

הנדסה גנטית תרגול

קביעת רצף ל-DNA.

שימושים:

1. וידוי השיבוט של מקטע DNA רצוי (99% מהמקרים בתוך פלסמיד).
2. חיפוש מסגרת קריאה פתוחה (ORF) והכרת הקודים לחומצות אמינו למקטע DNA. יכולות להיות 6 מסגרות קריאה 3 לכל סיב.
3. מציאת אזורי בקרה, אקסונים ואינטרונים לפי רצפי קונסנזוס.
4. וידוי הכנסת מוטציות מכוונות.

ברוב המקרים בדיקת רצף ה-DNA היא בפלסמיד, לפעמים גם בפאג'. אנו עושים PCR להגדלה ולאחר מכן מפרידים את הסיבים. אנו משתמשים בפריימרים מסומנים רדיואקטיבית. מחלקים ל-4 מבחנות שונות מוסיפים DNA פולימראז ודי-דיאוקסי נוקליאוטידים וכך מקבלים חתיכה כל פעם בבסיס שונה מכל סוג. בכל מבחנה מקבלים את כל המקטעים באורכים שונים כך שיש נוקליאוטיד רגיל אז השרשרת ממשיכה ושיש די-דיאוקסי נוקליאוטיד נגמרת השרשרת. כך מקבלים מקטעים שונים לשיטה זו קוראים Chain Termination. מריצים בג'ל ומקבלים את המקטעים השונים וניתן להגיע לרצף. 4 הריאקציות מתבצעות בו זמנית, בכל מבחנה יש בסיס אחר בתור די-דיאוקסי. אנו מקבלים את הסיב המשלים כך שתבנית ה-DNA הפוכה ניתן להשתמש גם בבסיסים מסומנים וכך לקבל מספר פסים ולראות אותה תוצאה שיטה זו רדיואקטיבית וכיום יש פתרונות לא רדיואקטיביים וזה על ידי בסיסים עם סימון פלורצנטי. בנוסף בשיטה זו אנו עובדים על 4 מבחנות במקביל ובשיטה החדשה ניתן לעבוד במבחנה אחת שכל בסיס מסומן בצבע אחר, לשרשרת זו קוראים Cycle Sequencing.

הסימון הוא אוניברסאלי כך ש-T מסומן באדום, C בכחול, G בשחור ו-A בירוק.

אנו מערבבים במבחנה אחת את ה-DNA + פריימר מתאים + dNTP's ו-4 הדי-דיאוקסי שכל אחד מסומן בצבע פלורצנטי שלו. לזה מוסיפים Tag Polymerase שהוא פולימראז העמיד לטמפרטורות גבוהות ועמיד חצי שעה ב-94⁰ ואת הפולימריזציה הוא עושה ב-72⁰ בשיטה זו מספיק 1ng של DNA.

נספח 1 – טבלת קודונים לחומצות אמינו.

נספח 2 – טבלת אתרי חיתוך של אנזימי רסטרקציה.

שימושים של אנזימים בהנדסה גנטית.

1. DNA פולימראז.
2. ליגאז.
3. אלקליין פוספטאז.

ל-DNA פולימראז יש 3 פעולות שהוא מסוגל לעשות הראשונה היא פלמור והשתיים הנוספות הם פעולות של אקסונוקלאז. הפעילות של הוספת דיאוקסי נוקליאוטידים מתבצעת על תבנית DNA שעליה יש פריימר 5' ל-3' והפולימראז מוסיף נוקליאוטידים בכיוון 5' ל-3'. בנוסף קיימת פעילות אקסונוקלאז מכיוון 5' ל-3', במקרה שיש תבנית DNA ועליה יושבת חתיכת גדיל משלים או פריימר אז ה-DNA פולימראז יקצץ את המקטע העליון מ-5' ל-3'. דבר זה לא טוב כיוון שכך יעכל הפריימר ולכן צריך להיפתר מפעילות זו. פעילות נוספת של אקסונוקלאז מ-3' ל-5' כשיש קצה 3' חד גדילי עם קצה OH אז הוא מעוכל בכיוון 3' ל-5' עד שנגיע לאזור דו גדילי זה יקרה כשאין נוקליאוטידים בתמיסה.

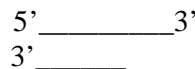
כדי להפסיק את פעילות האקסונוקלאז מ-5' ל-3' לקחו את אנזים השלם (110KD) ועשו עליו עיכול פרוטאוליטי לקבלת חלבון במשקל 76KD שאיננו מכיל את האזור 3' → 5' אבל הוא מכיל את

יכולת הפלמור 5' B 3' ויכולת ה- exo מ- 3' ל- 5'. למקטע החלבון החדש שקבלנו (במשקל 76KD) קוראים Klenow Fragment.

בהנדסה גנטית ניתן להשתמש באנזים זה ביכולת הפלמור 5' ל- 3' לשם סימון קצה של מקטע DNA (סימונים אלו הם לגלאים למיניהם) על ידי מילוי הקצה של הקצוות הדביקים לריאקציה כזו קוראים Fill In או End Filling. ניתן להשתמש גם במילוי עם בסיסים לא מסומנים למקרים של הכנסת מקטעים לפלסמיד.



משלימים את הקצוות הדביקים לכהים כדי שנוכל להשלים ולחבר את המקטעים. ניתן לבצע מניפולציה לסימון מקטע ארוך של DNA על ידי גלאי המסומן בסימון רדיואקטיבי את זה נעשה על ידי דינאמיקה להפרדת הסיבים ואז שימוש בפריימר אחד או במקבץ פריימרים אקראיים שעושים אנלינג ואז מסנתזים עם נוקליאוטידים מסומנים, כך מסמנים מקטע שלם של גן. ניתן לסמן את כולם בסימון או רק אחד מהם שיטה זו נקראת Random Priming שימוש נוסף נקרא Sequencing. ניתן גם להשתמש באנזים לסינתזה של סיב משלים ל cDNA בבניית ספריית cDNA ויצירת קצוות כהים. במצב כזה:



לא ניתן לבצע Fill In ולכן משתמשים בפעילות של האקסונוקלאז 3' ל- 5' שיחתוך את המקטע ויצור קצבות דביקים.

האנזים הבא הוא ליגאז הוא יודע לחבר קצוות שהם דביקים וקצוות כהים. יעילות חיבור הקצבות הדביקים גבוהה בהרבה. כשאנו רוצים להכניס מקטע לוקטור אז ניתן לחתוך בעזרת אנזים אחד אך אז ברוב המקרים הוקטור ייסגר על עצמו ובעיה שנייה שנוצרת היא כיוונית.

כדי לפתור בעיות אלו משתמשים באנזים אלקליין פוספטאז להסיר את הפוספט מהקצה של הוקטור מה שמונע את חיבור הליגאז לסגירה של הוקטור וכך נפתרת בעיית הסגירה העצמית. לאחר הליגציה נקבל מצב שבו שני הקצוות עברו ליגציה ושני קצוות שבהם יש nicks שלא מתחבר. את הפלסמיד הזה ניתן לקחת ולעשות טרנספורמציה לחיידקים למרות ה- nicks שהם יתוקנו אוטומטית על ידי מערכות תיקון ה- DNA בחיידקים.

יש מצבים בהם ניתן לעשות ליגציה גם שלא חותכים באותו אנזים רסטריקציה לזה קוראים Compatible Cohesive Ends



בתוצר הליגציה אין אתר המתאים לאף אחד מאנזימי רסטריקציה אלו. הרצף החופף זהה אך קביעה לחתיכה לא נקבעת רק על ידי כך שני אנזימים שונים נותנים משהו שיכול לבצע ליגציה.

נספח 3 - דוגמה לשיבוט במסגרת קריאה פתוחה.

יצירת חלבון רקומביננטי מאוחה בחיידקים.

אנו מוסיפים פפטיד קצר של מספר חומצות אמינו בין 6 ל- 10 והוא מוסף או בקצה ה- N טרמינלי או ה- C טרמינלי הוא בעל יכולת לאפשר לנו לנקות אותו בעזרת אפיניות, זיקה או קשירה לנוגדים מסחריים. לתוספת כזאת של פפטיד קצר המאפשרת ניקוי מהיר קוראים Epitope Tag התוספת השנייה היא מקטע של חלבון או חלבון נוסף שלו יש פעילות המאפשרת זיהוי של חלבון המטרה וניקויו דוגמה

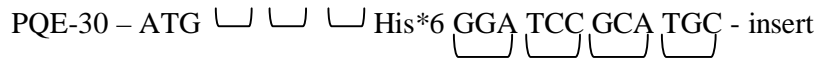
Gal Green Fluorescent Protein β מלטוז וכו'. אנו יוצרים את DNA המטרה הרקומביננטי כך שנקבל חלבון מאוחד.

אחד התגים הנפוצים הם 6 היסטידינים והוא בעל אפיניות גבוהה למתכת זו ערכית ובעיקר לניקל כך שבעזרת רצף זה שמחובר לחלבון המטרה אפשר להעביר בקולונה של אגרוז וניקל. החלבון שלנו יישאר בקולונה והשאר יצאו. ואז נקבל את החלבון שלנו נקי לגמרי.

הוקטור הוא פלסמיד ביטוי (שונה מווקטור שיבוט), פלסמיד זה מכיל פרומוטור המאוחד lac O כך שיש לנו פרומוטור אינדוקטיבי כך שבהעדר IPTG לא היה שעתוק וביטוי של החלבון. לאחר מכן יש את RBS שזה אזור קשירת ריבוזומים Ribosome Binding Site שהוא בעל רצף אופטימאלי. לאחר ATG שממנו מתחיל התרגום של החלבון הוא יושב על וקטור הביטוי ולא ב- Insert לאחריו יש 6 היסטידינים ואחריהם MCS שזה אתרי השיבוט המרובים. לכאן מכניסים את האינסרט לאחרים יש קודוני עצירה בכל מסגרת הקריאה. ה- MCS בנוי כך שמסגרת הקריאה תישאר כך שהמקטעים לאנזימי הרסטריקציה יצרו שלשות שאינן רצפי סיום.

ממשפחת PQE שהן סוגי וקטורים יש 3 סוגים הנבדלים זה מזה במסגרת הקריאה כדי לפתור בעיה זו. כדי לקבוע את מסגרת הקריאה הנכונה צריך למצוא קודם את מסגרת הקריאה של האינסרט ובודקים באיזה מסגרת קריאה מגיעות השלשות של הקודונים לאחר הרסטריקציה. עם השלשות מגיעות בבסיס שלפני אתר הרסטריקציה קוראים לזה Frame 0 עם יש בסיס אחד בשלושה אז זה Frame 1 ואם יש שני בסיסים ראשונים של אתר הרסטריקציה מצויים בשלושה אז זה Frame 2.

הדבר הראשון שיש לעשות זה לבדוק את מסגרת הקריאה מקטע DNA המטרה על האינסרט.



נספח 4 – ספריות cDNA וגנומיות כאמצעי שיבוט

ספריות cDNA וגנומיות כאמצעי שיבוט.

אם גן מסוים מתבטא טוב בתאים מסוג מסוים נלך להפיק RNA מהרקמה הזו ובזמן הנתון עם הוא מצוי בשלב מסוים בהתפתחות אז לא לחפש ביטוי בשלב התפתחותי אחר. אם אנו רוצים פרומוטור אנו נבדוק בספריה גנומית ולא בספריית cDNA.

בנית ספריה גנומית.

כאשר הוקטור הוא פאג' שיכול להכיל מקטעים גדולים מפיקים DNA כרומוזומלי מעלים באנזים רסטריקציה שהעיקול הוא חלקי כך שהמקטעים יהיו חופפים בספריה. את כל המקטעים הללו אנו מאחדים עם זרועות של פאג' λ ואת זה אורזים כחלק מהספריה בפאג'. את הפאג'ים ניתן לזרוע על צלחת של אגר המכיל דשא של חיידקים. אם אנו במיהול הנכון נקבל X צלחות עם הספריה הגנומית (המיהול הנכון הוא פאג' לחיידק)

ספריית cDNA.

ניתן ליצור ספריית ביטוי בה סורקים ברמת חלבון, בעזרת cDNA כמו לסרוק ספרייה גנומית ולהיפך. הנחה: אם דרגת השנוי האבולוציונית אז גלאי של עשרות ומאות בסיסים בדרגת שימור גבוהה יתפוס את ההומולוג המתאים בספרייה של בעל החיים. ה – Guessmer הוא פריימר אחד בגודל 70 – 30 נוקליאוטידים לפי Codon usage ובנייה של פריימר קצת יותר ארוך.

זיהוי ואפיון של גנים המתבטאים באופן דיפרנציאלי.

בונים ספריית cDNA מסומנת על ידי בסיסים מסומנים אחת עם אינדוקציה ואחת בלי אז כל הספרייה היא הגלאי ומה שלא מסומן בשניהם הוא הגן שבוטא באינדוקציה (עובד רק באינדוקציה גבוהה). באינדוקציה נמוכה משתמשים בספריית הפחתה בה מסלקים את כל הגנים הזוהים לשתי האוכלוסיות. לדוגמה בין תאי B ותאי T. מבדדים תאי B שה – DNA מסומן ב – UTP המסומן בביטוי מפיקים RNA מסוים מתאי B – T ויוצרים cDNA שהוא למעשה גדיל Anti Sense שמבצעים בו היברידיזציה בין המקטעים המשותפים ל – B ול – T. את זה נעביר דרך קולונה הנקשרת לביטוי וכך ההיברידיים יקשרו וה – cDNA החד גדילי של הגנים הדיפרנציאליים מ – T יצאו.

השיטות האלה לא מספיק רגישות ויש בהם גנים שנראים דיפרנציאליים אך הם לא ולכן תכננו שיטה של הצגה דיפרנציאלית של RT-PCR על ה RNA משני האוכלוסיות עושים רוורס טרנסקריפטאז ומקבלים cDNA, שעליו עושים PCR עם רצפים של פריימרים רנדומאליים ושל אוליגו dT ובסיסים רדיואקטיביים. מריצים בג'ל ומקבלים בנדים רבים שהם דיפרנציאליים וגם בנדים שהם לא דיפרנציאליים שאותם ניתן לחתוך מהג'ל ולהשתמש בהם כגלאי או לשיבוט.

אנליזה על ביטוי גנטי.

קיימות מספר שיטות לביצוע אנליזה לביטוי והן: (בסדר רגישות עולה).

1. Northern blot.
2. RNase Protection Assay.
3. Primer extension.
4. מאפשר אמפליפיקציה של גן המטרה RT-PCR.

בכל השיטות הללו לא ניתן להבדיל בין יצירת RNA ליציבות RNA. 1. אנליזת Northern Blot יש שיטה הכי פחות רגישה עליה למדנו כבר בעבר.

2. אנליזת RNase Protection נותנת רגישות טובה פי 10.

בשיטה זו מבצעים היברידיזציה עם מקטע אנטי סנס RNA מסומן רדיואקטיבית לאחר היברידיזציה מוסיפים RNase החותך את הסיבים הלא קשורים (כלומר החד גדילים) ואז נקבל רק את המקטע שעבר היברידיזציה כלומר מקטע המטרה המוגן מפעילות RNase.

אנו משקעים את הריאקציה לאחר הפסקת פעילות ה – RNase ואז מריצים בג'ל לקבלת בנדים לפי הגלאי ככל שיש יותר מקטעים הפס חזק יותר. ב – RNase Protection אנו משתמשים בגלאי קצר יותר המתאים לאקסון מסוים והג'ל נוח יותר להפרדה. אפשר לקחת גלאי שחלקו באקסון אחד וחלקו באקסון שני.

3. אנו מפיקים שתי תרכיבות כל אחת בתנאים שונים ומשתמשים בפריימר מסומן ב – 5' להיברידיזציה אנו משתמשים בפריימר קרוב לתחילת ה – mRNA (לנק' של 5') בתחום של לא יותר מ – 300 בסיסים מוסיפים נוקליאוטידים ו – RT והפריימר מוארך עד תחילת ה – mRNA כיוון שהפריימר בעודף אז יותר מולקולות פריימר יעברו היברידיזציה ונקבל יותר הארכות ה – RT ייפול בקצה כיוון שאין לו תבנית.

את התוצרים צריך לבדוק בג'ל לקביעת הגודל ניתן להשתמש במרקר מסומן רדיואקטיבית שיש לו פרגמנט באורך דומה למה שרוצים. ניתן לבצע גם ריאקציה קביעת רצף ל – DNA המקביל ולהריץ אותה במקביל על אותו הג'ל ואז הבנד יתקע מול הבסיס בו מתחיל השיעתוק.

4. RT-PCR זו האנליזה הכי רגישה היא מאד שימושית לשיבוט גנים אנו מתחילים מ – RNA ומסיימים עם cDNA. על ה – mRNA אנו מבצעים RT כך שהפריימר הוא רנדומאלי או אוליגו dT ומקבלים את הסיב הראשון של ה – cDNA איתו אנו מבצעים ריאקציה PCR כששני הפריימרים הספציפיים הם יכולים להיות מאמצע הגן או מסופו. רצוי מההתחלה ומהסוף וכך נוכל להבדיל בין כל האיזופורמים.

העליה של ה mRNA יכולה לנבוע או מעליה בקצב השיעתוק דבר המקביל לחוזק הפרומוטור או שינוי בקצב הפירוק של mRNA המקביל לשינוי בזמן מחצית החיים של mRNA

כדי לבדוק את קצב השיעתוק אנו יכולים לאחות את הפרומוטור עם גן מדווח כאשר האנליזה הזו עקיפה כי ההנחה שהפרומוטור מושפע ממגורם מסוים וגם שאנו לא מתעסקים פה עם ה – mRNA שלנו אלא של גן מדווח שלו יש תוצר חלבוני יציב שלא מתפרק בתא בזמן האנליזה ומצטבר. ניתן להשתמש כגן מדווח ב – β gel או CAT (כלורן פנוקול אצטיל טרנסספראז) אנו לוקחים פלסמיד ומאחים בו את הפרומוטור לגן מדווח ובודקים בשני התאים.

אפשרות נוספת לבדיקת קצב השיעתוק היא Nuclear Transcription Run Off Assay בה נותנים פולס קצר של UTP מסומן רדיואקטיבית לתאים כך שהוא נכנס ל – mRNA ויסמן אותו בזמן קצר מאד כך שקצב הפירוק זניח כי הפולס קצר. שלבי העבודה הם:

1. טיפול בתאים בתנאים השונים.
2. הפקת גרעינים.
3. סימן קצר עם GTP, CTP, ATP, ו- P^{32} UTP לזמן קצר 30 – 5 דקות בהנחה שה – RNA מספיק יציב בזמן זה ולא מתפרק. ככל שיש יותר שיעתוק של גן מסוים יותר UTP מסומן יכנס אליו.
4. הפסקת הריאקציה עם DNase שמפרק את ה – DNA הכרומוזומלי.
5. שיקוע RNA מתקבלות שתי מבחנות בהם יש RNA מסומן.
6. שלב הדיטקציה של ה – mRNA של גן המטרה על ידי היברידיזציה אנו לוקחים פילטרים טעונים חיובית שעליהם יש את ה – cDNA של גן המטרה ועם פלסמיד לגן סטנדרט (אקטין למשל) ומדגירים את זה עם כל אוכלוסיית ה – mRNA. זה המצב ההפוך מ – Northern Blot כיוון שהפילטר הוא הגלאי ועליו נצמד ה – RNA המתאים.

את פרוק ה RNA ניתן לראות על ידי Actinomycin Assay

1. אנו מגדלים תאים בתנאים השונים.
2. הוספת אקטינומיצין D זמן 0.
3. לוקחים דוגמאות והפקת RNA מכל דוגמה 20,10,5,0 דקות עד 2 – 3 שעות משתי התרביות.
4. אנליזה עם RPA (RNase Protection Assay).
5. העלאת התוצאות על גרף חצי לוגריתמי.

לימוד הקשר בין מבנה ותפקוד של חלבון באמצעות מוטגנזה מכוונת.

סכמת עבודה

1. בידוד ה – DNA למוטגנזה (כלומר או שהמקטע משובט בתוך פלסמיד או חופשי).
2. המוטגנזה עצמה.
3. טרנספורמציה לחיידקים.
4. אנליזה לזיהוי המוטנטים.
5. קביעת רצף לוידוי המוטציה (לא תמיד חייבים אלא אם כן מדובר במוטציה נקודתית).
6. מבחן (assay) לבדיקת השפעת המוטציה על פעילות החלבון.

בטבע קיימות משפחות חלבונים שלפעמים יש דמיון רב בין החלבונים במשפחה אך יש הבדל בספציפיות שלהם או באפיניות או בצורת קשירה וכו' לדוגמה פקטורי גדילה. ואנו רוצים להבין אילו אזורים בחלבון קשורים להבדל זה. את זה אנו עושים על ידי כימרות של שני החלבונים ובדיקה של מה שגורם לפעילות החלבון. המטרה היא זיהוי האזורים החשובים לפעילות.

אנו עושים זאת על ידי החלפת מקטע בחלבון עם חלבון מתאים לו במשפחה. ואז בודקים עם הכימרה מתנהגת כמו חלבון א' או כמו חלבון ב'. לשיטה זו קוראים Domain Sweeping המקטע יכול להיות פנימי או בקצוות.

אם יש רק אנזים רסטריקציה אחד אז ניתן ליצור אתר חדש לאנזים רסטריקציה באזור שבו אנו רוצים וזה על ידי מוטגנזה שקטה בה מחליפים בסיס שלישי בקוד לחומצה אמינית בלי לשנות את החומצה האמינית. במידה ובה ניתן ליצור אתרי רסטריקציה יוצרים חלבון כימרי חדש. למשל יש רצפטור שלו 2 אזורים האחד חשוב לקשירת הליגנד והשני לפעילות הרצפטור ואנו רוצים למצוא אזורים אלו. אנו נלך מהמקור למיקרו. נתחיל בלהחליף חצי מהרצפטור ואחר כך נחליף חזרה עד שנמצא את האזור המינימאלי שנותן פעילות מסוימת.

אנו יכולים ליצור כל חלבון כימרי שאנו רוצים בכל מקום שאנו רוצים בעזרת PCR על ידי קביעת מקומות שונים על הפריימרים כך שאנו משתמשים בפריימרים כימריים באזור ההחלפה. לאחר שמופיע האזור צריך להגיע לאילו חומצות אמינו בודדות שחשובות לפעולות אזור זה הוא כ – 10 עד 15 חומצות אמינו. לזה אנו משתמשים Cassette Mutagenesis.

אנו קוטעים את האזור שאנו חושבים שהוא אחראי לפעולות ואנו מסנתזים אוליגו (פריימרים) עם אתרי החיתוך המתאימים אך תכולת הבסיס תהיה שונה בחומצה אמינית אחרת כך שאנו מקבלים סדרה של מקטעים אם אותם אנזימי רסטריקציה אך עם קידוד לחומצות אמינו שונות. היתרון הוא שלא צריך שום PCR רק פריימרים עם אנלינג ועושים ליגציה לפלסמידים, טרנספורמציה וזרעים וכך מקבלים את כל הקולקציה במכה אחת. החסרונות הם שצריך אנזימי רסטריקציה בקצוות של המקטע שאנו רוצים לבדוק ולפעמים יש לאותו אנזים רסטריקציה יש מספר עותקים ואז ניתן להרוס את אחד האתרים.

מערכת הטטרה-ציקלין – מערכת המאפשרת ביטוי מושרה בתאים אנימליים.

קיימות 3 טכניקות עיקריות להחדרת DNA לתאים אנימליים כלומר, לבצע טרנספקציה, והם:

1. קלציום פוספט.
2. אלקטרופורציה.
3. ליפוזומים.

קיימות שתי גישות, טרנספקציה זמנית Transient Transfection וטרנספקציה קבועה Stable Transfection. יעילות הטרנספקציה משתנה בין התאים השונים התאים שמשמשים בהם הם תאים סרטניים מחיה או תאים מרקמה ראשונית של חייה ויוצרים בהם טרנספורמציה סרטנית ומהם מקבלים קו חיים.

קיים ביטוי של DNA המטרה בחלון זמן של 12 – 96 שעות מרגע הטרנספקציה ואז יש פיק של ביטוי גן המטרה ואז יש דעיכה של מ – 50% ל – 1% ואף פחות. ה – DNA נבלע בתאי הבת ולא עובר חלוקה עם התא המאחסן, זה המצב בדרך כלל אך יש דרך לגרום לו להתחלק. כל זמן החלוקה הפלסמיד נמהל וכמות התאים המכילים את הפלסמיד קטנה פי 2 בכל חלוקה.

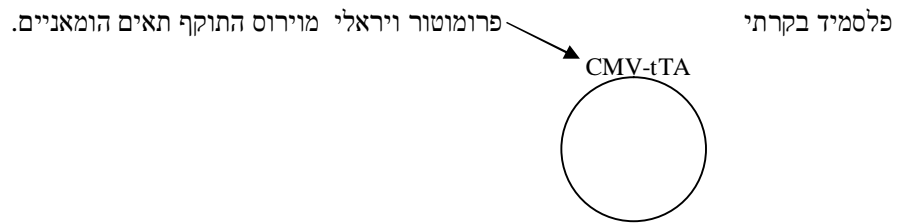
בנוסף הפלסמיד מותקף על ידי נוקלאזות בגרעין הגורמות לפירוקו. באחוז מאד נמוך של התאים הפלסמיד עובר אינטגרציה אקראית לחלוטין לגנום. וזה הטרנספקציה הקבועה, כלומר כל טרנספקציה קבועה מתחילה מזמנית וכאשר הפלסמיד מתחבר לגנום הוא מתחלק עם התאים ולאחר 96 – 48 שעות מהטרנספקציה אנו מבצעים סלקציה.

כיוון שהטרנספקציה מתרחשת באחוז נמוך של התאים צריך להרוג את כל התאים האחרים. את זה עושים על ידי גן לעמידות המצוי על הפלסמיד. הסלקציה היא בדרך כלל אנטיביוטיקה. הסלקציה היא תהליך של 2 – 6 שבועות. יתכן מצב שיעבור רק הגן לעמידות, כך יתקבלו מושבות עמידות אך לא מבטאות את גן המטרה. ולכן צריך לבצע סריקה על ידי העברת המושבות לצלחות אחרות ובדיקת ביטוי בהם.

ניתן לשלוט על עוצמת הביטוי של גן המטרה ניתן להגיע למצב בו הגן יכנס לגנום אבל לא יהיה פעיל וניתן להפעילו או להפסיק את פעולתו לפי רצון. הדבר חשוב בגן טוקסי או ב – Tumor Suppressor. המערכת שפותחה היא על בסיס מערכת חיידיקית. לדוגמה אופרון הלקטוז וכו' שהם פתוחים או סגורים כתלות במה שיש במצע. אם נכניס אלמנטים אלו לתאים אנימליים יש סיכוי לקבל מערכת מושרת ברמה טובה או מערכת אינרטי.

המערכת פותחה על ה – tet R (= טטרה-ציקלין) הפעיל בתא כדימר והוא ניקשר ל – tet Operator שמדליק את הגנים האחרים לפירוק הטטרה-ציקלין כאשר הרפרסור קשור לאופרטור אין שיעתוק. יש לנו כאן אלמנט בקרתי שהוא ה – tet R ואלמנט תגובתי שהוא האופרטור. אם נעביר אותם לתא אנימלי נוכל ליצור בו מערכת מושרת.

השלב הראשון הוא הפיכה של ה – tet R מרפרסור לאקטיבטור כיוון שיותר קל לבצע אקטיבציה מאשר רפרסיה, והאקטיבציה מהירה יותר. את זה עושים על ידי לקיחת ה – 207 חומצות אמינו הראשונות של ה – DBD (DNA Binding Domain) המאפשרות קשירה לאופרטור ומחברים אותם ל – vp16 השייך לוירוס ההרפס והוא מאקטב חזק ויוצר חלבון כימרי חדש הנקרא (tTA Tetracycline Trans Activator).



פלסמיד תגובתי בנוי מ – 7 חזרות של 42 בסיסים שהם ה – tet אופרטור וכל 42 בסיסים מתאימים לקישור דימר של הטרנס אקטיבטור. זה שולט על פרומוטור של CMV הגורם לשיעתוק של גן המטרה. לאלמנט של 7 החזרות כולל ה – CMV קוראים TRE שזה Tetracycline Response Element.

אנו מבצעים שני טרנספקציות קבועות לקו החיים שלנו הראשונה עם פלסמיד הבקרתי ואז נקבל קו חיים המבטא את ה – tTA באופן קונסטיטוטיבי אך הוא אינרטי כי אין לו לאיפה להיקשר. לקו תאים זה עושים טרנספקציה שנייה עם הפלסמיד התגובתי. כל עוד אין טטרה-ציקלין במדיום אז ניקשר ה – tTA ל – TRE מהאופרטור ומאקטב שיעתוק, כלומר כל עוד אין לנו טטרה-ציקלין יש ביטוי. אך כשיש טטרה-ציקלין הוא יקשר לאקטיבטור ויגרם לו להתנתק מה – TRE וכך יש הפסקה בביטוי הגן שלנו. מערכת זו נקראת tet Off כי אנו מכבים את הגן בהוספת הטטרה-ציקלין.

מערכת זו מאפשרת לבצע את הניסוי גם In Vivo בחיה שלמה. כלומר מזריקים לעכבר את התאים ונותנים לעכבר מי שתייה עם או בלי טטרה-ציקלין. ניתן גם לשלוט במיקום על ידי יצירת עכבר טראנסגני שמבטא את הפלסמיד בכל הרקמות אבל את ה – tTA שמאקטב את הפרומוטור נבטא רק ברקמה ספציפית (Tissue Specific Promotor) TSP. ונבצע הכלאה עם עכבר טראנסגני שני המבטא את גן המטרה בכל הרקמות. בצאצאים יתקבל עכבר טראנסגני שלישי במבטא גם את ה – tTA וגם את גן המטרה אך גן המטרה יבוטא רק ברקמה בה מבוטא ה – tTA.

- נספח 5 – מערכת הטטרה-ציקלין.
- נספח 6 – מערכת הבקולוורוס לביטוי גנים אאוקריוטים.
- נספח 7 – דף עזר / הסבר למערכת הבקולוורוס.

רטרווירוסים כאמצעי להעברת גנים.

רטרווירוסים הם וירוסים של RNA המועבר ל – DNA עובר אינטגרציה לגנום ומתנהג כמו גנים רגילים. היתרונות שלו שטווח המאחסנים רחב כך שניתן להדביק תאים ראשוניים וחיות שלמות. כשרוצים ליצור רקמה טראנסגנית האופציה שכמעט בלעדית בכדי לעשות זאת היא על ידי רטרווירוס כי יעילות ההדבקה מאד גבוהה. הוירוס הוא לא ליטי ונשאר יציב בגנום. ניתן לשבט מקטעים גדולים עד 7Kb של cDNA או DNA גנומי. הכנסת ה – DNA לגנום הוא בצורה מדויקת בין שני ה – LTR. החסרונות הם יצור וירוס רקומביננטי דורש וירוס עזר או השלמת פונקציות חסרות. וגם רקומבינציות הומולוגית יכולות ליצור וירוסים תקינים. בנוסף הרטרווירוסים מדביקים רק תאים מתחלקים.

יצירת רטרווירוס היא על ידי שיבוט האזור הרצוי מפלסמיד המכיל גם את ה – LTR. לשם כך מבצעים טרנספקציה לתא העוזר שיגרום ליצור הוירוסים זה קו תאים שעובר טרנספקציה ביעילות גבוהה ללא קשר לתאי המטרה. בשלב הבא עושים אינפקציה עם הוירוס W.T. מטרתה לספק בטרנס את הפונקציות החסרות של ה – gag, pol, env מתקבלים שני אוכלוסיות של וירוסים W.T. ורקומביננטים. עם התערובת של הוירוסים שמתקבלת מדביקים תאי המטרה.

ניתן להדביק חיה שלמה ולקבל מספר רב של מחזורי הדבקה. וניתן גם להדביק תא ראשוני. החסרונות הם שיש שתי אוכלוסיות וירוס ורק חלק מהוירוסים המשתחררים למדיום הם רקומביננטים לפעמים קשה לעשות טרנספקציה של הקישור לתא המטרה. בנוסף גם המערכת החיסונית פועלת נגד וירוסים אלו. ניתן ליצור מערכת שתיתן לנו את הוירוסים הרקומביננטים בלבד וזאת על ידי יצירת קו תאים שיבטאו את gag, pol, env – במקום הוירוס העוזר ואז מתקבלים רק וירוסים רקומביננטים לזה קוראים Helper Free או Packaging Cell line השלמת הפונקציות החסרות בוקטור הביטוי נעשית על ידי טרנספקציה של הוקטור לקו תאים מיוחד המכיל עותק שלם ותקין של הרטרווירוס כפרו-וירוס כלומר שעבר אינטגרציה לגנום התא המאחסן. אבל חסר את הרצף שמזוהה על ידי מערכת האריזה (סיגנל הפסיי Ψ) כלומר הפרו-וירוס יוצר את החלבונים שאורזים את הוירוס הרקומביננטי אך לא את ה – RNA של עצמו כך מקבלים רק וירוסים רקומביננטים אך ניתן לבצע רק מחזור הדבקה אחד ותאים שנדבקו יבטאו את גן המטרה. בנוסף ניתן לעקוב גם אחר תא יחיד. ניתן להגיע בשיטה זו לטיטר של 10^6 - 10^8 cfu/ml שזה טיטר מאוד גדול.

היום משתמשים בוירוסים המדביקים גם תאים מתחלקים וגם לא בנוסף שהגן עובר אינטגרציה לגנום וגם יש ביטוי קבע. כך הגיעו ללנטיווירוסים שהם משפחה של רטרווירוסים ולכן משתמשים ב – HIV במשפחה זו. בשימוש בוירוסים אלו ראו שמתקבל ביטוי גם חצי שנה לאחר ההדבקה לרקמה הלא מתחלקת.

לאחר ה – LTR יש CMV שזה פרומוטור הדוחף ביטוי של הטרנס אקטיבטור לאחר הפרומוטור האינדיקטורילי שדוחף את ביטוי הגן הרצוי GFP במקרה זה ואז שוב LTR. החיסרון שיש דליפה כי יש שני פרומוטורים חזקים אחד אחרי השני והם גורמים לביטוי גם ללא שליטת הטרה-ציקלין. אנו לא צריכים את ה – CMV כיוון שה – LTR הוא פרומוטור חזק מספיק ולא צריך עוד פרומוטור ואם נוריד אותו נוריד את הליקיות. לא ניתן ליצור קו חיים סטבילי שיצור וירוסים אלו כי אין גן לעמידות.

עכברים טראנסגנים.

השיטה היעילה ביותר היא טרנספקציה ל – Embryonic Stem Cells:

1. טרנספקציה לתאי ES עם פלסמיד המכיל את גן המטרה וגן לעמידות. אנו זורעים אותם על פיברובלסטים כדי שלא יעברו התמינות כלומר אלקטרופורציה או הדבקה ויראלית עם רטרווירוס.
2. הפעלת סלקציה למשל עם 418G בידוד מושבות עמידות ואנליזה לביטוי הטרנסגנים.
3. הזרקת התאים לבלסטוציט של עכבר אחר והשתלה שלו ברחם של עכברה עם הריון מדומה מתקבל עכבר כימרי. הטרנסגן יכול להיות ברקמות שונות בהתאם להיכן שהם השתלבו בבלסטוציט.
4. הכלאת Tg X Tg בדור F₂ עכבר טראנסגני מלא שעבר בתאי המין אך לא בהכרח שהטרנסגן מתבטא.

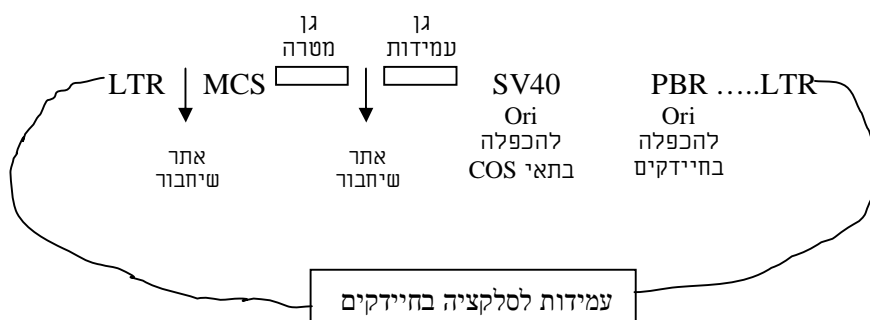
5. אנליזה לביטוי הטראנסגן.

זה לוקח שנה לקבל צאצאים טראנסגנים שמבטאים את הטראנסגן. יכול להיות מושבות עם הרבה עותקים של הפלסמיד וכאלו עם מעט עותקים. טראנסגני לא חייב להיות זר יכול להיות גם גן מהעכבר שיבוטא במקום ובזמן לא רגיל.

אנו יכולים לעשות את העכבר ב – 3 סוגים: בראשון ביטוי הגן בכל רקמות העכבר במקום ברקמה ספציפית ואז מחברים את הגן לפרומוטור שמתבטא בכל הרקמות לדוגמה לאקטין. סוג שני שבו הטראנסגן מבוטא ברקמה ספציפית שבה הוא לא מתבטא בדרך כלל כאן הפרומוטור ספציפי לרקמה בה אנו רוצים לבדוק ביטוי. סוג שלישי הוא הסוג בו שולטים על מקום הביטוי ופעולתו על ידי מערכת של טטרה-ציקלין.

הערות:

מבנה וקטור ויראלי:



הוקטור מכיל גם אזורים לאריזה ולשעתוק לאחור. השיחבור נועד כדי לתת גם את גן העמידות וגם את גן המטרה.

הנספחים בעמוד הבא.

ט.ל.ח.