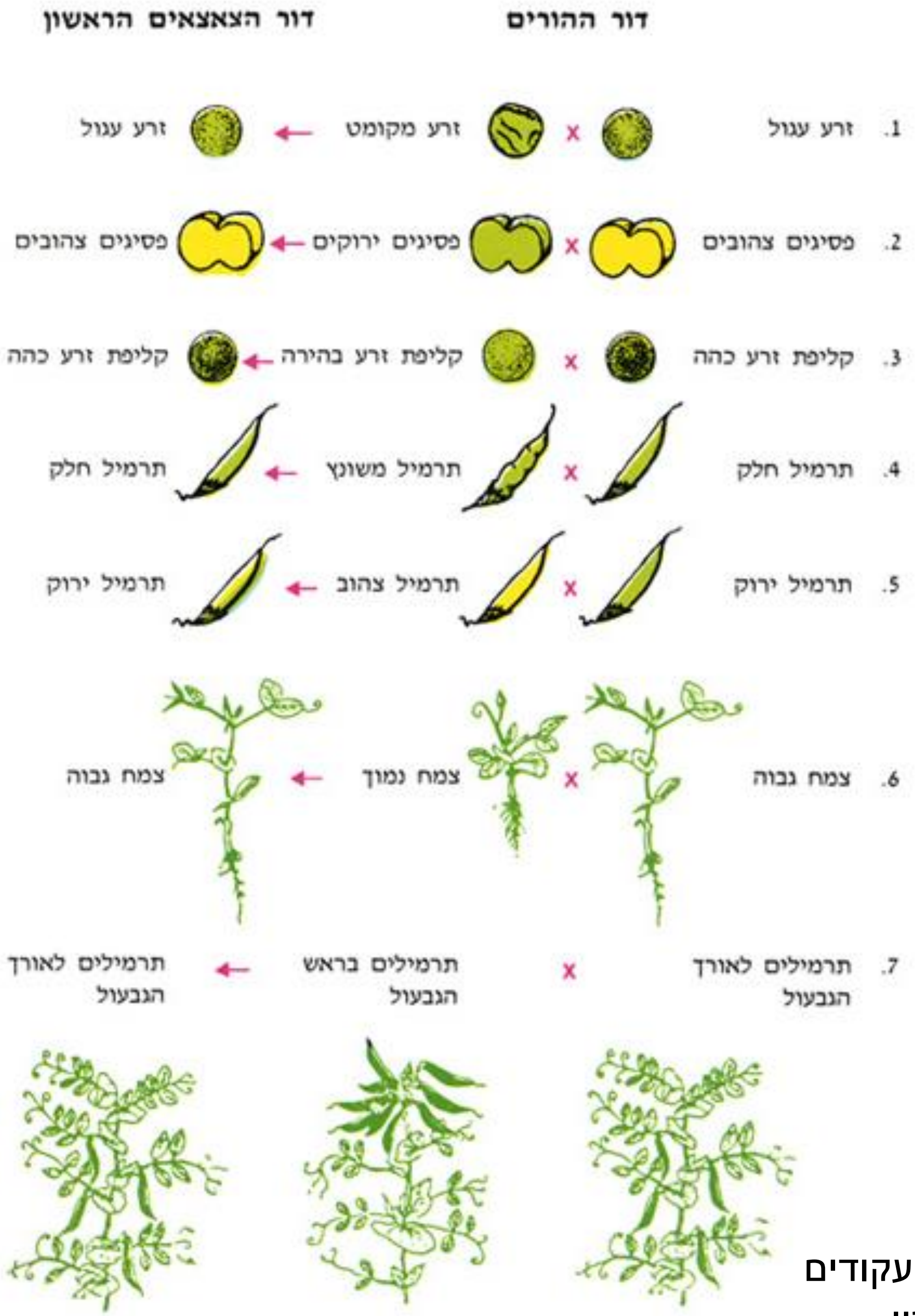


Tobacco plant
glows in the dark
[1986]

Gene taken
from a firefly

מה עשו בעבר?

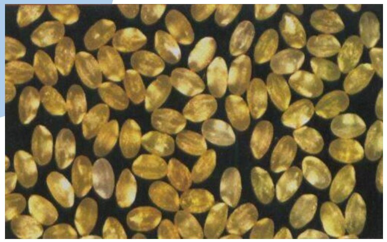
- הכלאות -



בראשית ל" – ויסר ביום ההוא את התישים העקודים
והטלואים ...כל אשר לבן וכל חום יתן בידי בניו

הנדסה גנטית

- תעשייה
- רפואה
- חקלאות
- אומנות
- מחקר



דוגמאות להנדסה גנטית

רפואה:

- ייצור חומרים עם מטרה רפואית בחיידקים ושמרים:
  אינסולין (לחולי סכרת).הורמוני גדילה. חיסונים. נוגדנים וחומרים נוספים עם מטרה רפואית
- ייצור חיסונים, תרופות ונוגדנים בבע"ח (עזים, פרות)
- ריפוי גנים – שליטה על גנום האדם בטיפול במחלות

מחקר:

- יצירת חיות (בעיקר עכברים) המשמשות מודל לבני אדם לחקר – השמנה, מחלות לב, סכרת
- מחקר על פעילות גנים והשפעתם: מחקר על השפעת חומרים על תאים

תעשייה:

- ייצור בכמות תעשייתית של:
  חלבונים. אנזימים. אינסולין, הורמונים וחיסונים
- ייצור ביו-דלק
- ניקוי זיהומים באוקיינוסים
- זיהוי של חומרים במים (כמו ארסן)

חקלאות:

- צמחים ובע"ח מהונדסים גנטיים למטרת:

הגנה מפני תנאי הסביבה
הגנה מפני חרקים ומזיקים
הגנה מפני וירוסים
הגדלת כמות התוצרת החקלאית
הגדלת איכות התוצר (טעם, ערכים תזונתיים...)

אומנות:

- חיידקים צבעוניים וזוהרים
  - דגים זוהרים
  - ורדים סגולים
  - פרחי ציפורן בצבע לבנדר

מהפכות ביולוגיות

המטרה האולטימטיבית של הביולוגיה המודרנית היא להסביר את החיים במונחים מולקולריים.

המהפכות שאפשרו זאת:

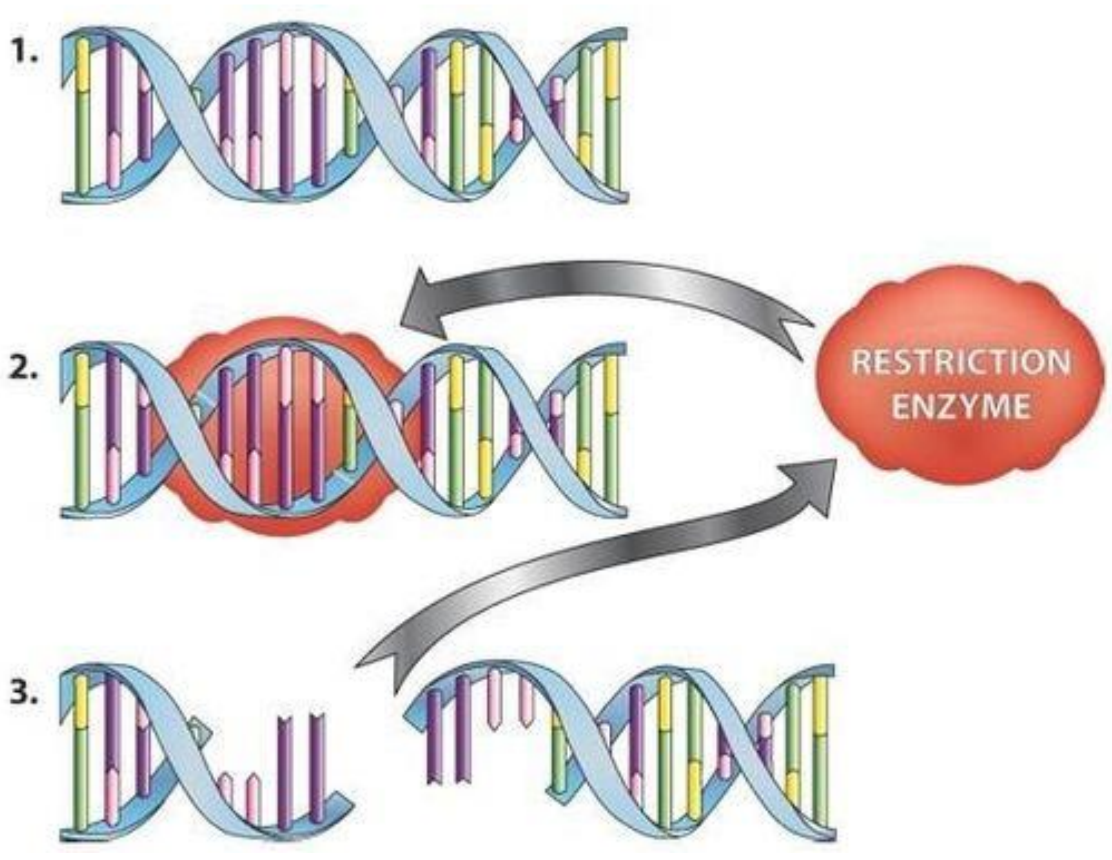
1. ההנדסה הגנטית ששינתה את שפת הביולוגיה מתיאורית למולקולרית.
היא מבוססת על העיקרון ש:

לכל התאים בעולם יש מנגנון אחיד לביטוי גנים קרי, ליצירת חלבונים.

2. הספיקה הגבוהה שאפשרה לסרוק רצפים של גנומים.

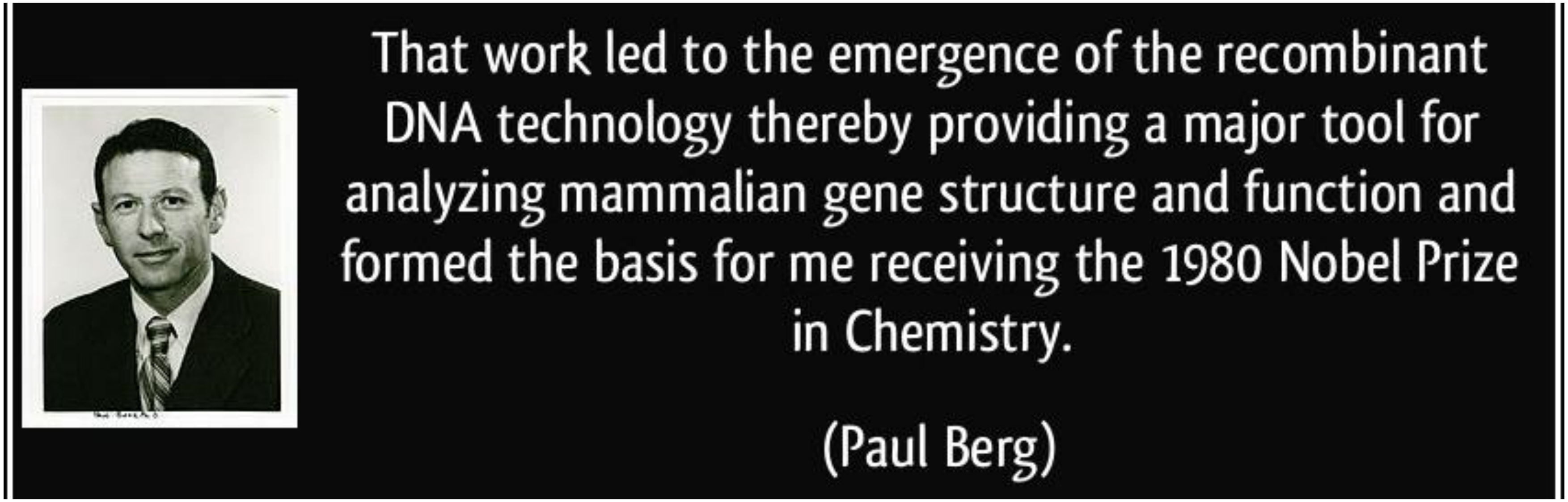
גילויים מרעישים

- בשנת 1968- Werner Arber ובשנת 1970 - Hamilton Smith גילו את האנזימים שמזרזים חיתוך רצפים ייחודיים ב-DNA. (על כך זכו בפרס נובל ב 1978)



גילויים מרעישים

- ב 1972 Paul Berg מאוניברסיטת סטנפורד – חיתוך DNA המכיל גן מבקטריופאג', הכנסתו לוירוס של קופים וקבלת ביטוי בתאי קופים. זהו ה DNA הרקומבינטי הראשון. (על תגלית זו זכה בפרס נובל לכימיה ב 1980)



Genentech

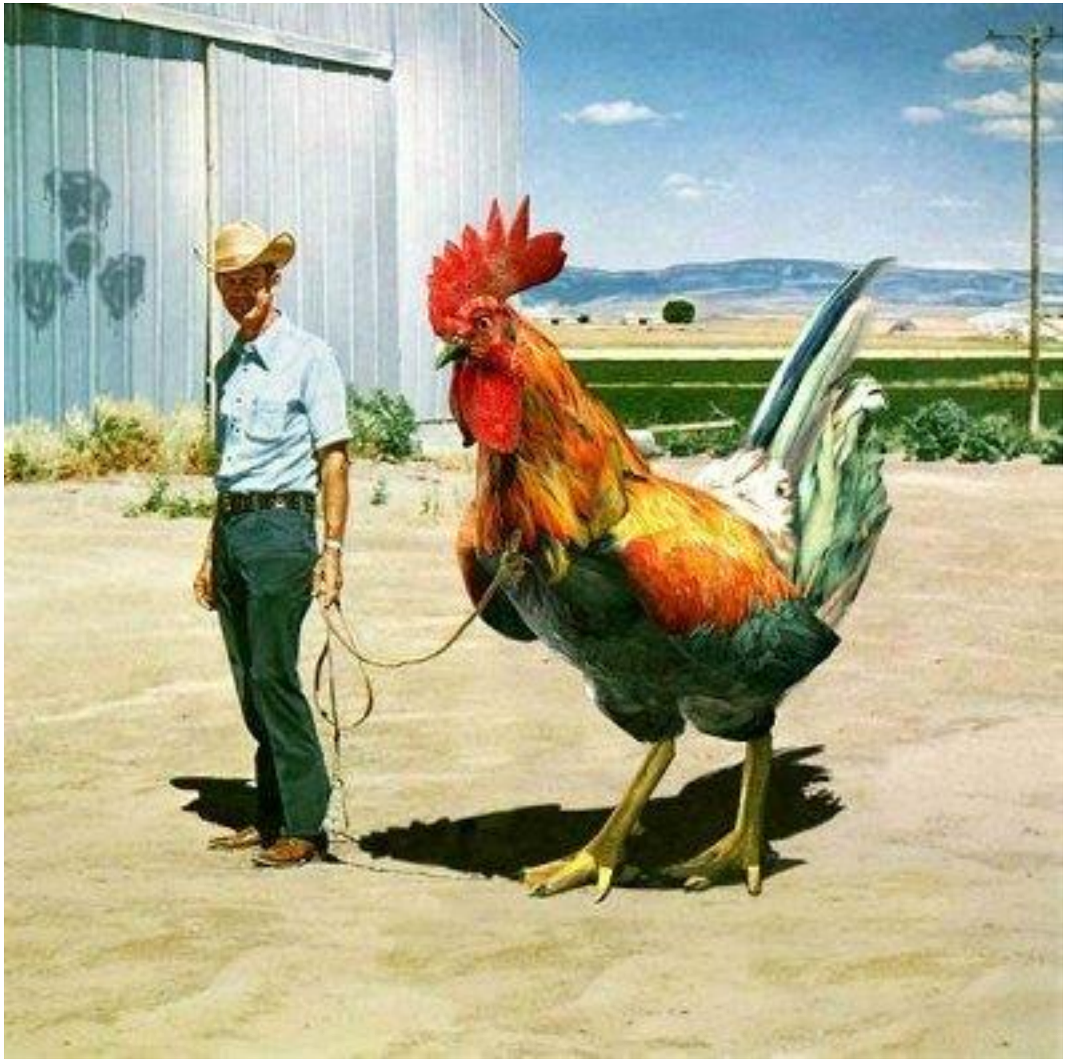
- Founded in 1976 by biochemist Herbert Boyer - pioneer of the recombinant DNA technology
- Considered to have founded the modern biotechnology industry.
- First to express a human proteins in bacteria:
  - somatostatin (hormone)
  - Insulin (1978)

שיבוט- תהליך בו מבטאים עותקים מדויקים של גן או גנים של אורגניזם אחד באחר.

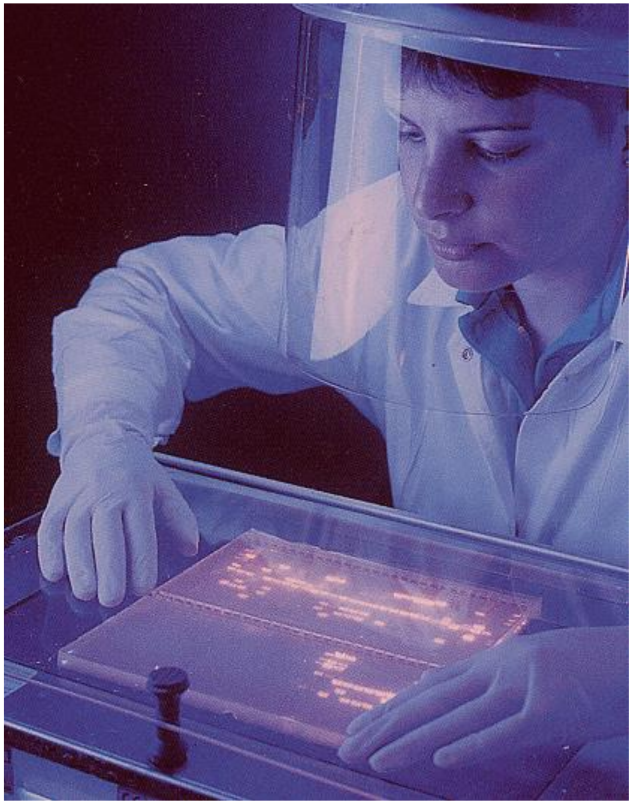
לדוגמא: הגן המקודד במדוזה מסויימת לחלבון זוהר (פלואורסנטי) שובט לתוך חיות וצמחים

- **חיידק או כל תא אחר המבטא גן זר נקרא טרנסגני (transgenic).**

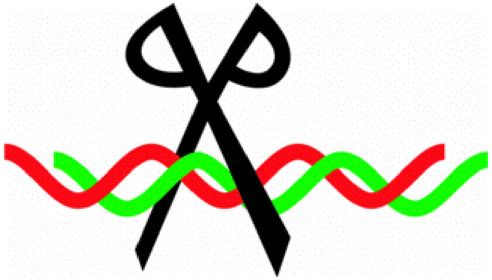
שיבוט הורמוני גדילה



ההנדסה הגנטית עוסקת במניפולציות גנטיות



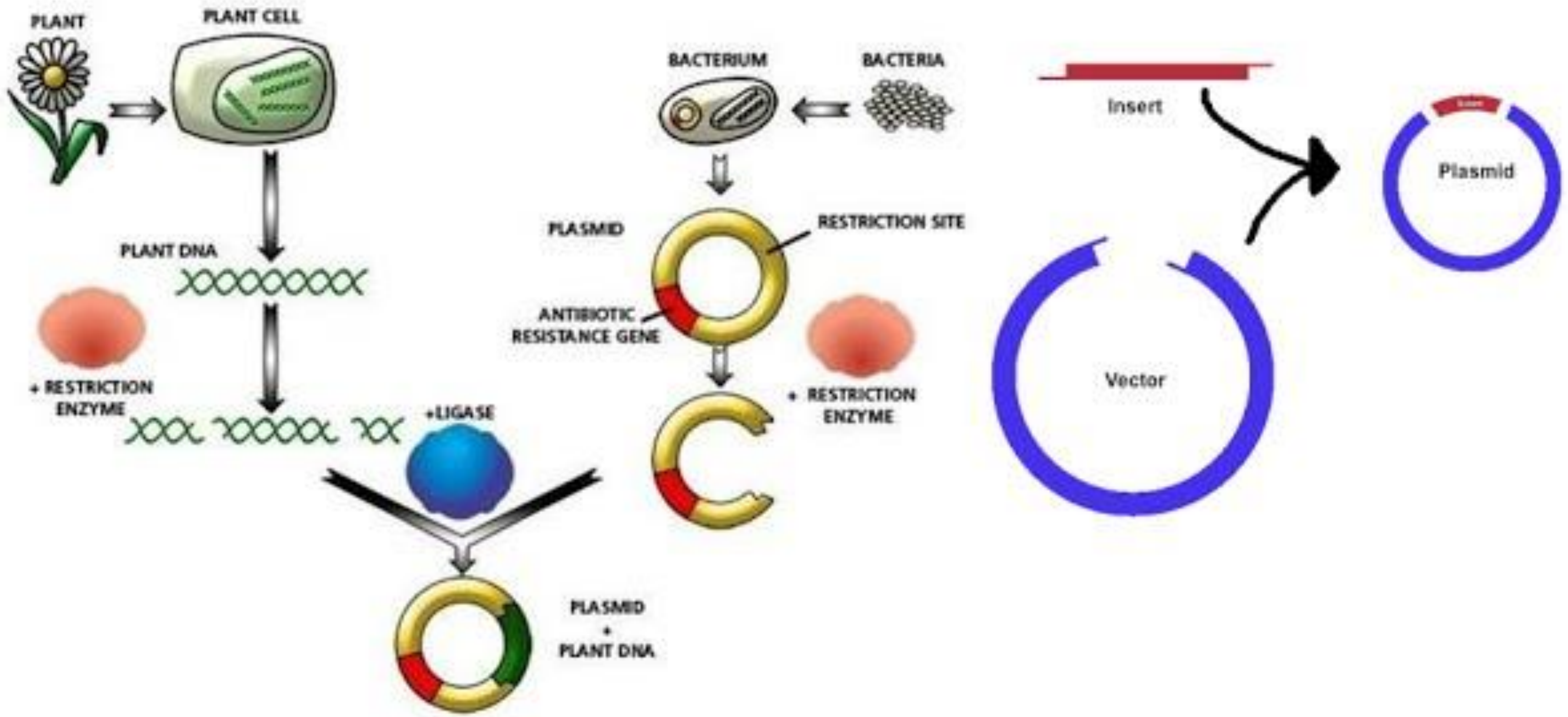
הביוטכנולוגיה מיישמת השיטות שפותחו במעבדה לתעשייה



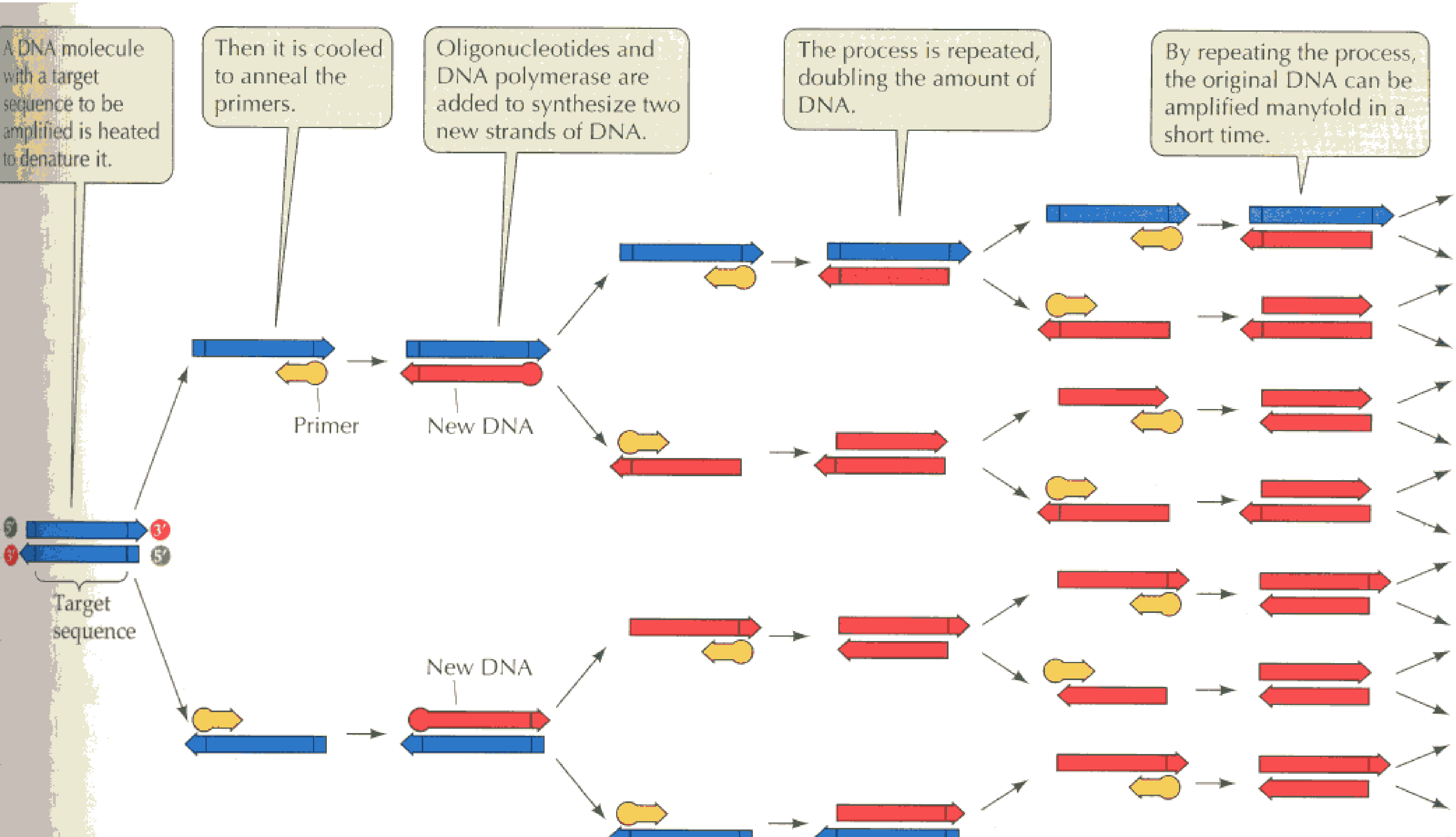
תהליך השיבוט

- הגברת המקטע הרצוי
- הכנת המקטע להכנסה לפלסמיד ביטוי
- טרנספורמציה לחיידקים
- בדיקת נוכחות הגן המשובט בחיידק

DNA CLONING


PLANT
PLANT CELL
PLANT DNA
+ RESTRICTION ENZYME
+LIGASE
PLASMID + PLANT DNA
BACTERIUM
BACTERIA
PLASMID
RESTRICTION SITE
ANTIBIOTIC RESISTANCE GENE
+ RESTRICTION ENZYME
Insert
Plasmid
Vector

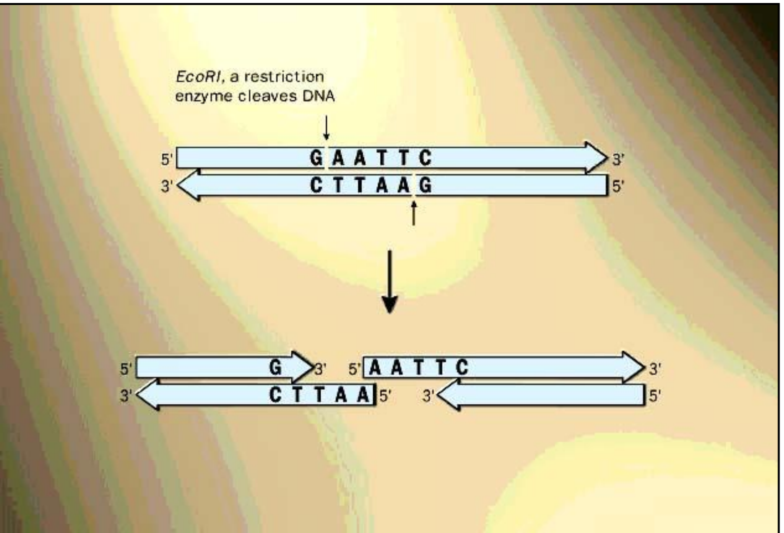
הגברת מקטעי דנ"א באמצעות PCR



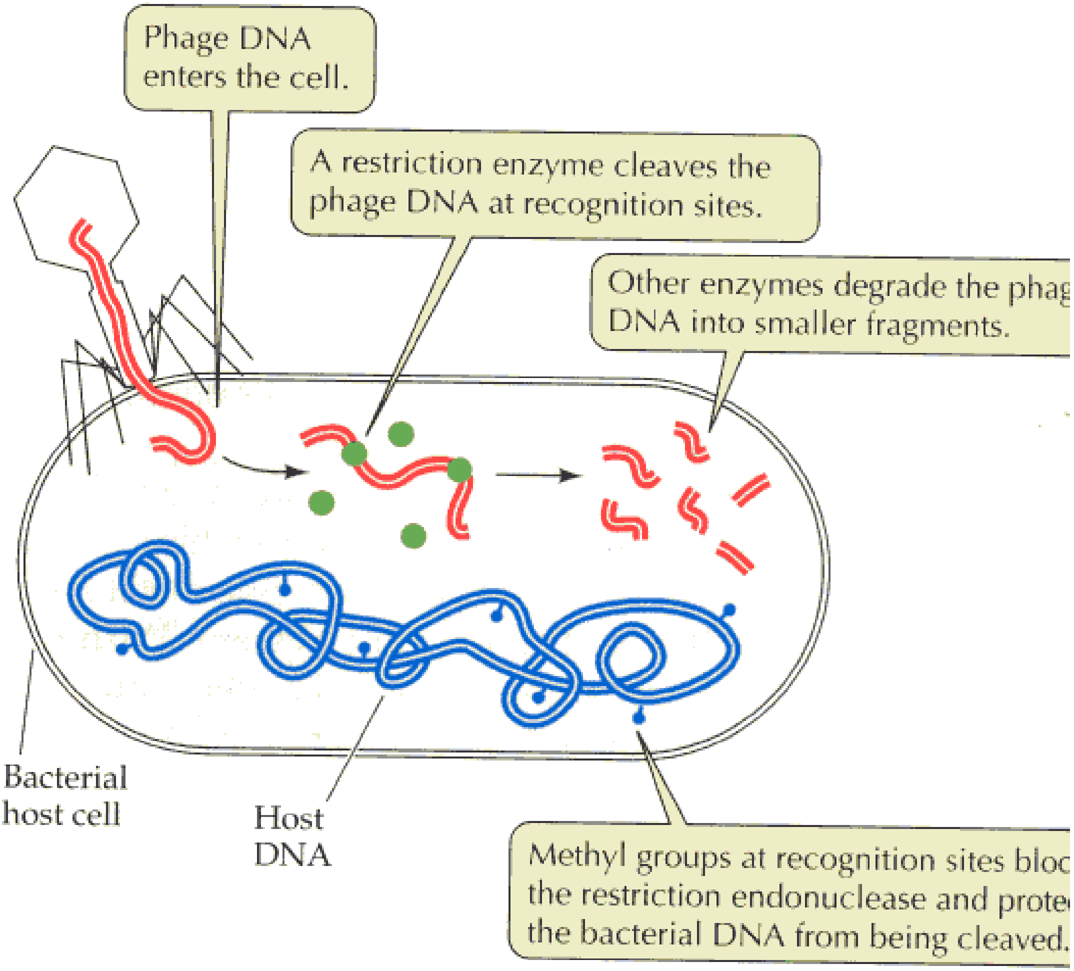
6.12 The Polymerase Chain Reaction
The steps of this cyclic process are repeated many times. PCR is the method

אנזימי הגבלה/רסטריקציה (restriction enzymes)

- אנזימים שחותכים DNA ברצף ספציפי בלבד
- מיוצרים ע"י חיידקים כמנגנון הגנה מפאג'ים
- חשיבות מיוחדת לאנזימים החותכים רצפים שהם לרוב פלינדרומים ("חזרות במהופך") ויוצרים לעיתים קצוות היכולים להידבק זה לזה (sticky ends)
- בעזרת DNA ליגאז ניתן לחבר קצוות של שתי מולקולות DNA ובכך ליצור DNA היברידי

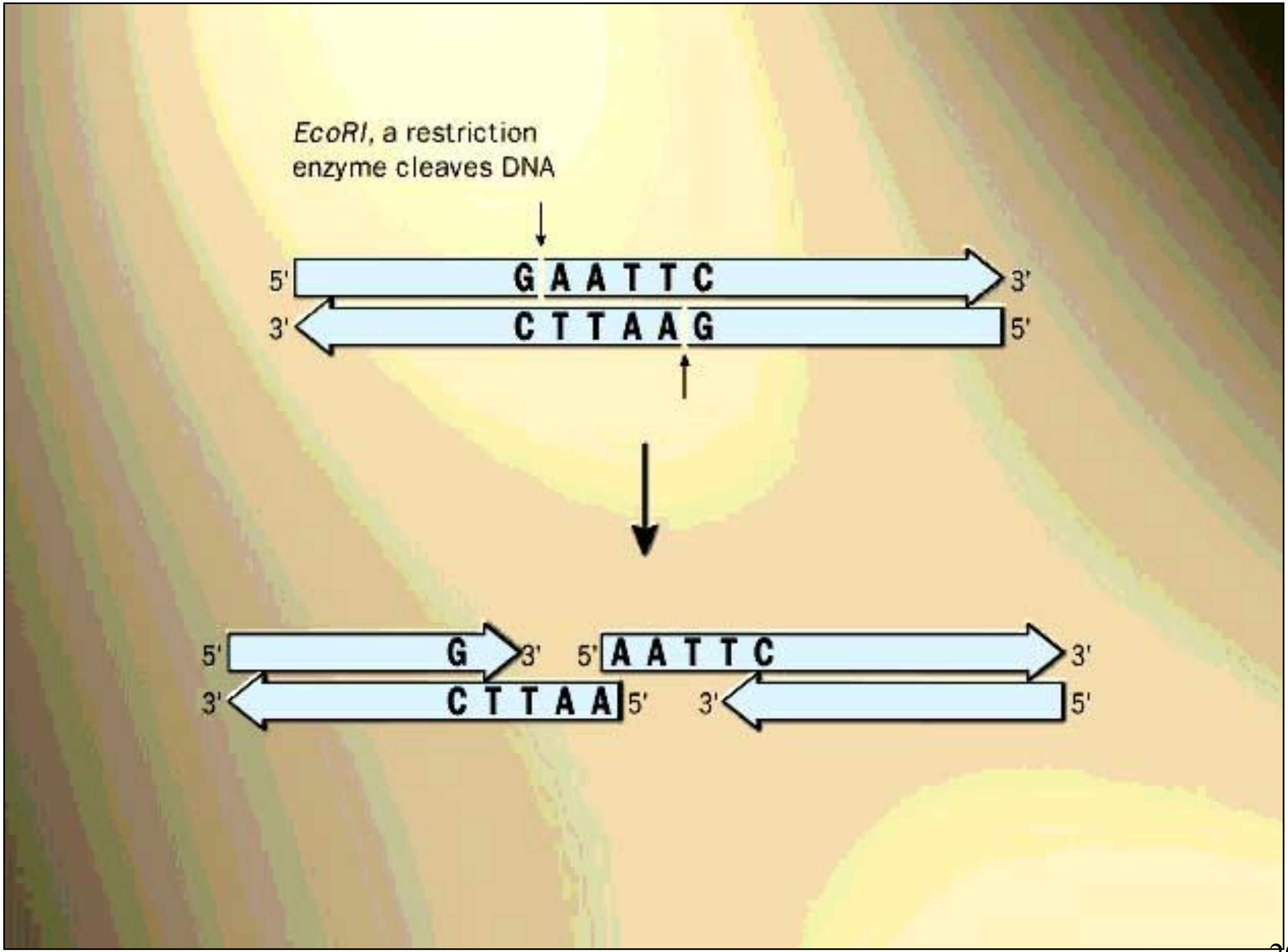


אנזימי ההגבלה מזהים דנ"א זר ומגיבים בהתקפת נגד על ידי חיתוכו של הדנ"א הזר מבלי לפגוע בדנ"א של החיידק (הממותל)



מכיוון שהאנזימים האלה מגבילים את יכולת ההתקפה של הפולש הזר הם נקראים "אנזימי הגבלה" (restriction enzymes)

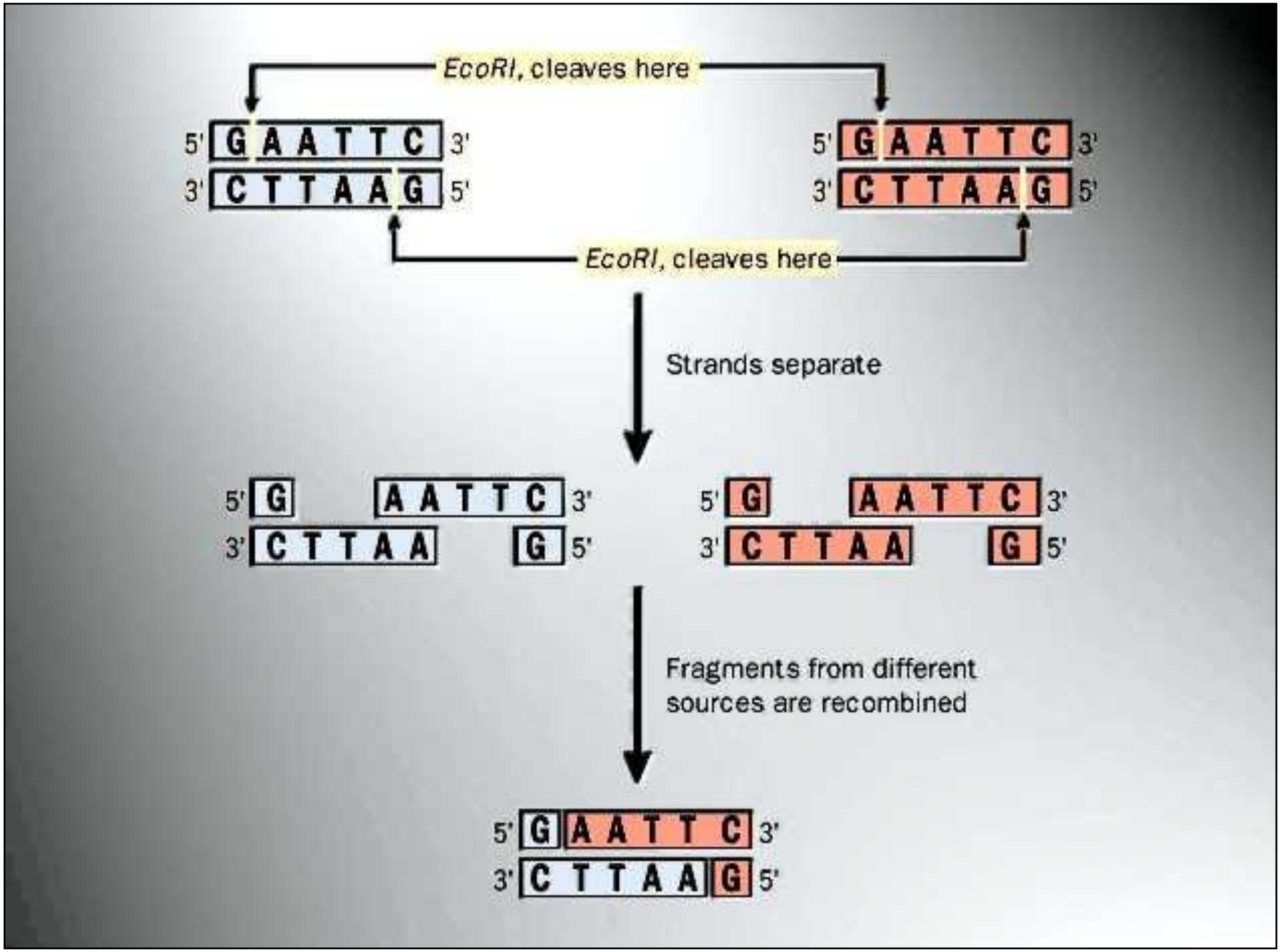
חיתוך על ידי אנזים הרסטריקציה EcoRI



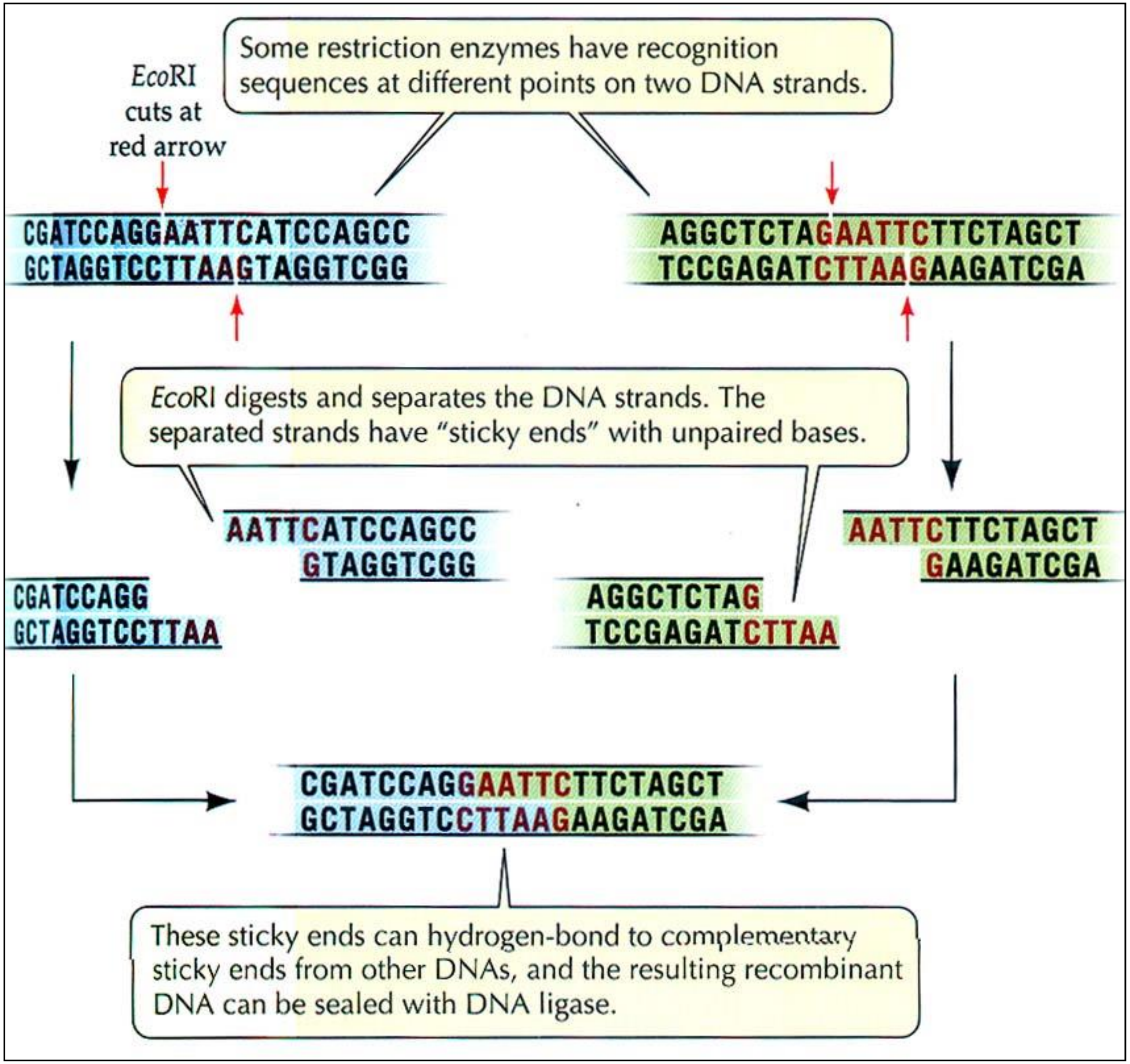
Endonuclease	DNA sequence	Cleavage products	
Bam HI	GGATCC CCTAGG	G GATCC CCTAG G	"Sticky" ends
Eco RI	GAATTC CTTAAG	G AATTC CTTAA G	"Sticky" ends
Hind III	AAGCTT TTCGAA	A AGCTT TTCGA A	"Sticky" ends
Hae III	GGCC CCGG	GG CC CC GG	Blunt ends
Pst I	CTGCAG GACGTC	CTGCA G G ACGTC	"Sticky" ends
Sma I	CCCGGG GGGCCC	CCC GGG GGG CCC	Blunt ends

Some Endonucleases

תכונה זו יכולה להיות מנוצלת לחיתוך והדבקת DNA

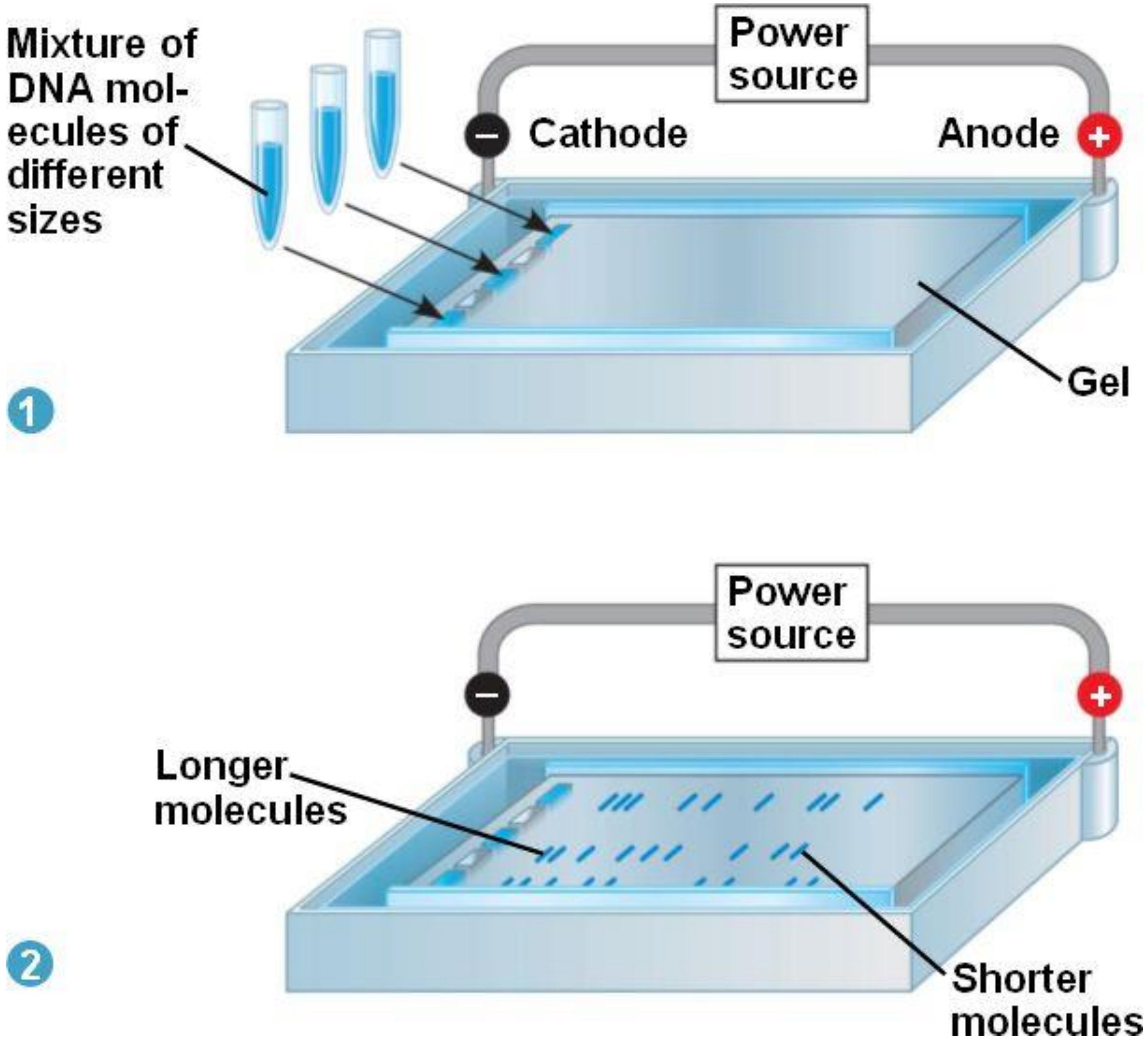


דוגמה: הוצאת מקטע מ-DNA בין שני אתרי EcoRI



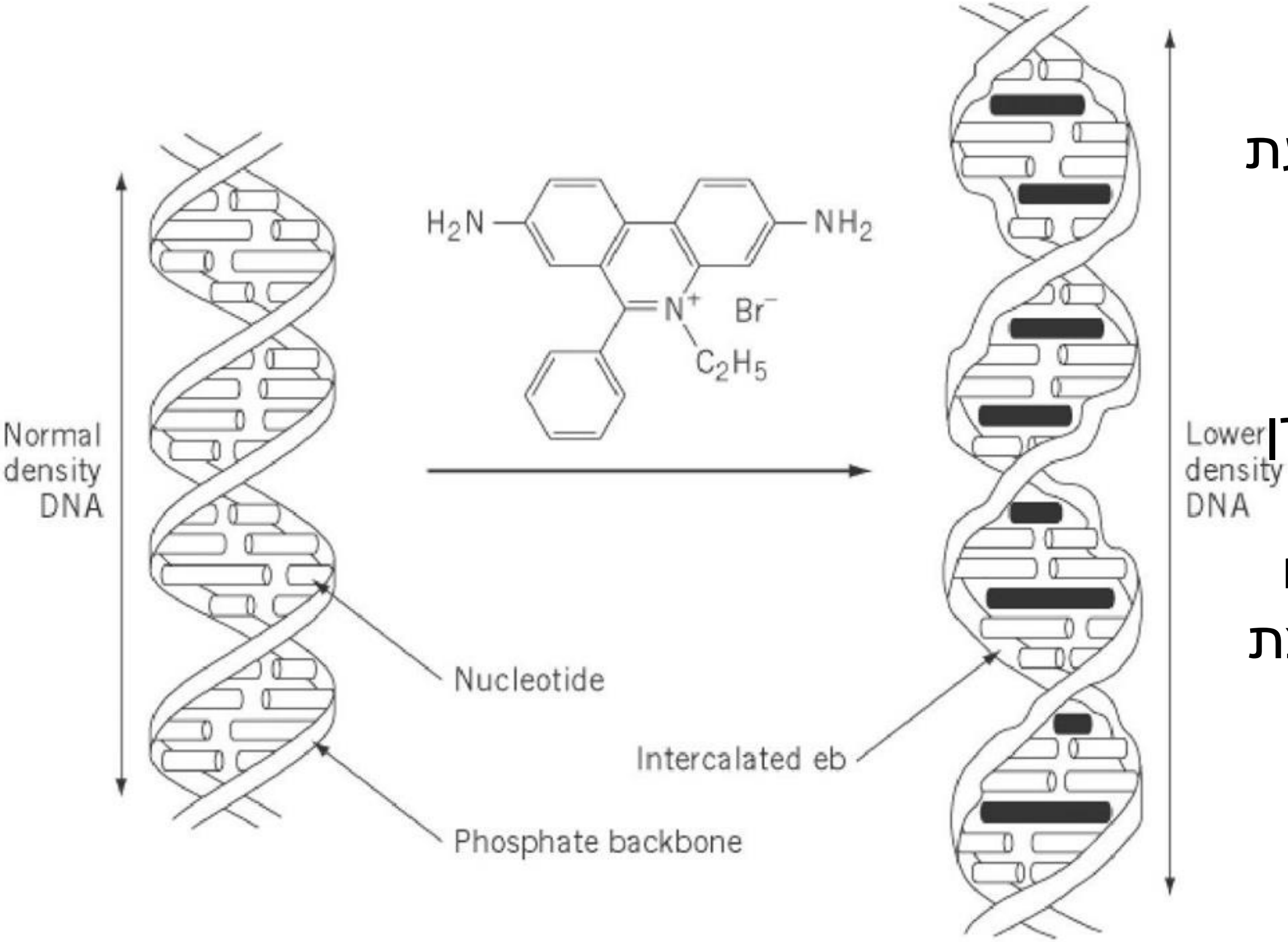
איך נדע איזה מקטע בידנו? האם נחתך או לא?

ויזואליזציה של DNA - ג'ל אלקטרופורזה



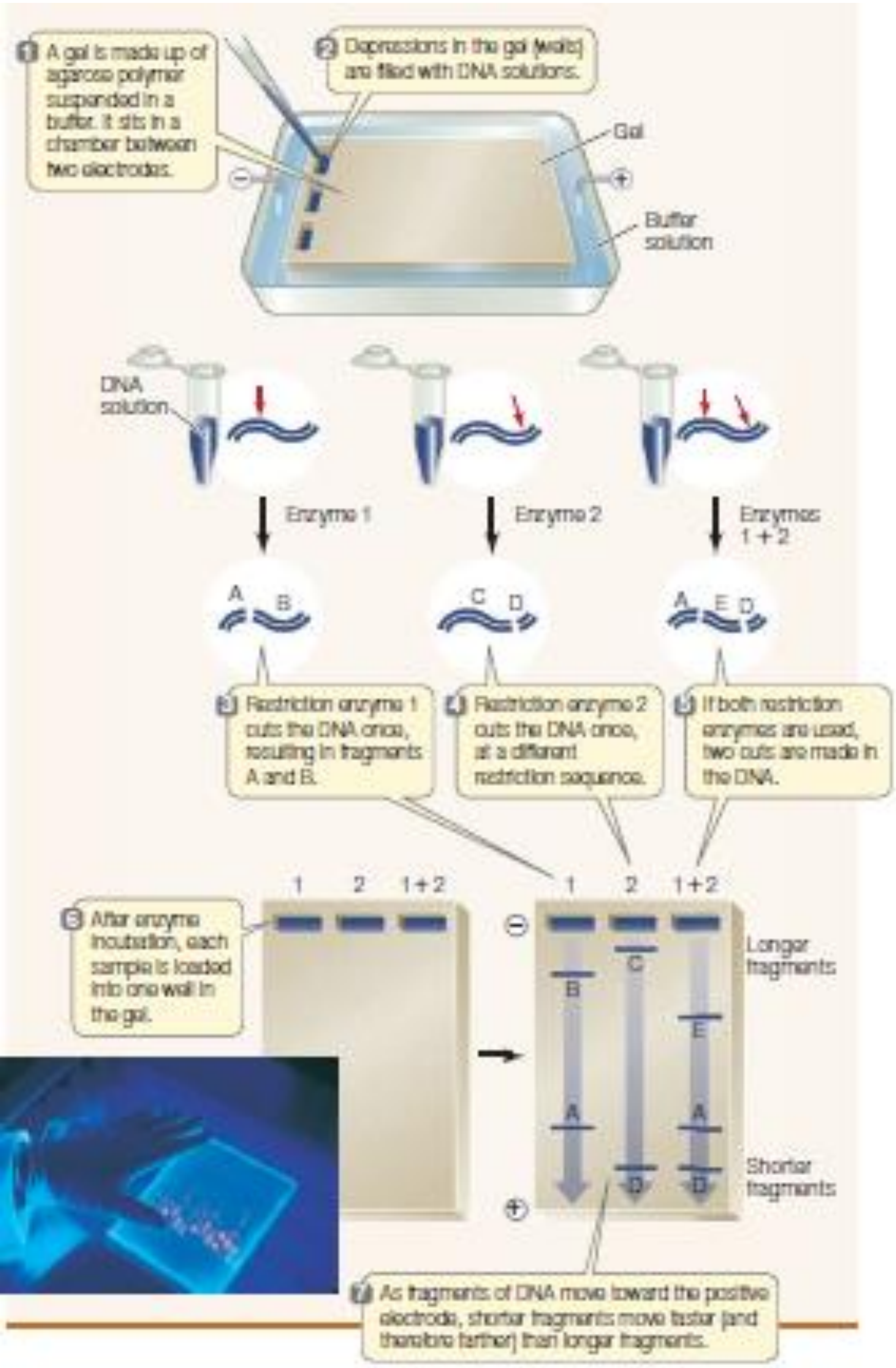
- איך נראה את הDNA בג'ל?

אתידיום ברומיד (קרצינוגן)



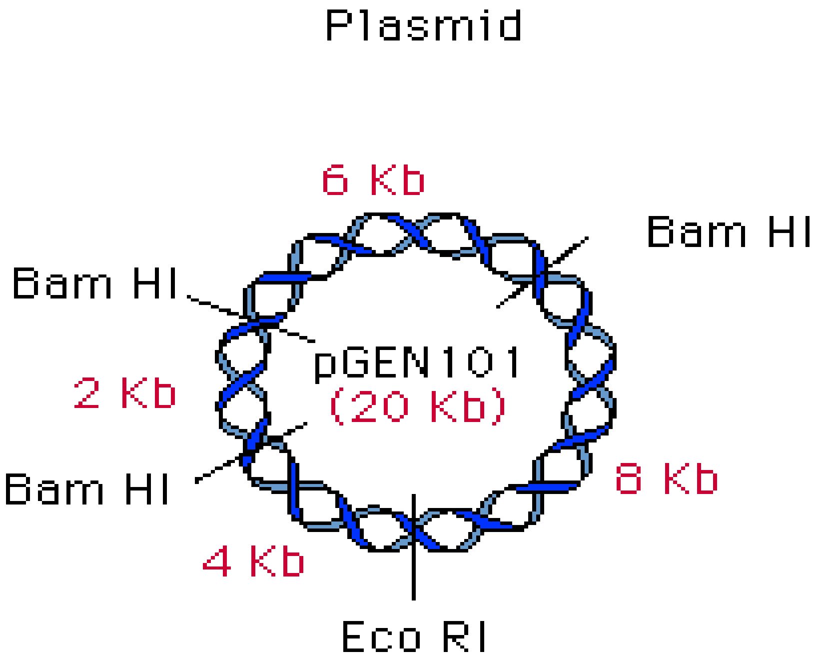
- תרכובת אורגנית פלורסנטית המשמשת לצביעת חומצות גרעין
- נכנס בין בסיסי הדנא הדו גדילי
- זורח כאשר מוקרן באור UV
- מוסיפים אתידיום ברומיד לג'ל הרצת DNA

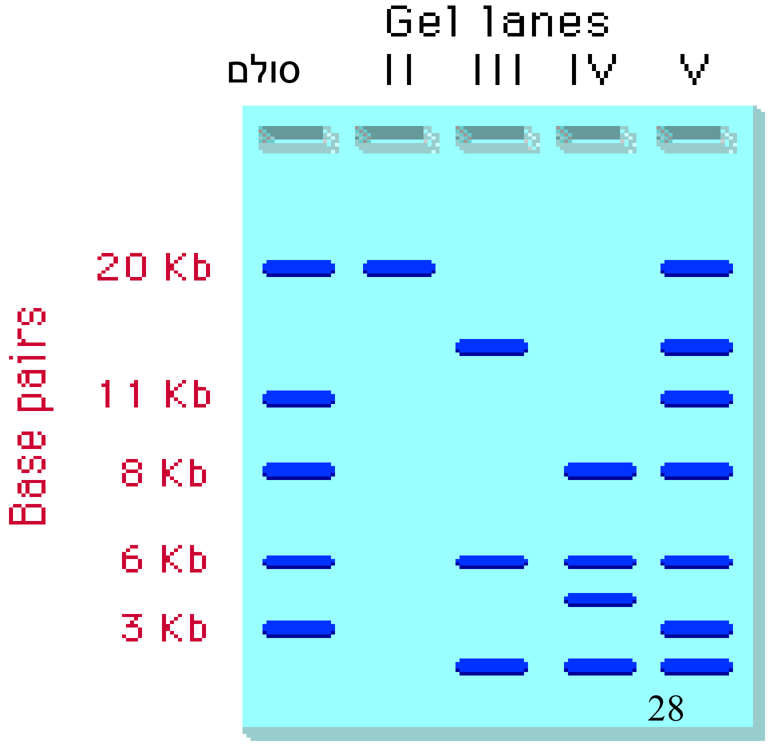
ג'ל אלקטרופורזה



ג'ל אלקטרופורזה- תרגול

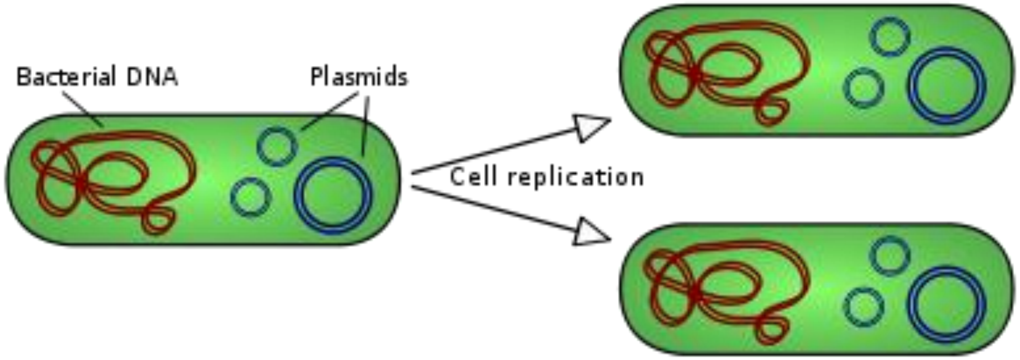
לפניכם DNA מעגלי עם אתרי רסטריקציה לBamHI ולEcoRI
מספר חיתוכים באנזימי הרסטריקציה נעשו עם אנזימי הרסטריקציה- ביחד או לחוד.
איזה ערוץ מראה את החיתוך ב-BamHI לבד?
איזה ערוץ מראה את החיתוך בEcoRI לבד?





שיבוט בעזרת פלסמידים

- כדי לשבט גן מסוים, יש לחבר את הגן למולקולה שיש לה יכולת שכפול עצמי.
- על ידי חיתוך והדבקה (ליגאז)- מחברים למולקולה כזו את הגן, והיא משכפלת את הגן יחד עם השכפול שלה.
- נשא (vector) -מולקולת דנ"א בעלת יכולת שכפול, המסוגלת לשאת בתוכה מקטע של דנ"א זר.
- פלסמידים- הנשאים הראשונים ששימשו לשיבוט מלאכותי של מקטעי דנ"א.
- היום אין הבדל בין המינוחים

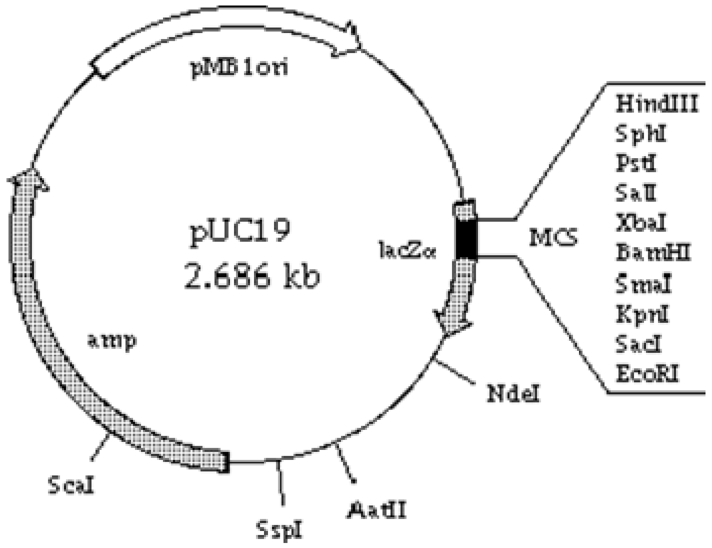


שיבוט בעזרת פלסמידים

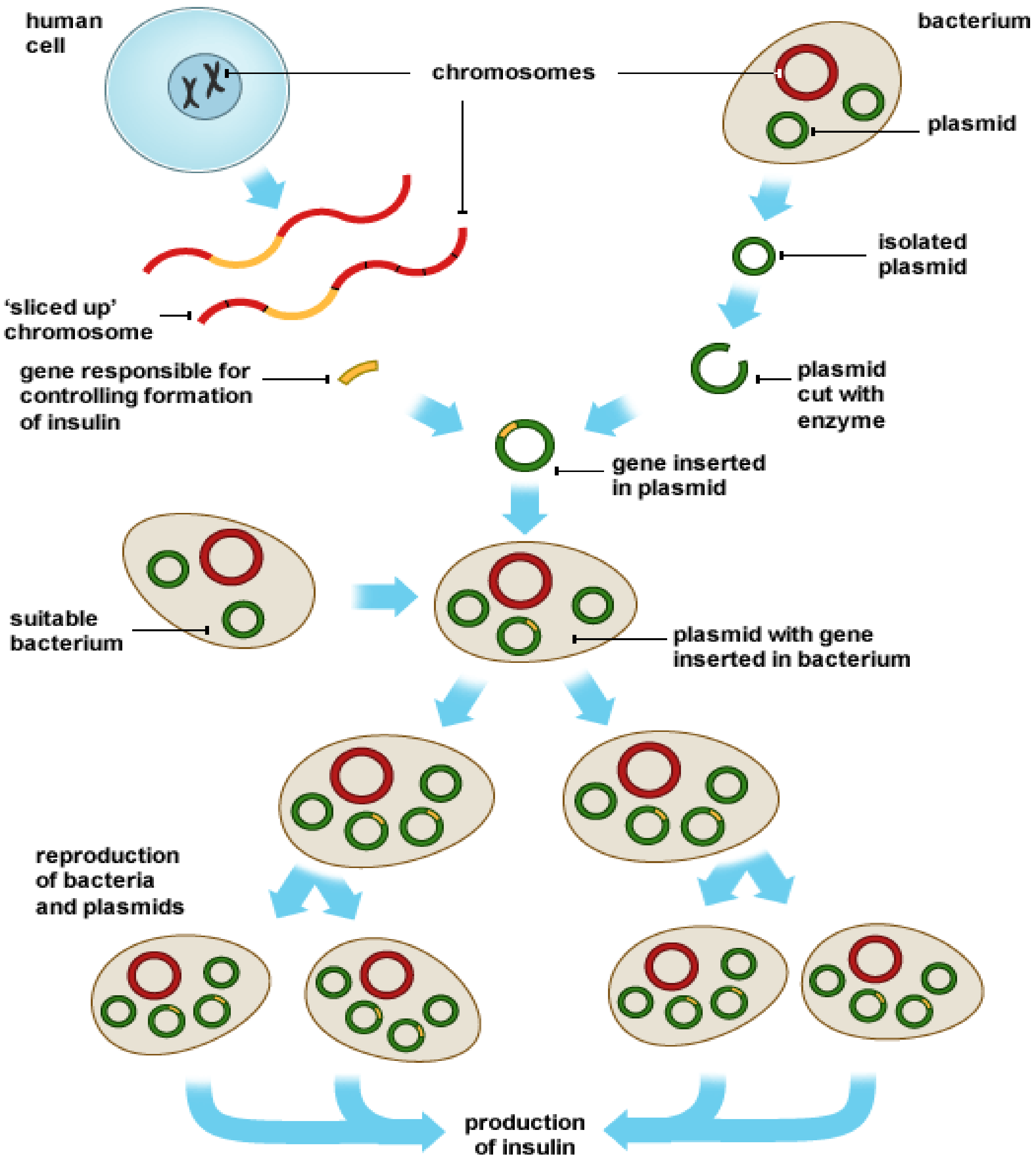
- **<u>פלסמיד-</u>** DNA מעגלי קטן המתרבה בחיידק באופן אוטונומי למאות עד אלפי עותקים ומקנה לחיידק תכונות שונות (כמו עמידות לאנטיביוטיקה).
- משמשים בהנדסה גנטית לשיבוט ואמפליפיקציה של DNA זר המוחדר אליהם באזורים בלתי חיוניים.

הפלסמיד מכיל:

- MCS (Multiple Cloning Site) – אזור אליו משובט הגן
- ORI (Origin of Replication) – אזור תחילת הכפלה
- גן לסלקציה (לרוב ע"י עמידות לאנטיביוטיקה)

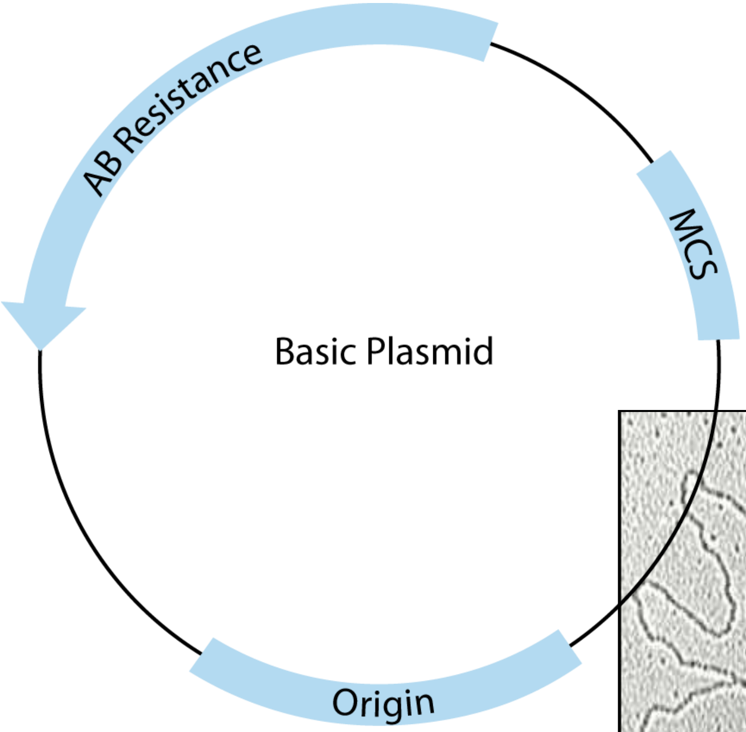


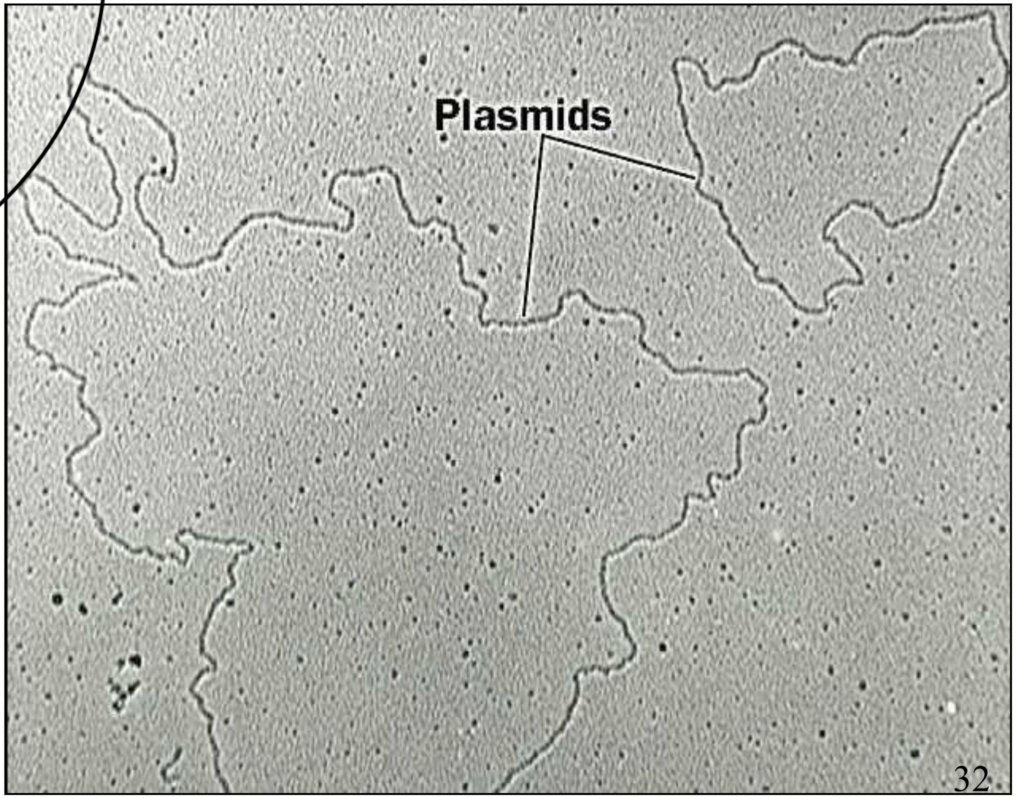
שיבוט בעזרת פלסמידים- דוגמא



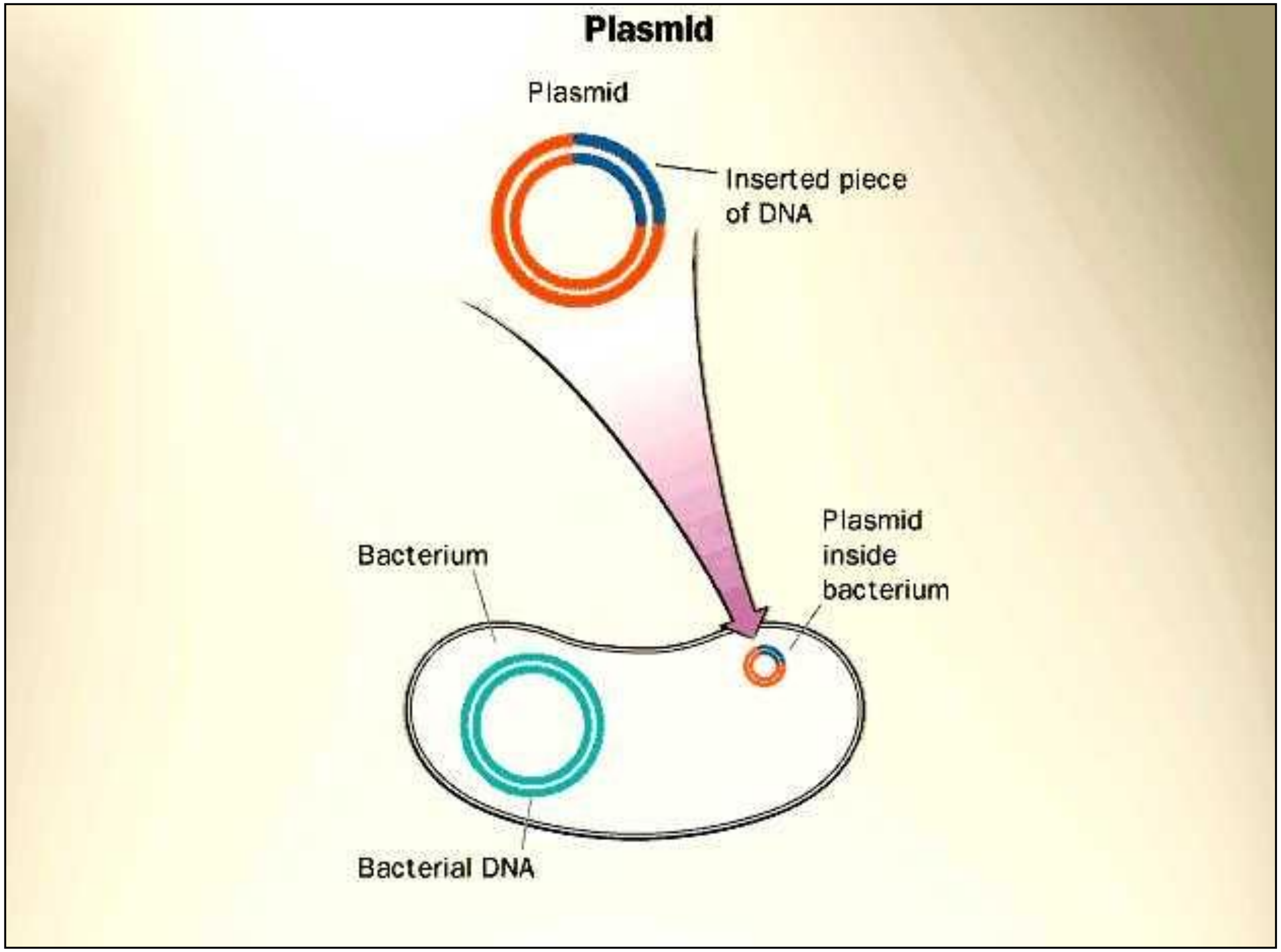
יצירת אינסולין הומאני
בתאי חיידקים

שיבוט בעזרת פלסמידים





שיבוט בעזרת פלסמידים

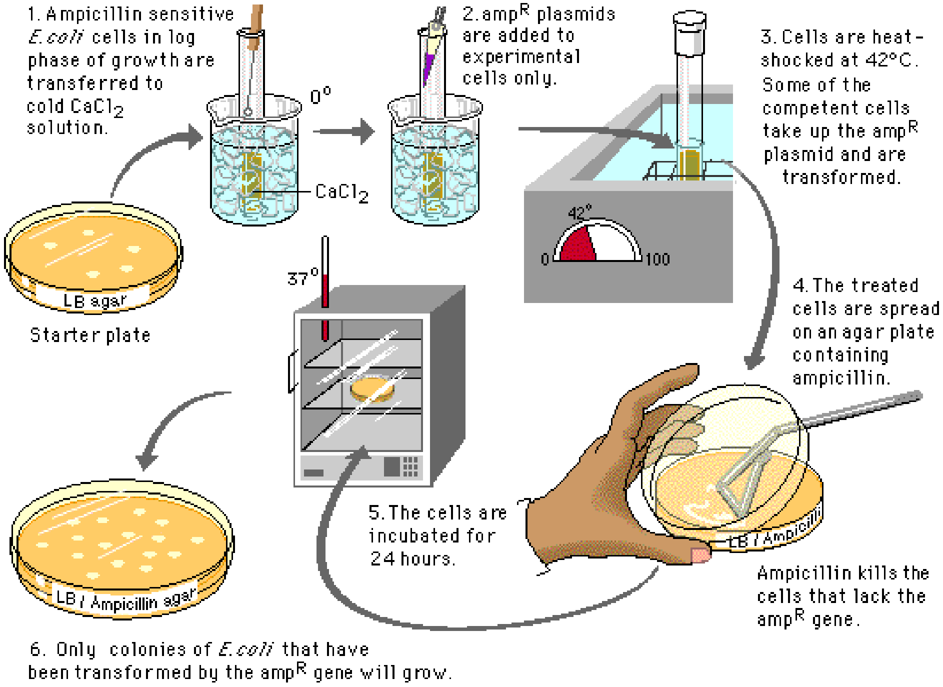


למה משתמשים בטכנולוגיות האלה?

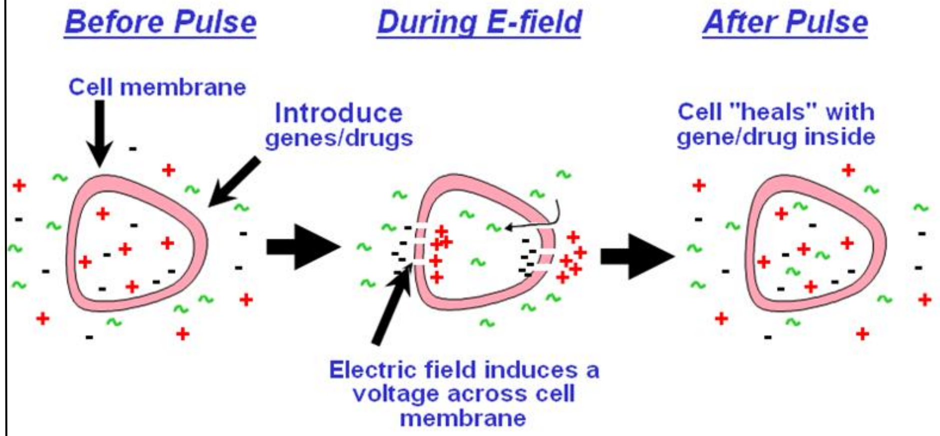
- ביטוי ביתר של חלבון
- הפקת כמות גדולה של DNA

טרנספורמציה

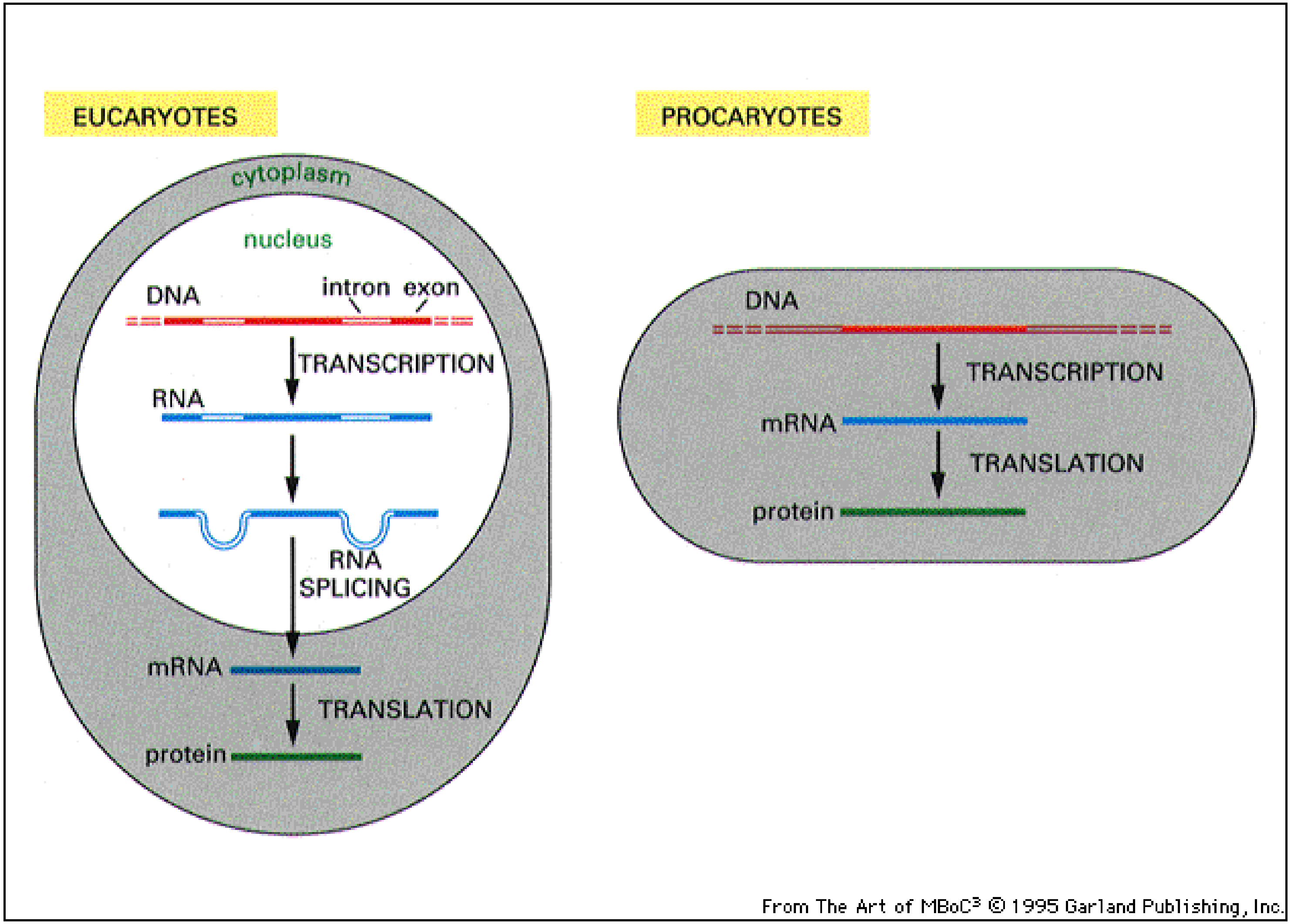
1. Heat shock



2. Electroporation



מ-DNA לחלבון בפרוקריוטים ואאוקריוטים
אז האם תהיה בעיה לשבט גנים מאאוקריוטים?

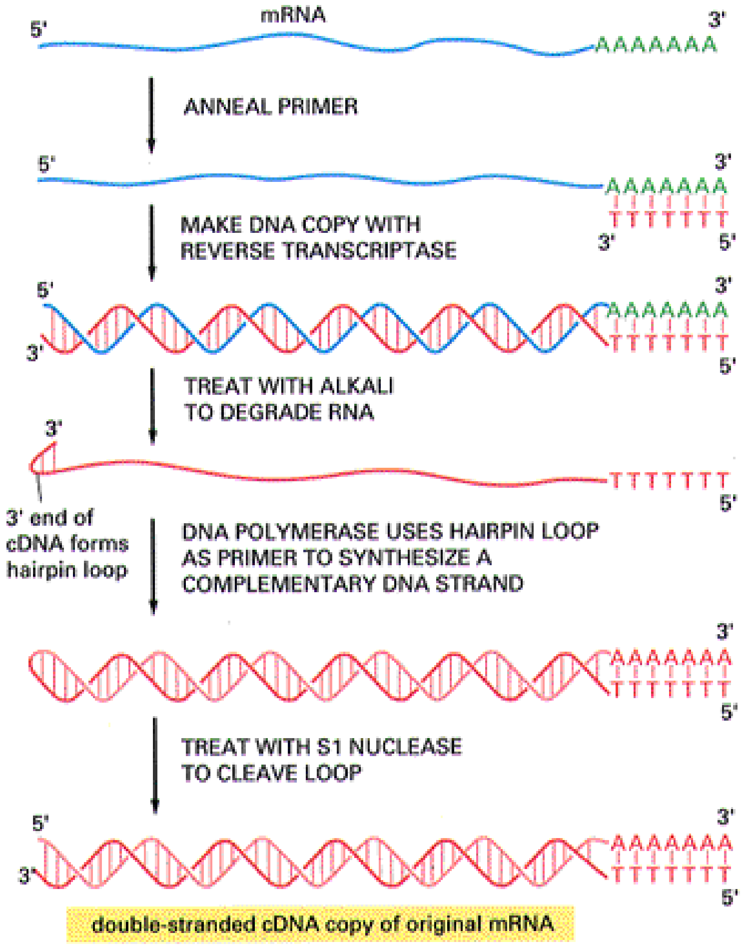


יצירת DNA משלים (cDNA-complementary DNA)

- לשיבוט גן אאוקריוטי- לא ניתן להשתמש בDNA עם אינטרונים (גנומי)
- שימוש בmRNA (אקסון רציף)
- Reverse Transcriptase יוצר cDNA מה-mRNA
- בעזרת DNA פולימראז מייצרים את הגדיל המשלים ואז משבטים
- ספריית cDNA

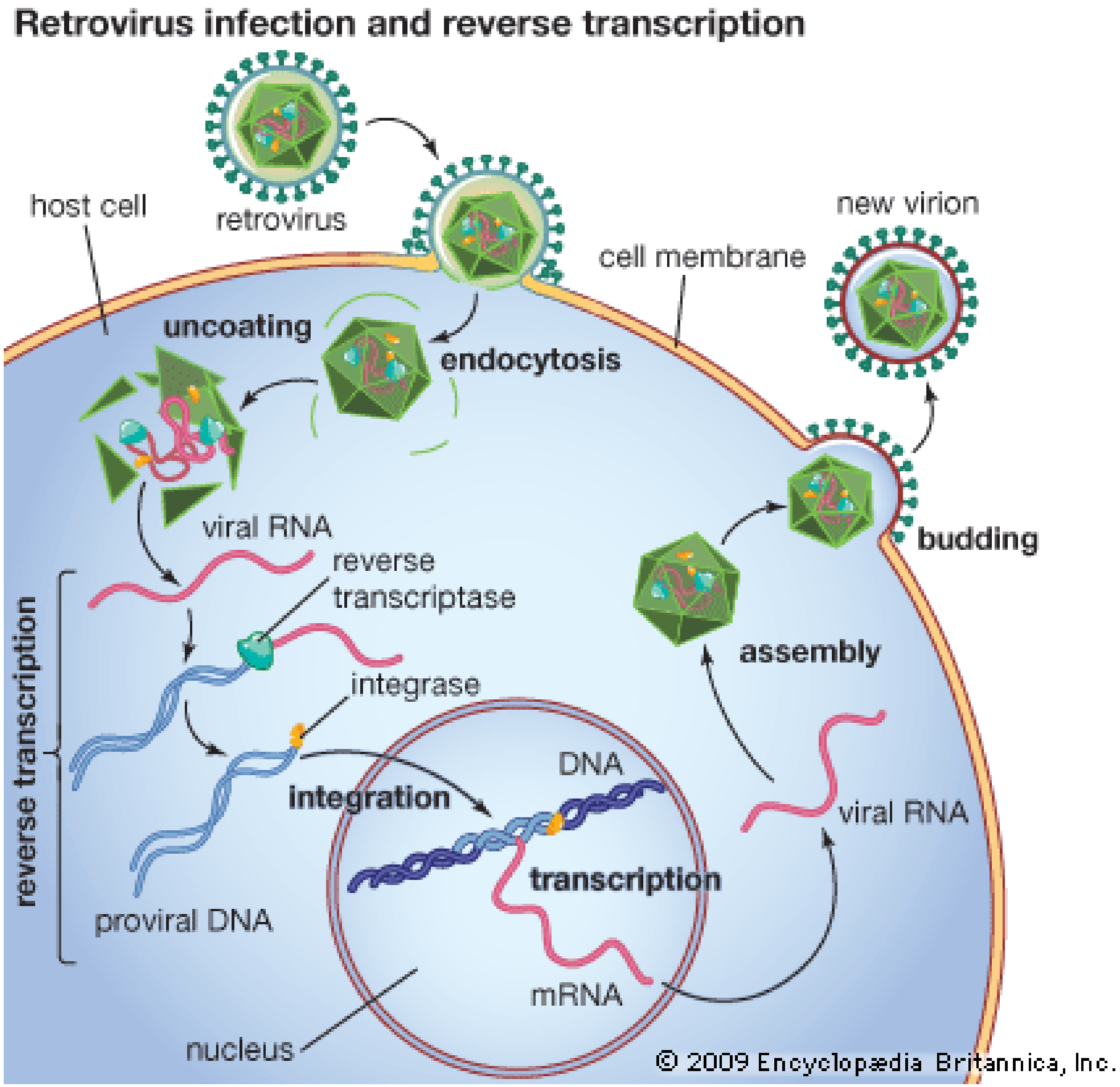
Reverse transcription

poly T הוא (פריימר) התחל mRNA ב

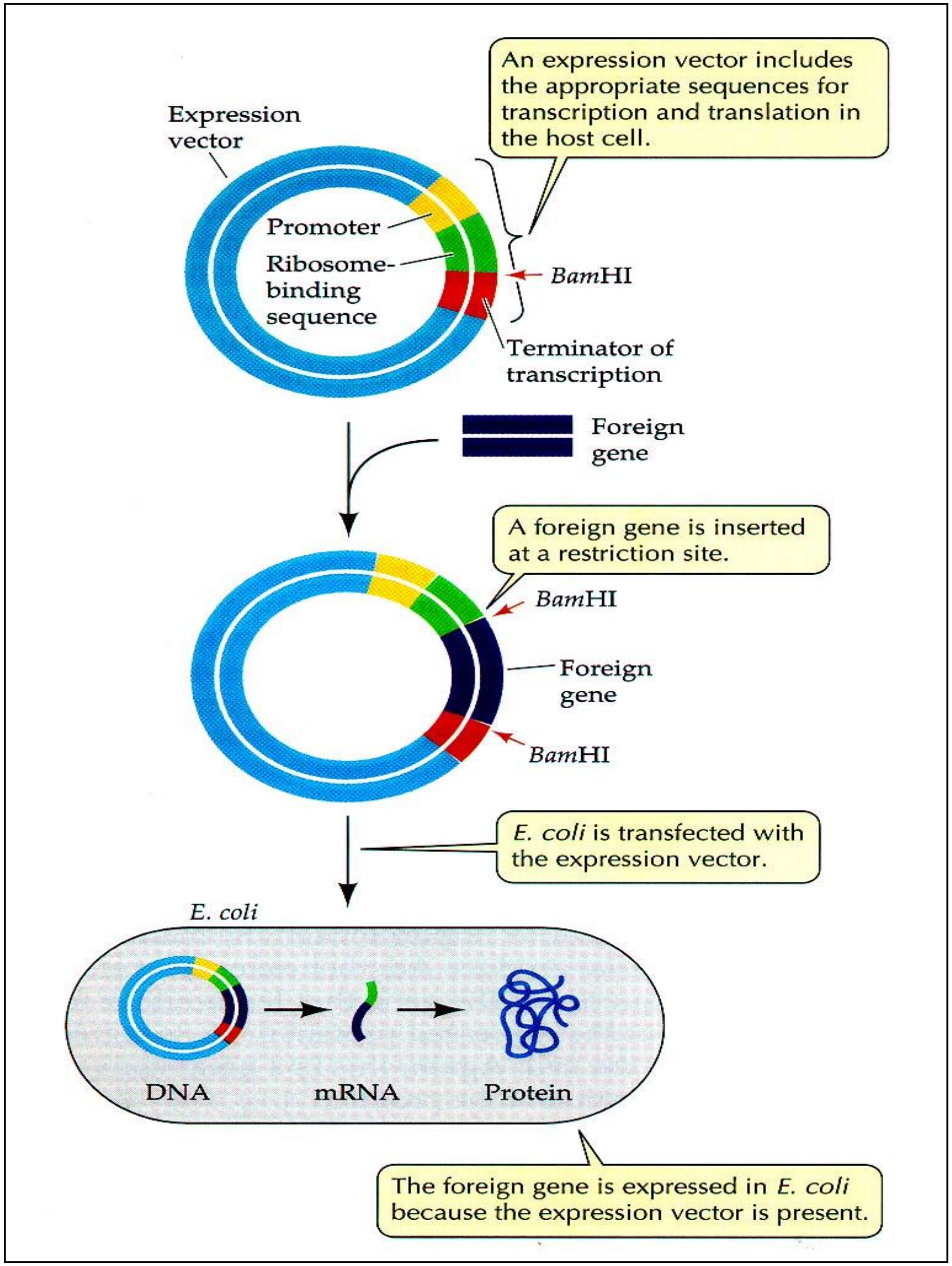


From The Art of MBoC³ © 1995 Garland Publishing, Inc.

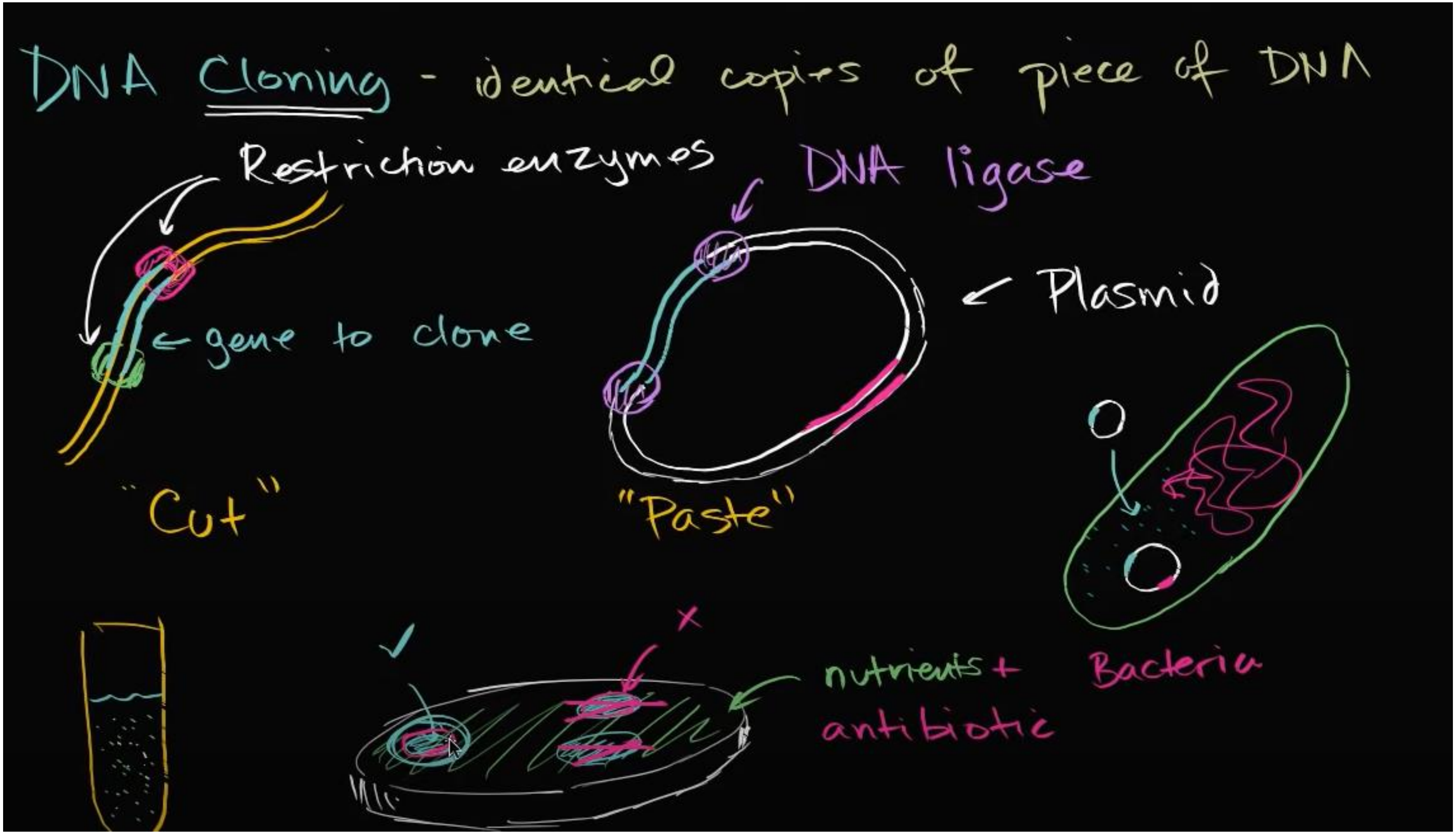
מחזור החיים של רטרו-וירוסים



בקרה על ביטוי חלבון זר בחיידקים

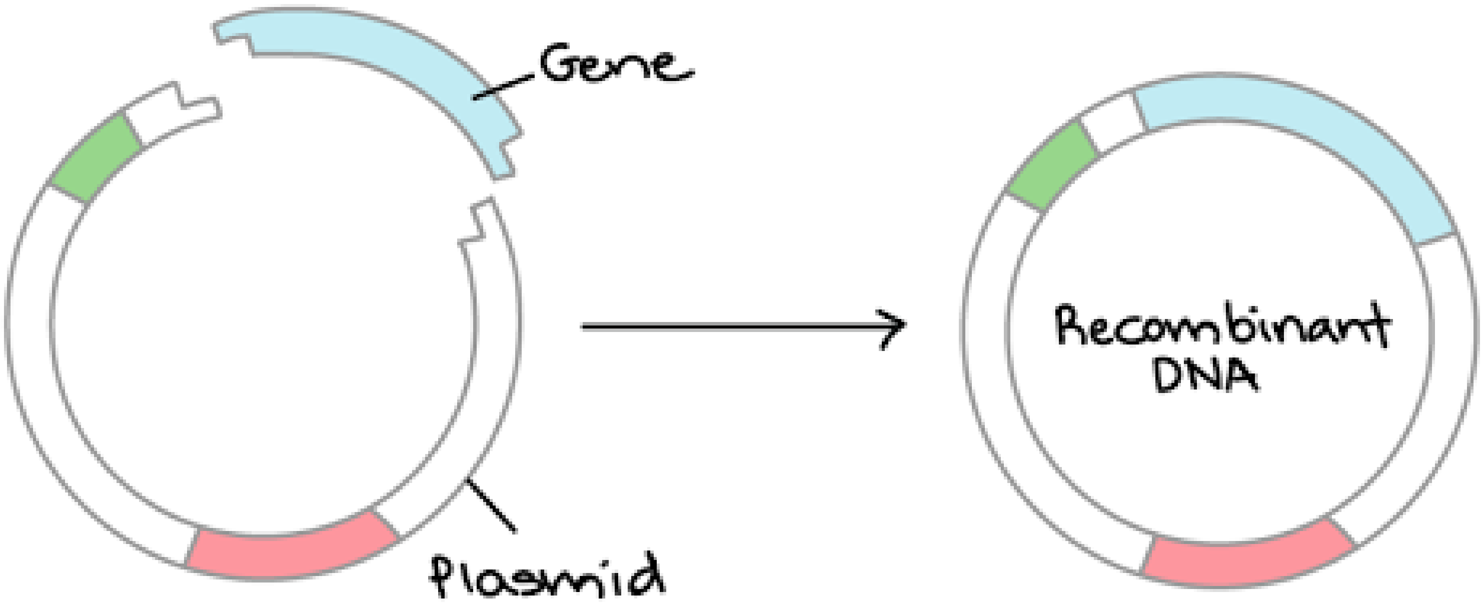


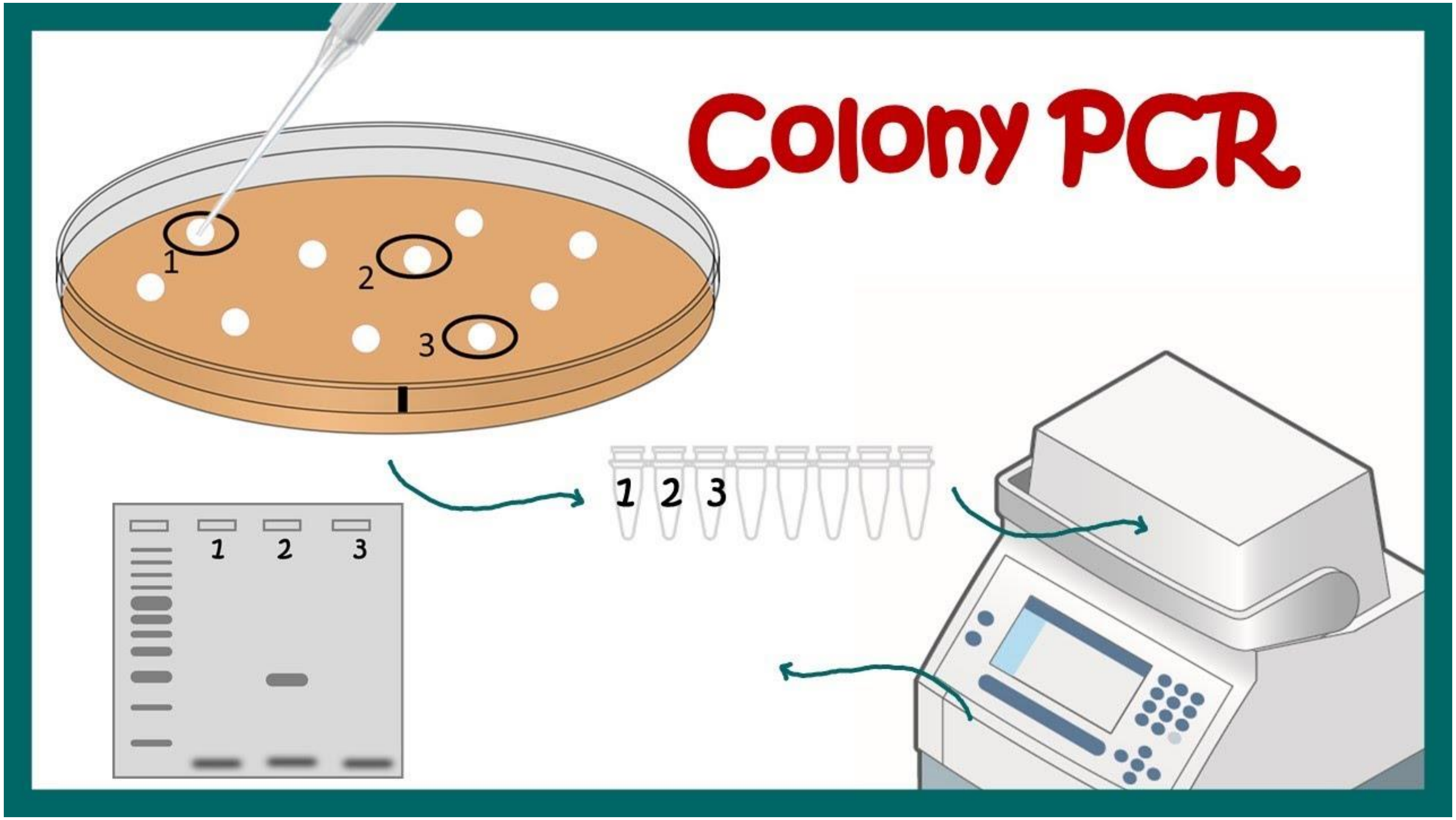
- ווקטור השיבוט מכיל אלמנטים מיוחדים כמו אתר לקישור של ה-mRNA לריבוזום (RBS-Ribosome Binding Site)
- בקרה על יצירת החלבון על ידי חומר כימי (משרן)

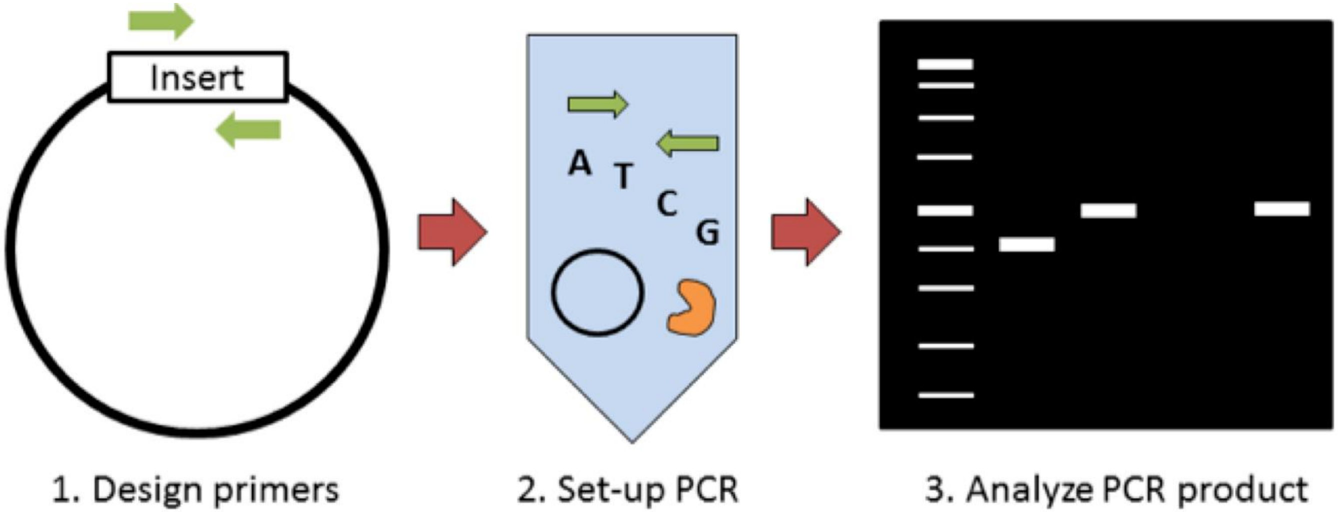


https://www.youtube.com/watch?v=5ffl-0OYVQU&ab_channel=KhanAcademy

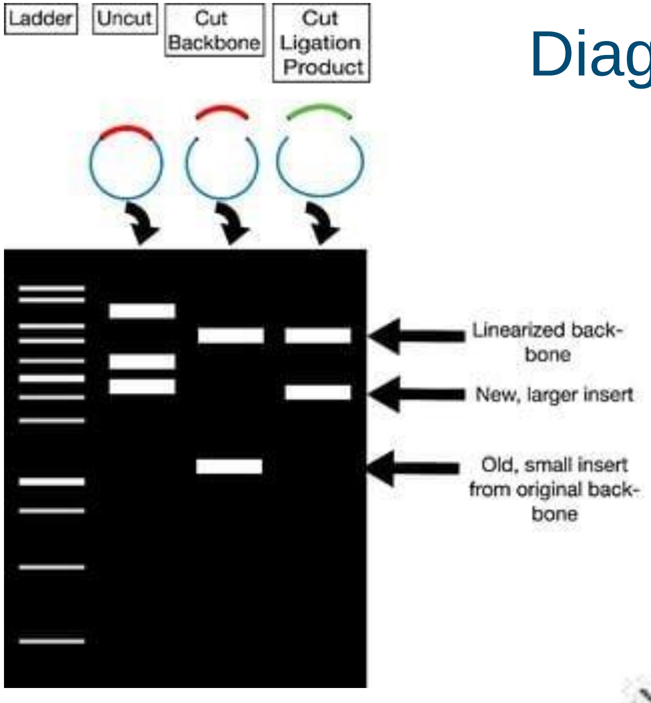
וידוא קבלת שיבוט

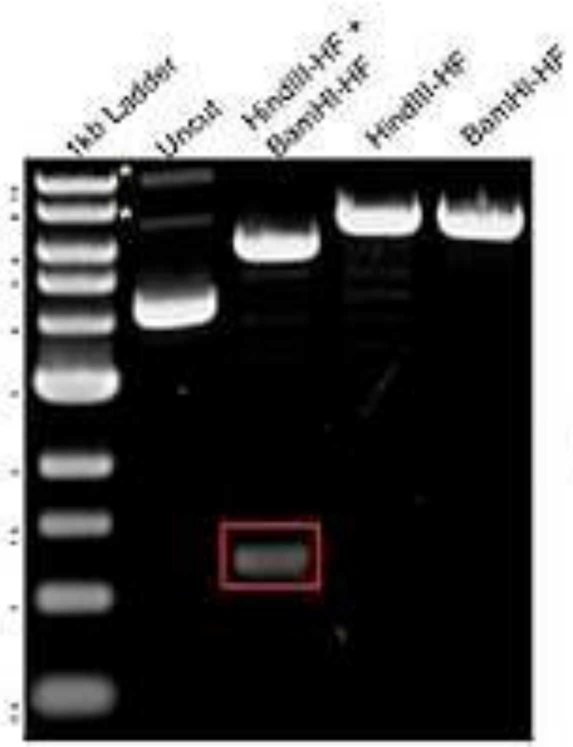


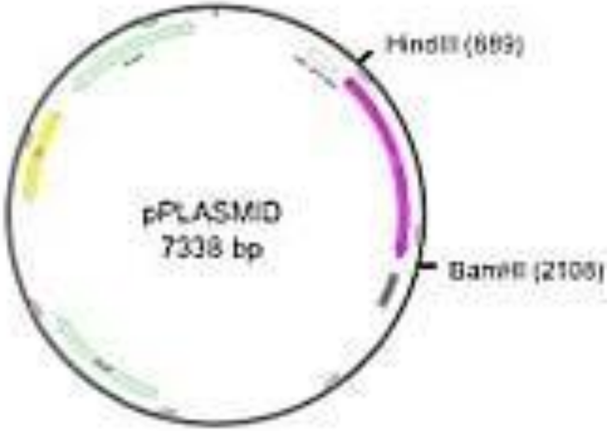

Colony PCR
1
2
3
1 2 3
1
2
3


Insert
A
T
C
G
1. Design primers
2. Set-up PCR
3. Analyze PCR product

Diagnostic restriction digest



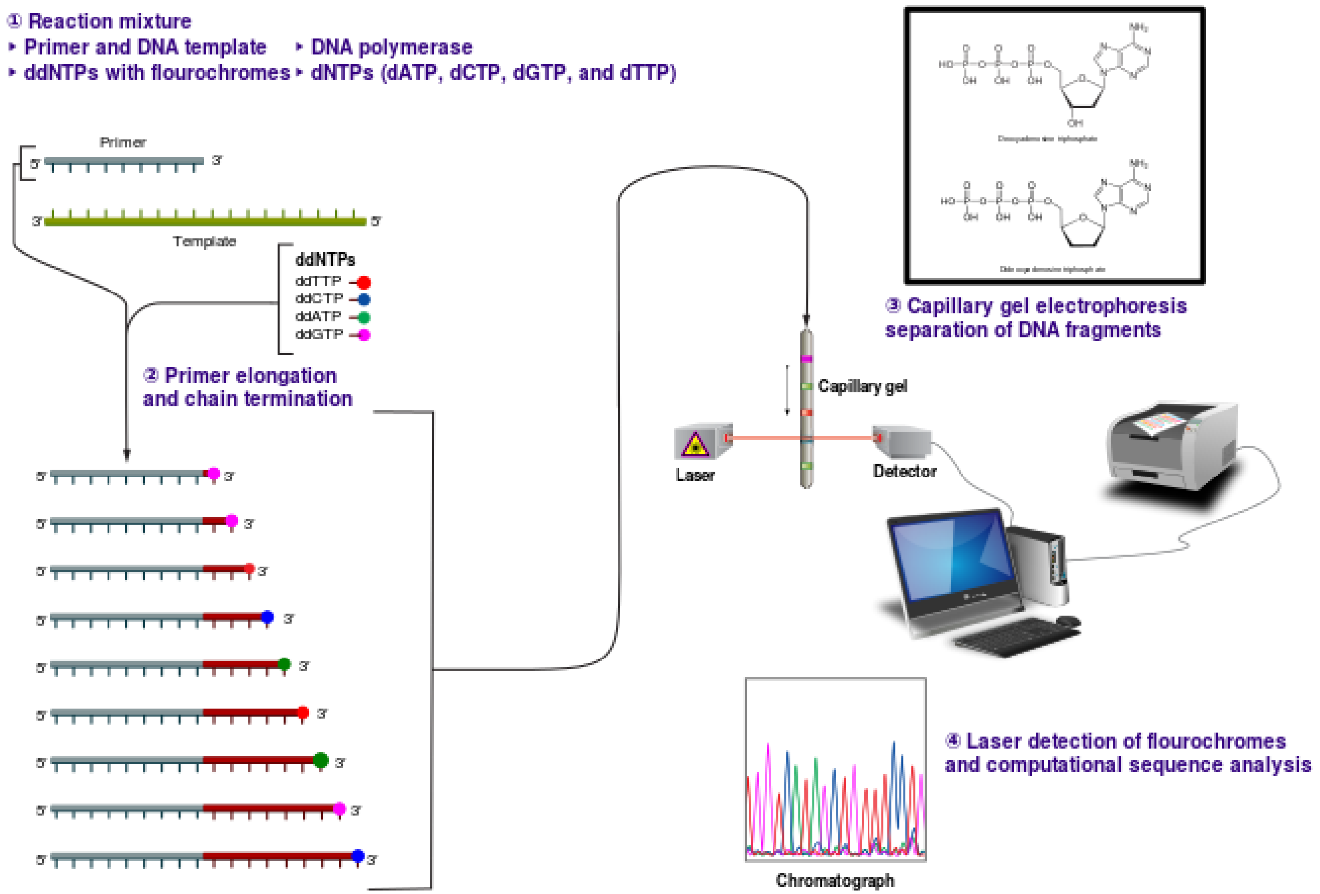


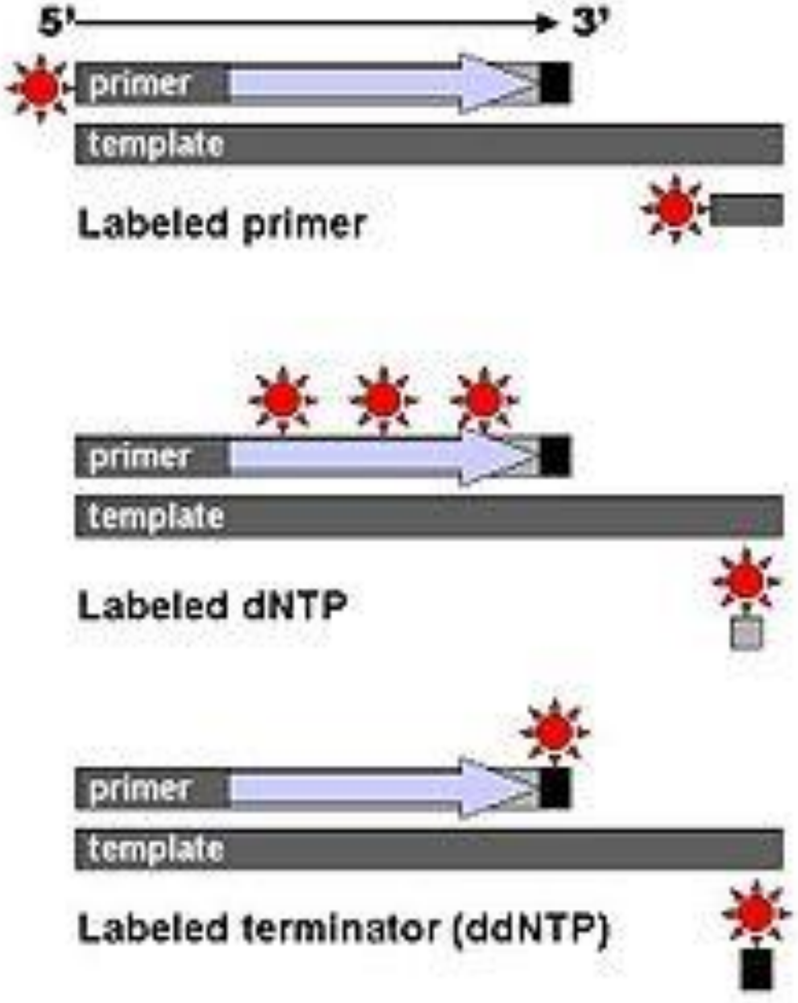


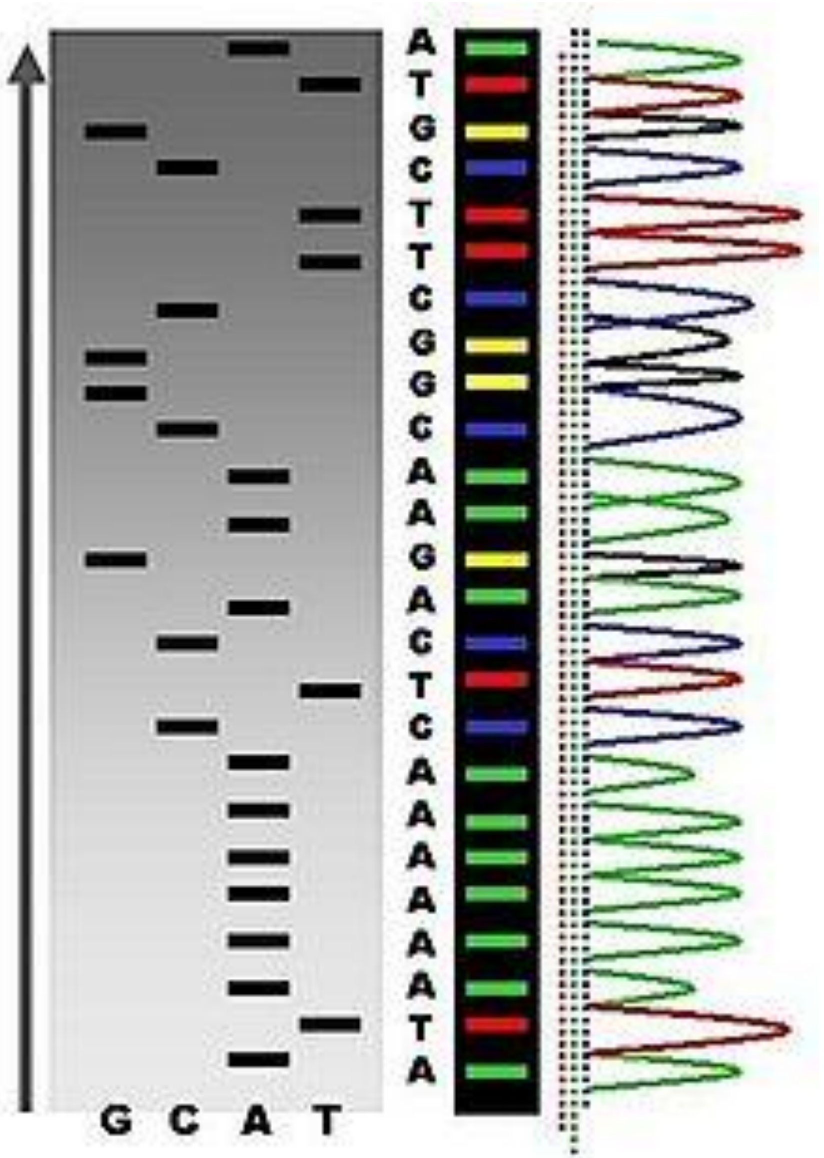
DNA sequencing

Sanger sequencing (1977)

שיטת סנגר לריצוף דנ"א משתמשת בעיקרון שכפול ה- DNA תוך שימוש בסמנים ש"תוקעים" את ה- DNA polymerase ובכך יוצרים מקטעים בכל האורכים האפשריים שמהם ניתן, באמצעות אלקטרופורזה, לאפיין את מקטע ה- DNA המקורי.







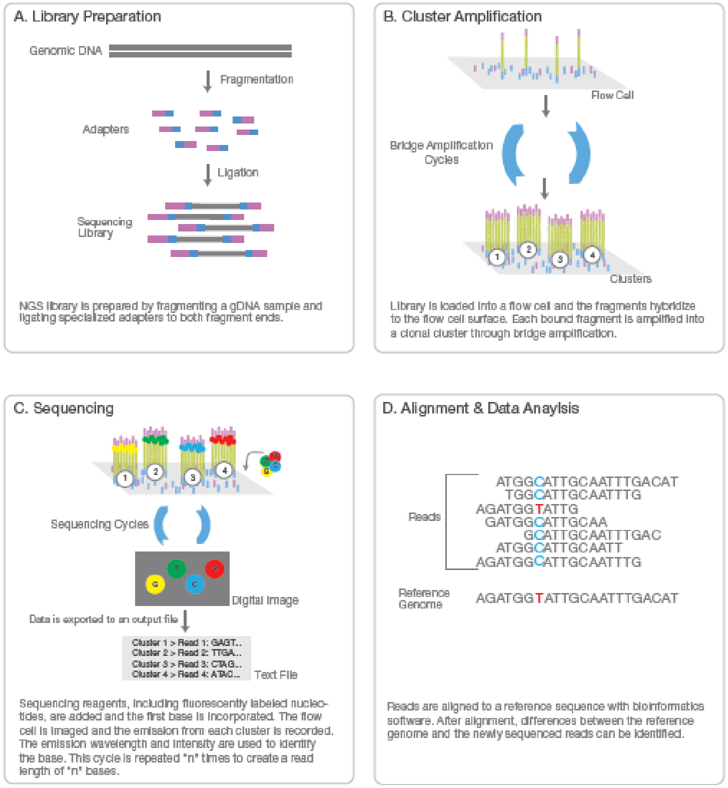
https://www.youtube.com/watch?v=UCzjv5kuZp0

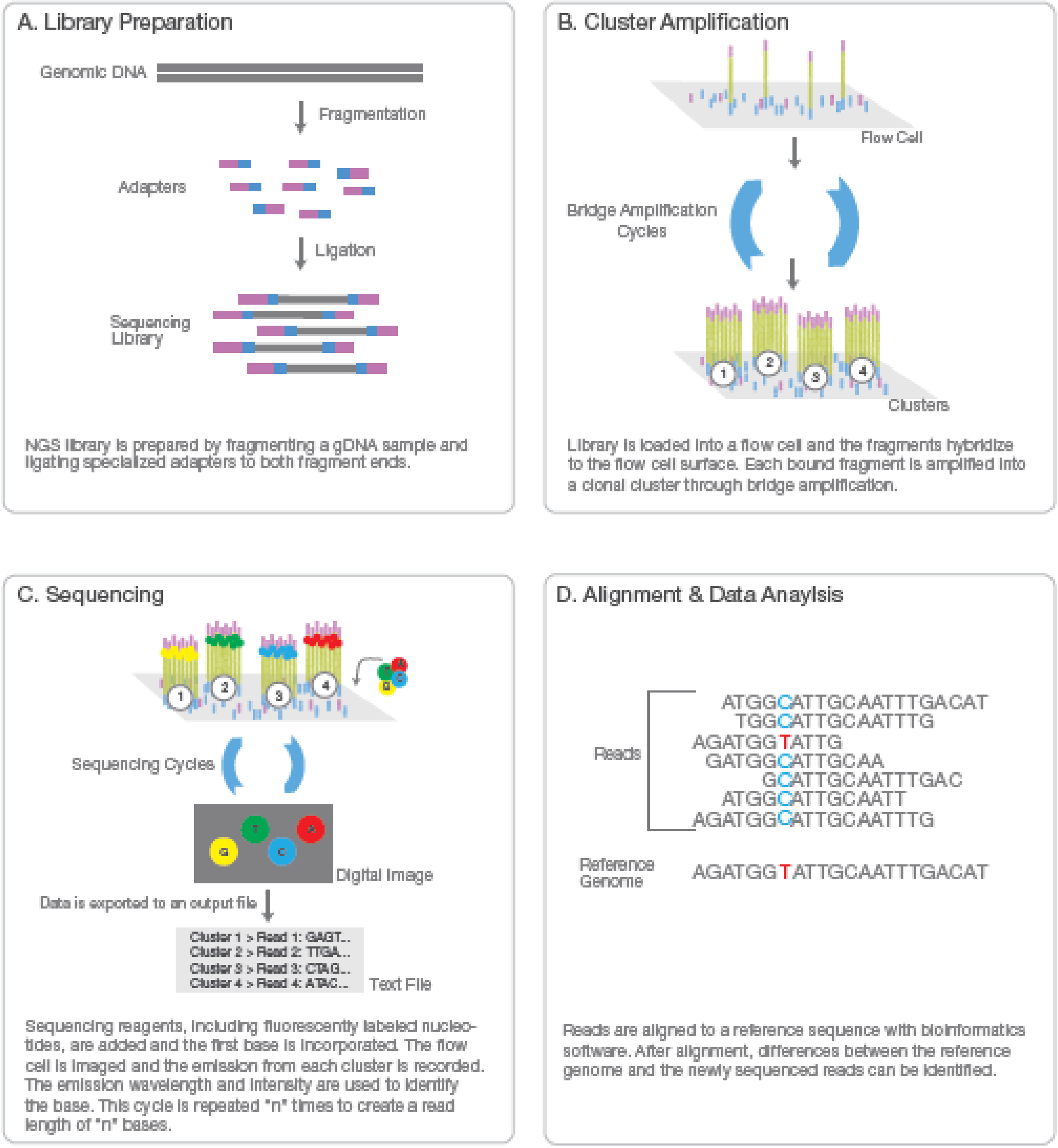
Next-Generation Sequencing (2005)

שיטות הריצוף מהדור החדש מתבצע זיהוי הרצף על בסיס העיקרון "ריצוף על ידי סינתזה" (sequencing by synthesis) - כלומר זיהוי הרצף של מולקולת DNA חד-גדילית מסוימת מבוצע במהלך הפולימרזציה של הגדיל המשלים ונסמכת עליה.

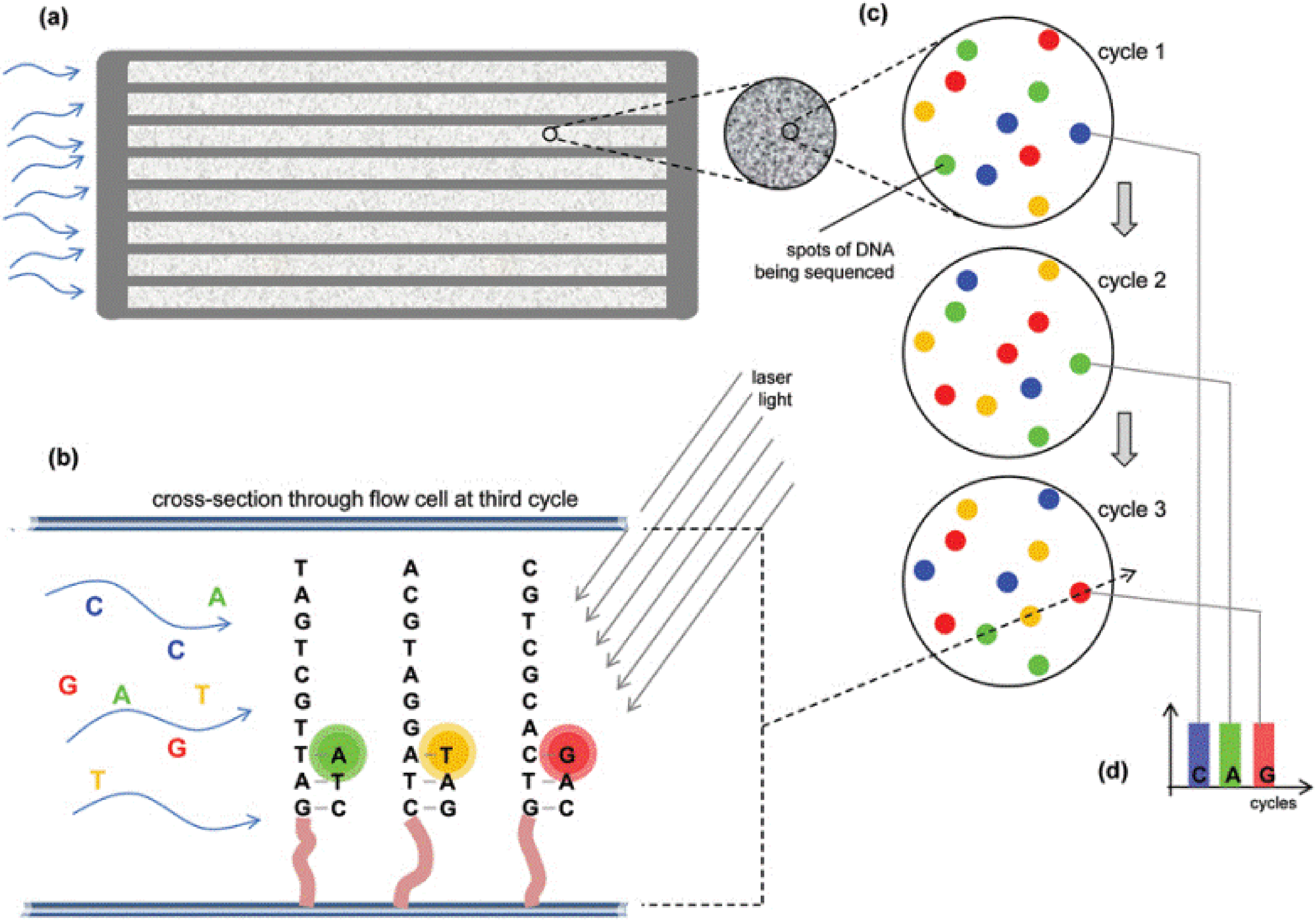
הנפוצה ביותר כיום בישראל - אילומינה

illumina®

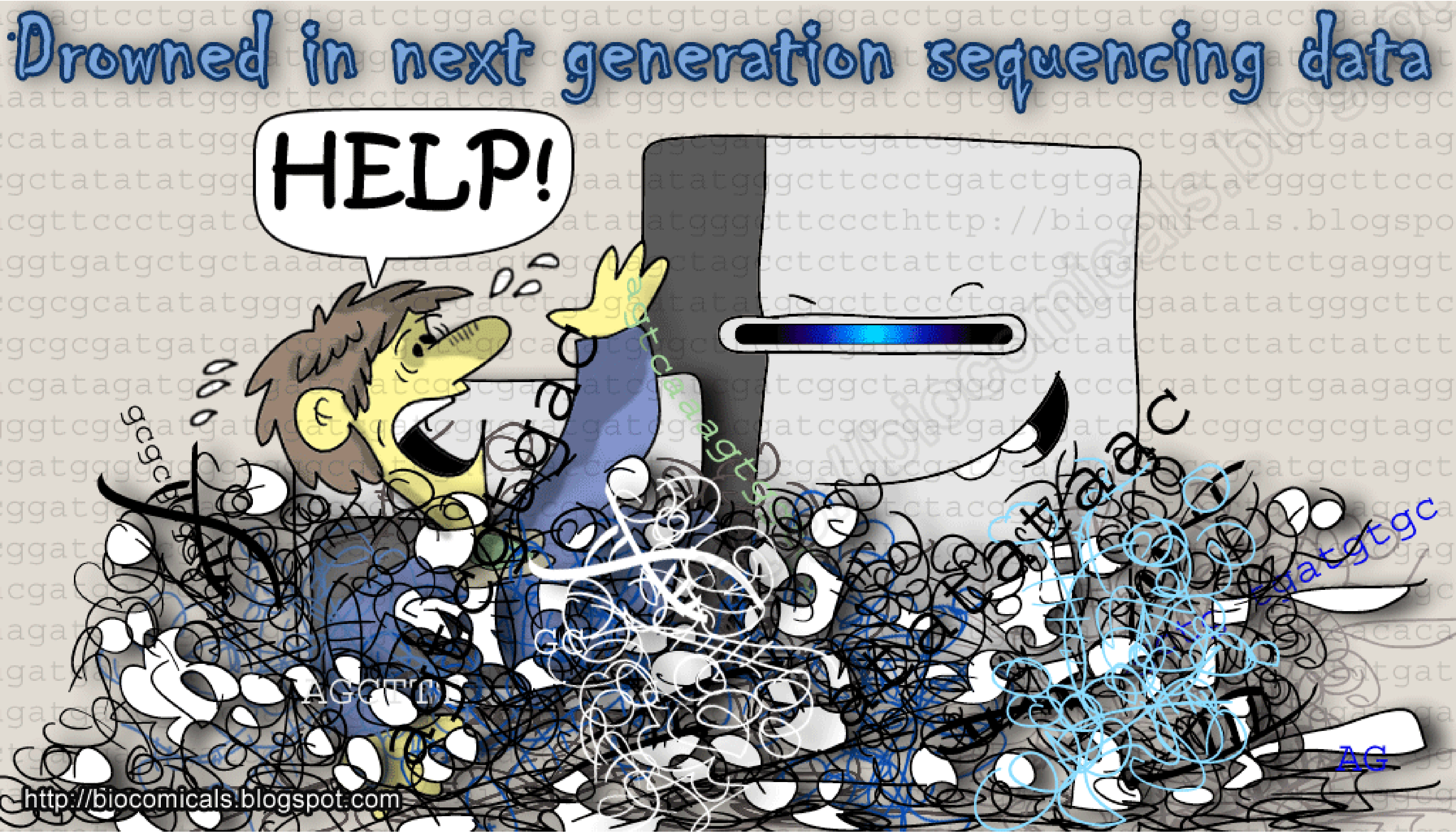



A. Library Preparation
Genomic DNA
Fragmentation
Adapters
Ligation
Sequencing Library
NGS library is prepared by fragmenting a gDNA sample and ligating specialized adapters to both fragment ends.
B. Cluster Amplification
Flow Cell
Bridge Amplification Cycles
Clusters
Library is loaded into a flow cell and the fragments hybridize to the flow cell surface. Each bound fragment is amplified into a clonal cluster through bridge amplification.
C. Sequencing
Sequencing Cycles
Digital Image
Data is exported to an output file
Cluster 1 > Read 1: GAGT...
Cluster 2 > Read 2: TTGA...
Cluster 3 > Read 3: CTAG...
Cluster 4 > Read 4: ATAC...
Text File
Sequencing reagents, including fluorescently labeled nucleotides, are added and the first base is incorporated. The flow cell is imaged and the emission from each cluster is recorded. The emission wavelength and intensity are used to identify the base. This cycle is repeated "n" times to create a read length of "n" bases.
D. Alignment & Data Anaylsis
Reads
ATGGCATTGCAATTTGACAT
TGGCATTGCAATTTG
AGATGGTATTG
GATGGCATTGCAA
GCATTGCAATTTGAC
ATGGCATTGCAATT
AGATGGCATTGCAATTTG
Reference Genome
AGATGGTATTGCAATTTGACAT
Reads are aligned to a reference sequence with bioinformatics software. After alignment, differences between the reference genome and the newly sequenced reads can be identified.

Next-Generation Sequencing (2005)



התוצר של NGS- המון מידע!

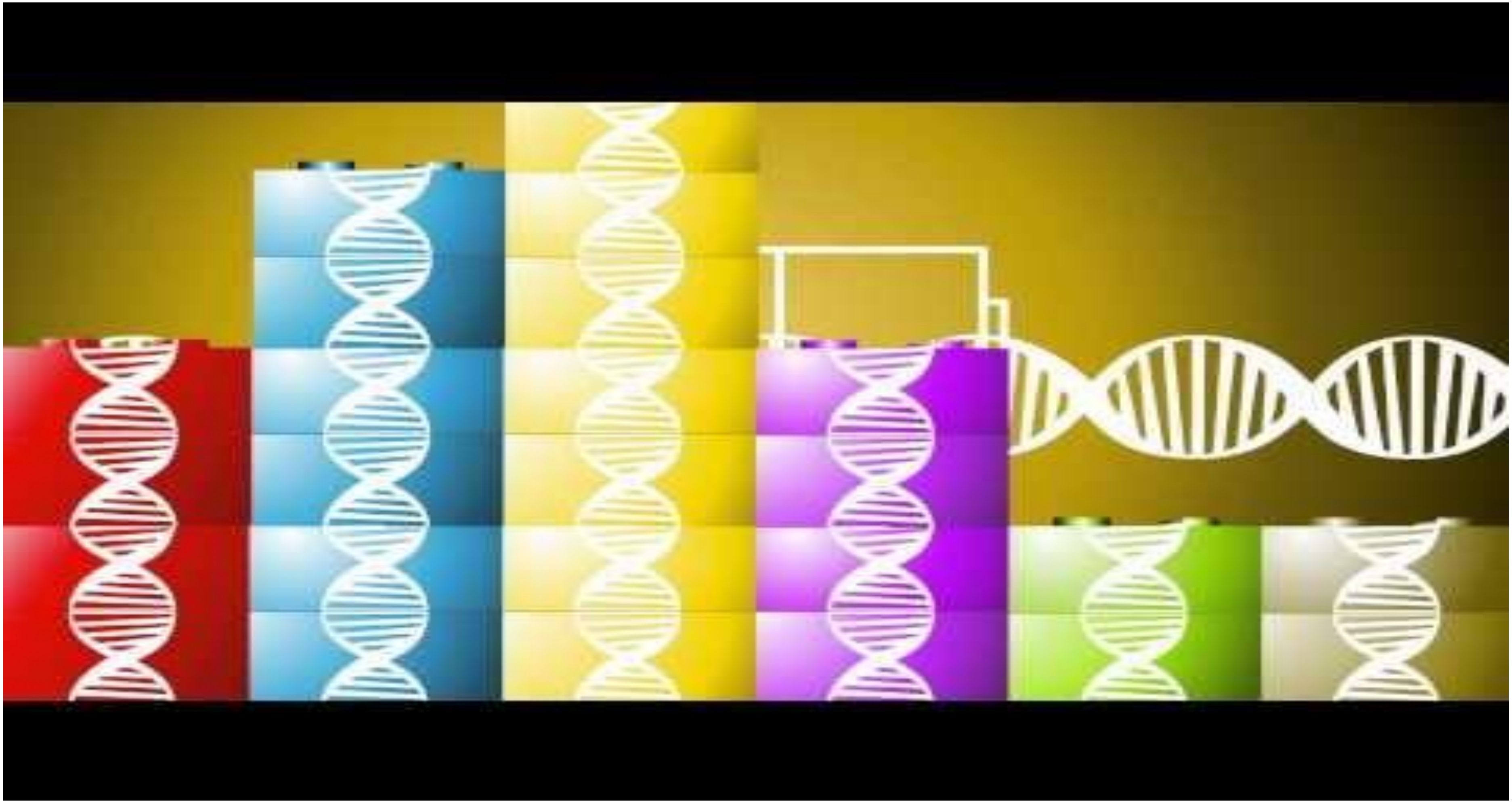


Sangers vs. NGS

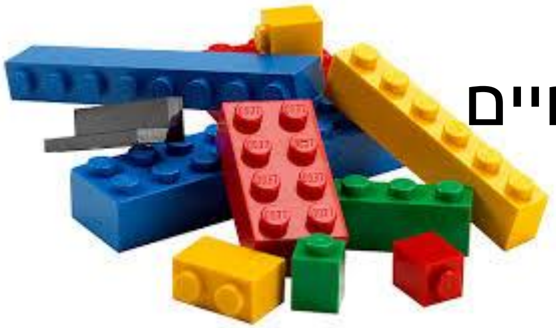
	Sanger	NGS
Sequencing samples	Clones, PCR	DNA Libraries
Sample Tracking	Many samples in 96, 384 well plates	Few
Preparation steps	Few, Sequencing reactions clean up	Many, Complex procedures
Data Collection	Samples in plates 96, 384	Samples on slides 1 – 16+
Data	One read/ sample	Thousands and Millions of reads/Samples.

המלצת צפייה (כ10 דקות):
https://www.youtube.com/watch?v=jFCDqSTM6Q8

ביולוגיה סינטטית

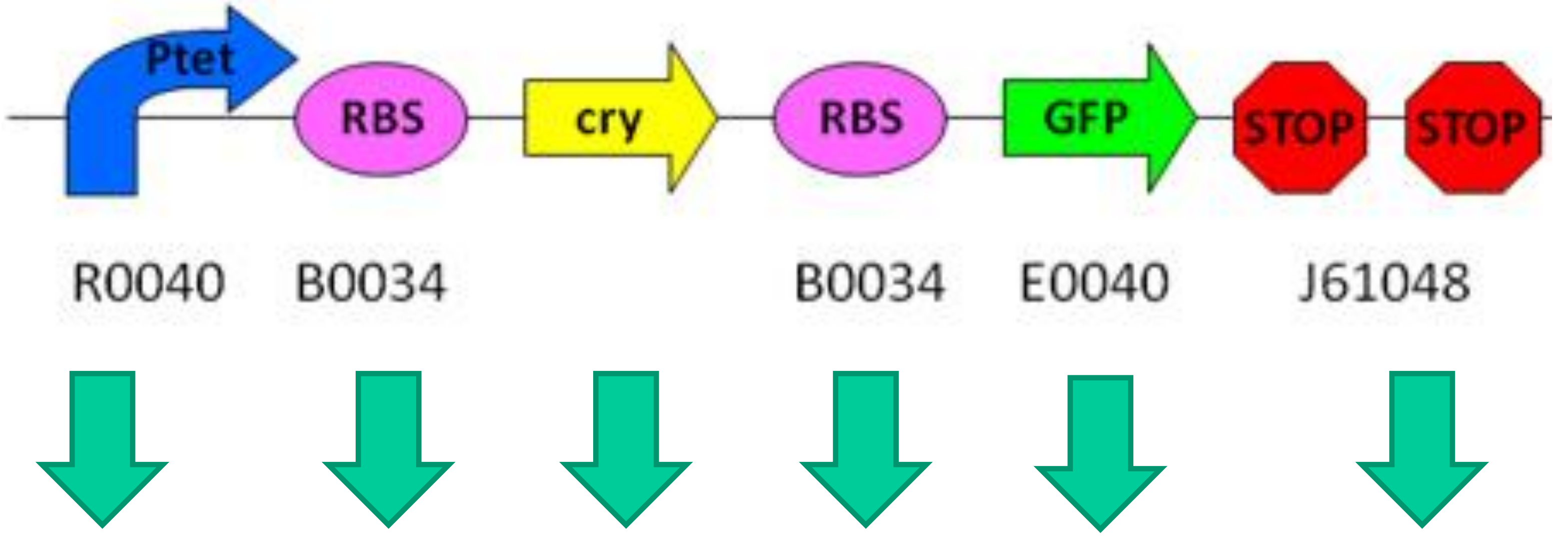


https://www.youtube.com/watch?v=rD5uNAMbDaQ



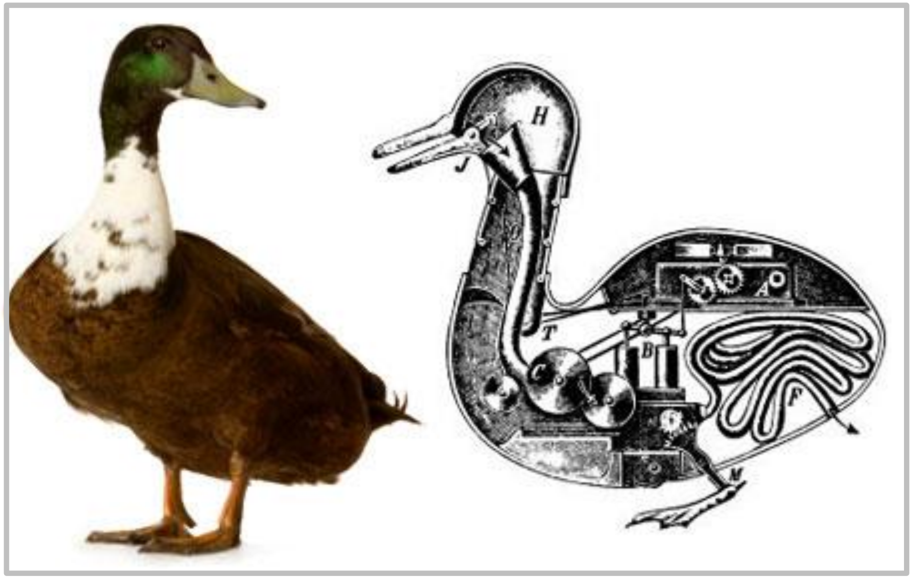
מהי ביולוגיה סינטטית ?

- ביולוגיה סינטטית זהו תחום חדש במדעי החיים שמקדם את גישת הבנייה.
- **מטרות התחום:** שימוש בחלקים ביולוגיים (BioBricks) בכדי ליצור מערכות ביולוגיות חדשות שלא היו קיימות בטבע או לשפר מערכות קיימות.

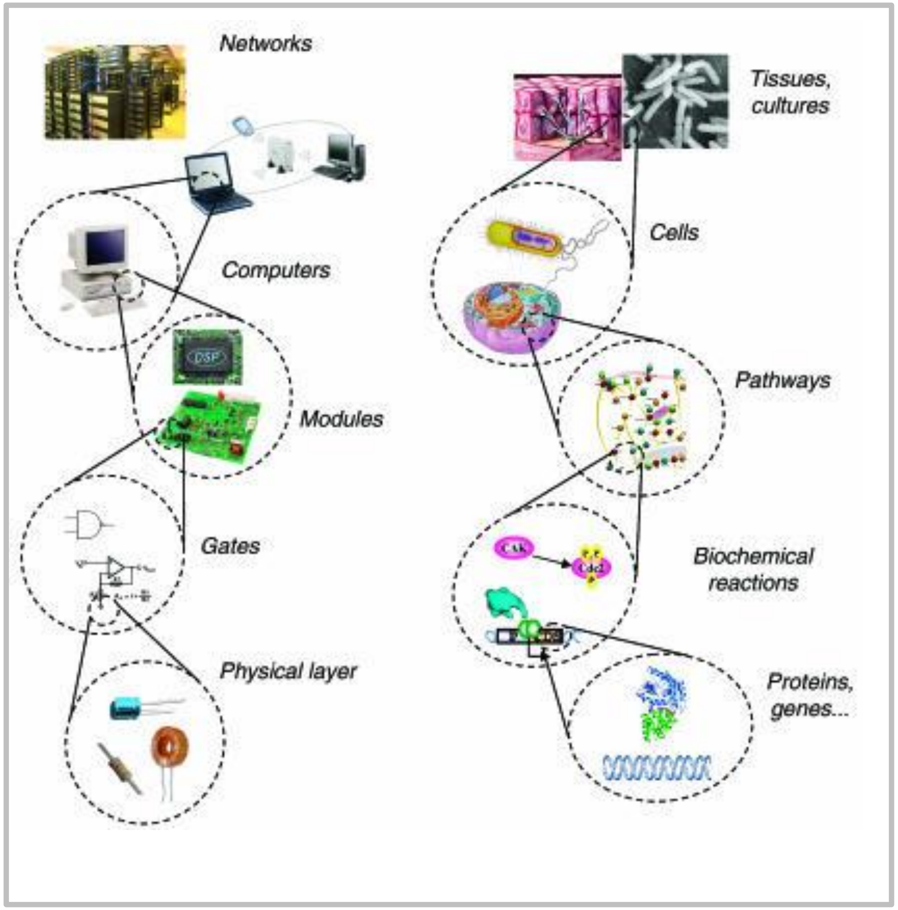


promoter **RBS** **gene** **RBS** **gene** **terminators**

מהי ביולוגיה סינטטית ?



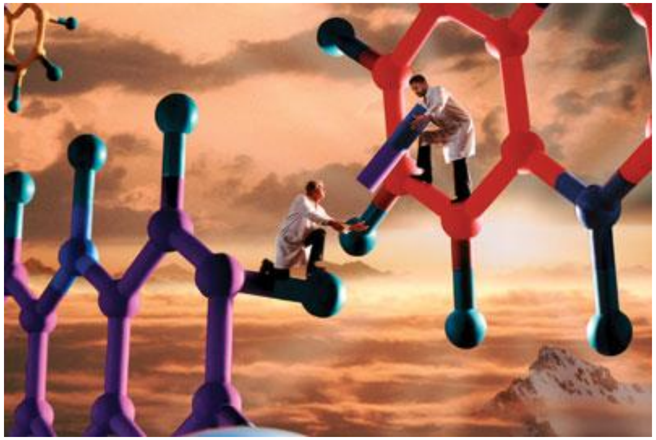
Conventional Biology:
reductionist approach

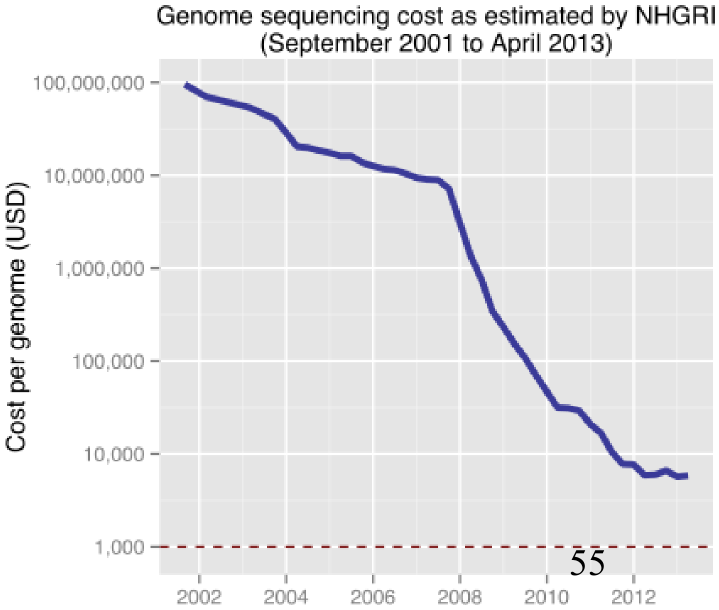


Synthetic Biology approach

התפתחות ביולוגיה סינטטית

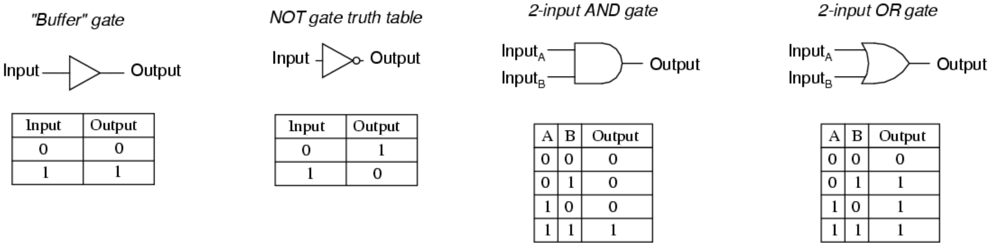
- הביולוגיה הסינטטית נהייתה אפשרית בזכות **שני גורמים:**
  – המהפכה הגנומית
  – ירידת מחירי סינתזת בסיסי הדנ"א





ההבדל בין הנדסה גנטית לביולוגיה סינתטית

- ביולוגיה סינתטית
  – בניית מערכות ביולוגיות חדשות
  – בניית מערכות סבוכות הדורשות שיטות עבודה הנדסיות – כגון סטנדרטיזציה, תכנון ומידול.
  – הסתכלות על DNA כעל אבני בניין - לגו

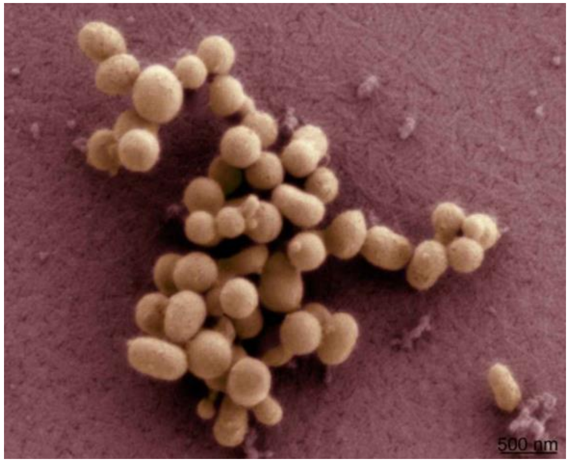


Input	Output
0	0
1	1

Input	Output
0	1
1	0

A	B	Output
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1

A	B	Output
0	0	0
0	1	1
1	0	1
1	1	1

פריצת דרך - החיידק הסינטטי הראשון

- בשנת 2010 הצליחו קרייג ונטר וצוותו ליצור את החיידק הסינטטי הראשון.
- החיידק מסוגל לייצר נוטריינטים, לשכפל את הדנ"א שלו ולהתחלק לתאים נוספים המכילים את אותו רצף דנ"א – כלומר לתפקד כמו חיידק רגיל.