הנדסה גנטית

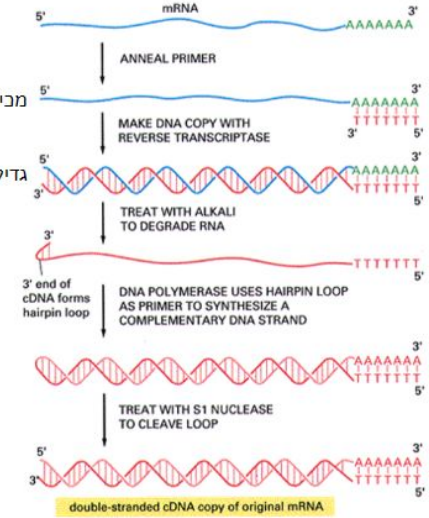
שיבוט

תהליך השיבוט:

1. הגברת המקטע הרצוי (באמצעות PCR).
2. חיתוך באנזימי רסטריקציה / הכנת המקטע להכנסה לפלסמיד ביטוי.
3. ליגציה (מהמילה ליגאז).
4. טרנספורמציה לחיידקים (כמו בניסוי פרדריק גריפית').
5. בדיקת נוכחות הגן המשובט בחיידק.

מכיוון של-mRNA יש זנב poly-A, הפריימר שלו הוא poly-T.

גדיל כימרה - RNA ו-DNA משולבים יחד במבנה דו-סלילי.



שיבוט אאוקריוטי:

מכיוון שב-DNA אאוקריוטי ישנם אינטרונים ואקסונים (נקרא DNA גנומי) - לא ניתן לשבט אותו כפי שמשכפלים DNA פרוקריוטי.

במקום DNA יש צורך ב-mRNA בוגר (כלומר, אקסון רציף ללא אינטרונים).

בעזרת האנזים reverse transcriptase ה-mRNA הופך ל-cDNA (DNA משלים - קומפלמנטרי).

בעזרת DNA פולימראז יוצרים את הגדיל המשלים ל-cDNA ואז משבטים אותו.

שיבוט בעזרת פלסמידים

נשא (ווקטור) - מולקולת DNA בעלת יכולת שכפול המסוגלת לשאת בתוכה מקטע של DNA זר.
פלסמידים - הנשאים הראשונים ששימשו לשיבוט מלאכותי של מקטעי DNA. פלסמיד הוא DNA מעגלי קטן המתרבה בחיידק באופן אוטונומי למאות עד אלפי עותקים ומקנה לחיידק תכונות שונות (כמו עמידות לאנטיביוטיקה). מכיוון שהפלסמיד משתכפל כל כך הרבה פעמים זה עומס רציני עבור חיידק לשמור על פלסמיד ולכן אם הפלסמיד לא יעניק לו יתרון משמעותי הוא יפטר ממנו. הפלסמיד מכיל 3 אזורים משמעותיים:

- MCS - אזור אליו משובט הגן.
- ORI - אזור תחילת ההכפלה. משם מתחיל השכפול של הפלסמיד ועל פיו נקבעת כמות העותקים של הפלסמיד בסוף ההכפלה.
- גן לסלקציה - גן שמעניק לחיידק יתרון אחרת הוא יפטר מהפלסמיד (לרוב אמפיצלין - עמידות לאנטיביוטיקה).

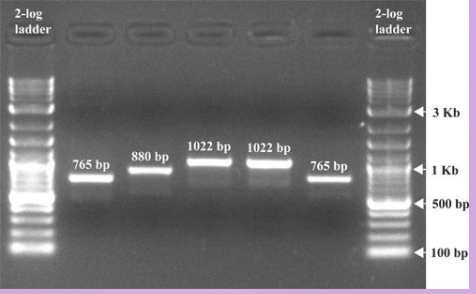
כדי לשבט גן מסוים, יש לחבר את הגן למולקולה שיש לה יכולת שכפול עצמי. על ידי חיתוך והדבקה (ליגציה) - מחברים למולקולה כזו את הגן והיא משכפלת את הגן יחד עם השכפול שלה.
משתמשים בטכנולוגיית השיבוט בעזרת פלסמידים מכיוון שהיא מפיקה בסוף התהליך כמות גדולה מאוד של DNA.

<u>טרנספורמציה:</u>
על מנת שחיידק יקבל את הפלסמיד לתוכו הוא צריך לחטוף שוק: שוק חשמלי או שוק חום.
השוק הזה מכין את החיידק לקבלת הפלסמיד וכל חיידק צריך שוק אחר.

<u>בקרה על ביטוי חלבון זר בחיידקים:</u>
ווקטור השיבוט מכיל אלמנטים מיוחדים כמו אתר לקישור של ה-mRNA לריבוזום (RBS).
קיימת גם בקרה על יצירת החלבון על ידי חומר כימי (משרן).

<u>וידוא קבלת שיבוט:</u>
ישנן 3 שיטות לוודא שהשיבוט הצליח:

- ריצוף DNA.
- חיתוך באנזימים.
- PCR.



בדיקת תוצרי שיבוט

<u>ג'ל אלקטרופורזה:</u>

משטח עשוי ג'ל שמחובר לאלקטרודות משני הצדדים. מכניסים את ה-DNA לצד שאליו מחוברת האלקטרודה השלילית ומכיוון שגם ה-DNA הוא שלילי, הוא ידחה וימשך לצד השני - החיובי.
הג'ל בנוי כמו סבך מה שגורם לכך שככל שהמולקולה קטנה יותר, כך היא תצליח להתקדם יותר.
בסופו של דבר מקבלים סימון של מיקום המולקולות והאורך שלהן (לא מדויק לגמרי אבל מראה באופן יחסי).

<u>זיהוי בעזרת ג'ל אלקטרופורזה:</u>

לאחר שמכניסים את מקטע ה-DNA לפלסמיד (או לכל סוג אחר של DNA, במקרה הזה אני אתייחס אליו כפלסמיד), חותכים את הפלסמיד באזורי ההכרה שנמצאים משני צידי המקטע.
את 2 המולקולות מריצים בג'ל אלקטרופורזה.

<u>תוצאה:</u>

- אם המקטע נכנס יתקבלו מולקולה ארוכה מאוד (הפלסמיד) ומולקולה נוספת שלרוב היא לא קצרה (ה-DNA).
- אם המקטע לא נכנס יתקבלו מולקולה ארוכה מאוד (הפלסמיד) ומולקולה זעירה, שנחשבת זניחה (החלק בפלסמיד שנמצא בין אזורי ההכרה).

<u>אתידיום ברומיד - קרצינוגן:</u>

תרכובת אורגנית פלואורסנטית המשמשת לצביעת חומצות גרעין - היא נכנסת בין בסיסי ה-DNA הדו-גדילי וזורחת כאשר מוקרן עליה אור UV.
מוסיפים אתידיום ברומיד לג'ל הרצת DNA.

ריצוף DNA בשיטת סנגר

תהליך הריצוף בשיטת סנגר:

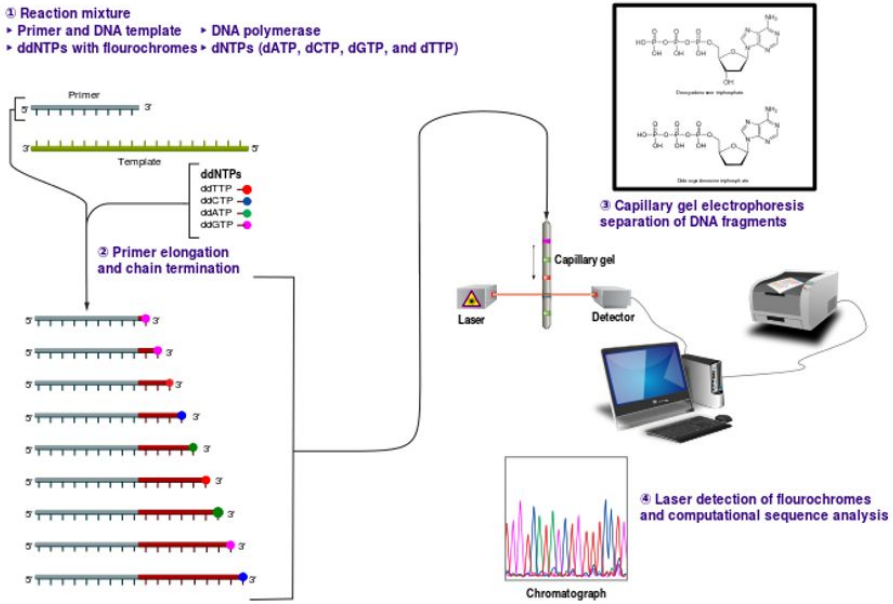
1. לוקחים הרבה עותקים של ה-DNA שצריך לרצף והרבה פריימרים שמתאימים להם.
2. מכניסים לתערובת הרבה נוקלאוטידים שרובם רגילים וחלקם "מסומנים" - נוקלאוטידים פלואורסנטים שעוצרים את תהליך ההכפלה.
3. כל פריימר מקבל את הבסיס הראשון (בעזרת ה-DNA פולימראז). על פי הסתברות חלק מהפריימרים קיבלו בסיס פלואורסנטי ויפסיקו לגדול.
4. ההכפלה ממשיכה כאשר בכל הוספה של נוקלאוטיד לגדילים המשלימים שנבנים מהפריימרים, חלק מהגדילים מקבלים נוקלאוטידים מסומנים ומפסיקים בהכפלה.
5. בסוף ההכפלה מעבירים את הגדילים החדשים שנוצרו דרך מסנ שמאפשר להם לעבור לפי גודל לתוך תעלה.
6. בתעלה יש לייזר שמזהה את הבסיס הפלואורסנטי בקצה הגדיל ושולח אות למחשב שמכיל את הבסיס הפלואורסנטי ואורך המולקולה.
7. המחשב מתאים לכל בסיס את הבסיס המתאים לו (בעצם מבצע הנדסה הפוכה לתהליך השכפול ובונה את הגדיל המקורי).
8. בסוף התהליך הגדיל המקורי מרוצף - בסיס אחרי בסיס.

שיטת סנגר (שנת 1977):

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

*ניתן להשתמש בשיטה זו עבור מולקולות DNA באורך של עד 900 בסיסים.

**בשיטה זו ריצפו את הגנום האנושי!



ריצוף DNA בשיטת NGS

NGS - next generation sequencing (שנת 2005):

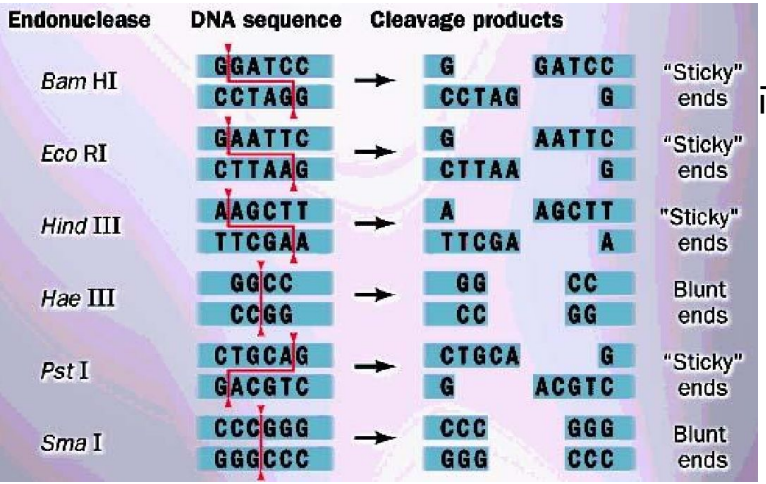
בשיטות הריצוף מהדור החדש מתבצע זיהוי הרצף על בסיס העיקרון "ריצוף על ידי סינתזה" - כלומר, זיהוי הרצף של מולקולת DNA חד-גדילית מסוימת המבוצע במהלך הפולימריזציה של הגדיל המשלים ונסמכת עליה.

החברה הפופולארית ביותר בישראל כיום לריצוף מהדור החדש היא "אילומינה".

אנזימי רסטריקציה

אנזימי רסטריקציה - אנזימים שחותכים DNA ברצף ספציפי בלבד. מיוצרים על ידי חיידקים כמנגנון הגנה מפאג'ים (כמו בקטריו**פאג'ים**). בחיידקים הללו אנזימי ההגבלה מזהים DNA זר ומגיבים בהתקפת נגד על ידי חיתוכו של ה-DNA הזר מבלי לפגוע ב-DNA של החיידק הממותל. מכיוון שהאנזימים האלה מגבילים את יכולת ההתקפה של הפולש הזר הם נקראים "אנזימי הגבלה" (רסטריקציה בלעז).

ממותל - על מנת שהחיידק לא יחתוך את ה-DNA של עצמו, ה-DNA שלו מרוצף בקבוצות מתיל)) שאינן נמצאות על ה-DNA של הווירוס. כך החיידק יודע איזה DNA לחתוך.



*מייחסים חשיבות מיוחדת לאנזימי רסטריקציה שחותכים רצפים פלינדרומיים (חזרות במהופך) ויוצרים לעיתים קצוות היכולים להידבק זה לזה - "קצוות דביק לאחר מכן ניתן לחבר קצוות של 2 מולקולות DNA בעזרת DNA ליגאז ובכך ליצור DNA היברידי (מורכב מ-2 המולקולות ולכן ארוך יותר).

<u>יש 3 סוגי חיתוכים:</u>

1. 5' hang - הקצה ה-5' של הגדיל הוא זה שבולט.
2. 3' hang - הקצה ה-3' של הגדיל הוא זה שבולט.
3. Blunt - חיתוך ישר.