

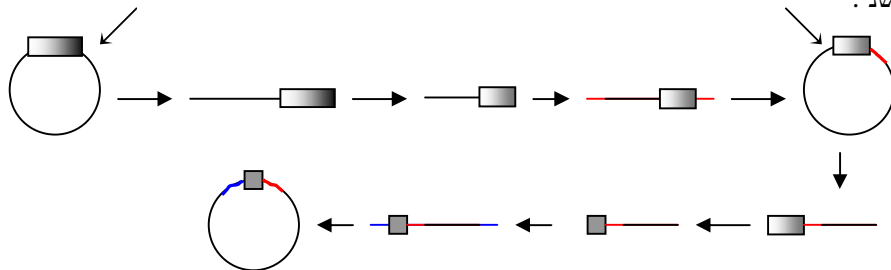
## סיכומים בהנדסה גנטית חלק ב'

כשמסתכלים על גן ב- ORF (Open reading frame) אנו יכולים לראות אלו פונקציות יכול הגן לעשות. כמו כן ניתן למצוא אזורים שמורים באבולוציה כלומר, בעלי אותה פעילות בגנים שונים. כדי להוכיח קיום אזורים אלו צריך לבצע בהם שינויים ולראות מה השינוי שיגרם מכך. לפני ההנדסה הגנטית הדברים היו אפשריים רק בחיידקים ובתאי שמרים. והייתה קימת בעיה לחקור דברים מורכבים יותר. ההנדסה הגנטית נתנה לנו את היכולת לבודד גן ולעשות לו מניפולציות ולאחר מכן להחזיר אותו אל תוך התא כך שיבוא לידי ביטוי. לגנטיקה זו קוראים גנטיקה הפוכה כי אנו יוצרים את המוטציה ובודקים את הפנוטיפ. בניגוד לגנטיקה ישירה בה מבודדים מוטציות קיימות ומחפשים מה השינוי בגן.

קיימות שתי גישות למוטגנזה האחת היא אקראית והשנייה מכוונת. הגישות כוללות יצירת מוטאנטים בגן המבודד המצוי על פלסמיד, טרנספורמציה לחיידקים לגידול הפלסמיד, כאן חייבת להיות עמידות בכדי לוודא את כניסת הפלסמיד לחיידק. לאחר מכן לוקחים מושבה מגדלים אותה ומפיקים את הפלסמיד מבצעים בדיקת רצף ואנליזה להשפעת המוטציה על הפונקציה שנבדקה. בשיטות אלו ניתן לבדוק פעילות אנזימטית או כל גורם שהוא. על מנת לבדוק פרומוטורים אנו משתמשים בגן מדווח. ניתן להפיק כל מושבה לחוד וגם ניתן להכין ספרייה של מוטאנטים ואז אוספים את כל המושבות ומהם ניתן לבודד מוטציה רצויה.

כשאנו חוקרים אזורים בעלי תפקיד בגן אנו צריכים לקחת בחשבון את העובדה שפגיעה בחלבון תגרום לשינוי מרחבי דבר שיכול לפגוע בפעילות החלבון ללא פגיעה באתר הפעיל כיוון שכך יתכן שהחלבון לא יוכל לקשור את הליגנד. ולכן חייבים לדעת את מבנה השלישוני של החלבון. כשקיימות משפחות חלבונים ניתן לנבא את המבנה של שאר חלבוני המשפחה מידעת חלק קטן מהם. כשרוצים לבדוק את הפעילות בחלבון אנו עושים מוטציה מהאזור שייתן את החלק החיצוני של החלבון המקופל. וזאת כיוון שהחלק הפנימי לא משנה לנו. לכן חשוב לדעת את המבנה המרחבי.

בכדי לדעת מהו האזור המינימאלי בחלבון האחראי לפעולה מסוימת יש לבצע חסרים מהקצוות ולכך יש שתי גישות שונות. האחת היא על ידי אתרי רסטריקציה בגן ואז יש להוסיף לינקר שזה אוליגו נוקליאוטידים המכיל קודון איניציאציה ואפשרות לתעתוק של הגן. בנוסף גם אתר שיבוט לאותו אנזים בפלסמיד. גישה שנייה היא העברת הפלסמיד לינריזציה ואז שימוש באקסונוקליאזות לחתוך את הקצוות כך שמתקבלת תערובת של אורכים שונים. כדי לסגור את הפלסמידים הללו צריך להוסיף לינקר המכיל מינימום 6 בסיסים וניתן לקריאה בשלושת מסגרות הקריאה השונות. לאחר מכן אנו מוציאים את הגן מהפלסמיד על ידי חיתוך והפרדה בגל או בקולונה ומחדירים את הגן לפלסמיד חדש. בו תתבצע החתיכה מהצד השני.



ניתן לבצע מוטציה נקודתית במקום רצוי בעזרת PCR בה מתחילים מפרגמנט DNA המשובט בתוך פלסמיד המקודד או נגזר מפאג' בעל DNA חד גדילי אשר חייב לעבור למצב דו גדילי בחיידק. אנו לא יכולים להשתמש בשיטה זו באנזימי רסטריקציה כיוון שלא יכולים לחתוך DNA חד גדילי. הצורה בה הוירוס שנמצא בחיידק מכפיל את ה- DNA שלו נקראת (RF) Replicative Form. בכדי לבצע את המוטציה אנו מסנתזים אוליגו המכיל כבר בתוכו את המוטציה הנקודתית אז מבצעים היברידיזציה של האוליגו לפלסמיד החד גדילי (לתהליך זה קוראים אנלינג) כך נוצר חוסר התאמה נקודתי. לאחר מכן משתמשים ב- DNA פולימראז לסנתז את שאר הסיב של ה- DNA ומתקבל פלסמיד דו גדילי RF אותו מרבים בחיידקים ומהם מתקבלים שני סוגים של וירוסים (פאג'ים) האחד WT והשני מוטנטי. כדי להפריד

בניהם פותחה שיטה בה גורמים ל – DNA של ה – WT בחיידקים להרס על ידי כך שיוצא מוכנס לפלסמיד ומכיוון שמדובר ב – DNA ולא יכול להיות בו U אז הוא מפורק. אנו משתמשים בפאג' M13 ומגדלים אותו בשלב הראשון בחיידקים Ung- ולאחר מכן מעבירים לחיידקים שהם Ung+.

שיטה זו ארוכה יותר כי יש צורך להכין את הפאג' שמכיל את היוצא וצריך לבדוק את יעילות חדירתו. כמו כן צריך לגדל מספר רב של פעמים עד שמדביקים הרבה Ung+ ולא מקבלים פאג'ים. חסרון נוסף לשיטה זו הוא שלא ניתן להשתמש במקטעים גדולים מידי של DNA. כיוון שהפאג' מיד (פלסמיד שיכול לתפקד הן כפלסמיד והן כפאג') הוא קטן.

ב – PCR ניתן ליצור לא רק מוטציות נקודתיות אלא גם כימרות של חלבונים בשיטת ה – Domain Swapping. כאשר אנו רוצים מוטציה קרובה לקצה אז מכינים אוליגו עם המוטציה בקצה. כאשר רוצים לעשות מוטציה באמצע נשתמש באוליגו באמצע עם המוטציה ואז נקבל השלמה מהאמצע עד אחד הקצוות ולהמשך ההשלמה נצטרך להשתמש בפריימרים נוספים. ה – PCR נותן קצה כזה וכשניסו להוסיף אתר חיתוך בקצה התברר שהדבר לא תמיד עובד. ה – taq מוסיף את הנוקליאוטיד A בקצה בתהליך ה – PCR ואנו משתמשים בווקטור המכיל T בקצה. וכך אין צורך לבצע מניפולציות בהכנסת הגן לווקטור. ווקטור זה הוא פלסמיד מעבר ולא פלסמיד ביטוי ולכן אין חשיבות בכיוונית. לאחר יצירת פלסמיד זה ניתן להשתמש באתרי רסריקציה להוצאת ה – Insert והכנסתו לפלסמיד ביטוי.

כיום ניתן ליצור הורמון גדילה בחיידקים ולתת אותו כתרופה לאנשים. אך יש צורך ליצור אותו בכמויות גדולות דבר זה הוא תהליך יקר. ולכן יש לפתח אנלוגים להורמון כלומר, הורמוני גדילה בעלי מוטציות שישגבירו את יעילותם על ידי הגברת היציבות או האפניות או גורמים נוספים. בכדי להפעיל רצפטור של הורמון גדילה יש צורך לקרב 2 מולקולות רצפטור אחת לשנייה וליצור דימריזציה. בעזרת מוטגנזה ניתן לדעת אילו חומצות אמינו נחוצות באתרי הקישור ובאתרי הפעילות. בעזרת מוטציות משנים כל אחד ואחת מהם ובודקים את ההשפעה. לצורך כך יש להכין המון מוטציות וזה לוקח זמן רב. ולכן פותחו הדרכים השונות היעילות והמהירות יותר לביצוע מוטגנזה. מה שעושים זה מכינים תערובת של פריימרים לאזור בו רוצים לבצע מוטגנזה כך שרצף הבסיסים שונה כל פעם בחומצת אמינו אחרת. פריימרים אלו עושים היברידיזציה ל – DNA לקבלת DNA דו גדילי אשר מוכנס לפלסמיד המוחדר לחיידקים, אשר אותם מגדלים ומהם מבודדים את המוטאנט הרצוי. הפריימרים מוכנסים לווקטור כמו קסטות ומכאן שמה של שיטה זו היא Cassette Mutagenesis. את המוטאנטים מכניסים לפלסמיד שיאפשר ליצור וירוס. פלסמידים אלו הם על בסיס של M13 בידוד הפלסמיד מתבצע על ידי מרקר לעמידות אשר נמצא בפלסמידים עם ה – Insert.

כשיש מוטציה אחת בלבד עקרון העבודה מורכב מ – 8 שלבים, והם:

1. פתיחת הפלסמיד.
2. סינתזה של שני פריימרים מוטנטים קומפלימנטרים.
3. היברידיזציה של הפריימרים.
4. שיבוט לתוך הפלסמיד מסעיף 1.
5. אנליזה לנוכחות מוטציה.
6. ביטוי של החלבון המוטנטי.
7. ניקוי החלבון מתערובת.
8. בדיקת השפעת המוטציה על הפעילות במערכת המתאימה.

וירוס מכיל גנים למעטפת וגנים הנחוצים ליצירת חלבונים החשובים בתהליך ההדבקה. ניתן לייצר וירוס שאחד מחלבוני המעטפת שלו ישונה כך שהוא יבטא את החלבון שאנו מחפשים כלומר, מקבלים וירוס שעל המעטפת שלו מוצג חלבון. לשיטה זו קוראים Phage Display. כאשר מוצאים פאג' שנקשר טוב יותר לרצפטור מה – WT ניתן לבודד אותו וממנו להוציא את החלבון. בשיטה זו אנו משתמשים בפאג' M13 בו יש גן הנקרא Gene III אשר אליו מוסיפים את החלבון שלנו והוא גורם לבליטה של החלבון ממעטפת הפאג'.

את הרצפטור ניתן ליצור בצורה מסיסה בשיטת הנדסה גנטית ולקשור אליו סמן (תג). על צלחת אנו מוסיפים נוגדן לתג ועליו מוסיפים את הרצפטור. כך הרצפטור נשאר מקובע על הצלחת. על זה מוסיפים את הוירוסים המכילים את החלבונים השונים המוצגים ושוטפים את העודף. הפאג'ים שנשארים קשורים חזק לרצפטור הם אלו המכילים את החלבונים הרצויים. בשלב הבא משחררים את הפאג'ים האלו על ידי הוספת מלח או הורדת ה-pH. את התערובת הזו מגדלים בחיידקים וחוזרים על התהליך כ-3 עד 5 פעמים. וזאת בכדי לבצע העשרה של הפאג'ים עם החלבון הרלוונטי. לתהליך זה קוראים Panning. ובסופו מתקבלים 2 עד 3 מוטנטים שקושרים את הרצפטור במידה מאד מאד חזקה.

הגנום הנגיפי מוגבל בגודלו ולכן ניתן לשימוש בחלבונים קטנים או בקטעים מחלבונים אחרים. אנו מחליפים חלק מגן 3 המכיל בעצמו קודון עצירה ולכן משתמשים בסופרסור של קודון העצירה הזה בכדי לאפשר את התרגום. (אמבר סופרסור).

### החדרת גנים לתאים אנימליים.

ישנם חלבונים רבים שלא ניתן לחקור אותם בשמרים או בחיידקים בקטגוריה זו מדברים בעיקר על חלבונים לא מופרשים ולכן יש צורך לבטאם בתוך התא האנימלי. בחלבונים הומאניים רבים אין אפשרות לביטוי בחיידקים כיוון ששם כמעט ולא נוצרים קשרי SS ולא מקבלים דימרים פעילים. ולכן חובה להשתמש במערכות אנימליות. כדי להכניס גנים לתוך תאים צריך קודם כל ליצור תרבית תאים. ישנם תרביות של תאים מסוגים שונים כמו תאי עצב תאי שריר תאים מכלי דם וכו'. הרעיון לשיטה הגיע מוירוסים אשר מחדירים את הגינום שלהם לתוך התא ומשכפלים את עצמם שם. בשלבים הראשונים של השיטה השתמשו בטכניקת המיקרו הזרקה שם הוזרק DNA לתוך התא, לשיטה זו יש יתרון שניתן לראות שאכן בוצעה ההזרקה אך החיסרון הוא שיש יכולת להזריק רק לכמות תאים מועטה. כיום משתמשים בשיטה זו רק באאוציטים של צפרדעים.

השיטה שהביאה לפריצת דרך הייתה על ידי קלציום פוספט היוצר משקע המכיל DNA ומשזורקים אותו על תאים מוכנס ה-DNA פנימה על פי רעיון של מיקרו-טרנספורמציה בחיידקים. את הקלציום פוספט מייצרים על ידי קלציום ובופר פוספט. כאשר הוא נוגע בתאים הוא מוחדר פנימה באנדוציטוזה יחד עם ה-DNA המצוי בתערובת חלק מ-DNA זה מפורק על ידי נוקלאזות וחלק עובר אינטגרציה ונשאר בגנום.

שיטה זו הביאה לפריצת דרך גם בהבנת מחלת הסרטן כיוון שגילו כי ניתן להחדיר DNA לתאים. כאשר מוחדר DNA של גורמי גדילה הדבר יכול להביא לטרנספורמציה סרטנית. תאי פיברובלסט NIH/3T3 הם תאים שיעילות הטרנספקציה (החדרת DNA אליהם) מאד גדולה. כשתאים אלו קיבלו את ה-DNA בטרנספקציה הם החלו להתחלק ולהתרבות כך שנוצרו צברים אשר לא יצרו קונטאקט איניביישן כלומר, יצירת מרבד של תאים הנוגעים אחד בשני ואז מפסיקים לגדול. הצטברות התאים נקראת פוקוס Focus (ברבים Foci).

את ה-DNA מתאים סרטניים החדירו לתאי ה-NIH/3T3 וקבלו פוקוסים. ומהם בודד הגן שגרם לסרטן. התברר כי גנים אלו הם גנים החשובים לפעילות נורמאלית של התאים במסלולי הדיפרנציאציה ומחזור התא. תאי ה-NIH/3T3 גדלים ממלאים את הצלחת הם הופכים לסרטניים בעצמם באופן ספונטאני ולכן צריך כל כמה ימים להשתמש בטרופסין לשם ניתוקם מהצלחות ודילולם בצלחות חדשות. כל 3 ימים יש צורך לעשות טראנסלוקציה כלומר, להעביר את התאים לצלחות אחרות לריכוז של 300000 תאים למיליטר. ומכאן השם 3T3. בתאים הומאניים שיטה זו של טרנספקציה לא יעילה ולכן פותחו שיטות אחרות עליהן נדבר בהמשך.

יעילות הטרנספקציה עצמה נמוכה וכדי לחקור אנו צריכים תרבית שבה 100% מהתאים מבטאים את הגן שלנו. ולכן יש צורך לבצע סלקציה שמטרתה לשמור את ה-DNA של התאים בצורה יציבה לזמן רב כלומר, יצירת טרנספקציה סטבילית. בטרנספקציה ארעית (TRANSIENT) אנו רואים כי 50% מהתאים מקבלים את ה-DNA וכעבור מספר ימים נשארים רק כ-1% מהתאים עם הגן המוסף. ולכן אנו מוסיפים מרקר מהווה גורם לסלקציה בעזרת עמידות לאנטיביוטיקה או גן שעוקף מעכבים של סינתזה

דה-נובו של נוקליאוטידים. ואנו מוסיפים מרכיבים המפעילים את מסלול ההצלה. גורם סלקציה נוסף ונפוץ הוא מעכב סינתזת חלבון והוא ניאומיצין או G418. קבוצה נוספת של חומרים היכולה לשמש לסלקציה היא חומרים הגורמים לנזקים ב-DNA או חומרים שמעכבים את חלוקת התא. כמו קולכיצין.

נוקליאוטידים יכולים להיווצר בגוף בשתי דרכים האחד מחדש (דה-נובו) או במנגנון ההצלה. אם אנו משתמשים באמינו-פטריין שמעכב סינתזה דה-נובו אז תא זה הוא TK- או HPRT- ימות. אין הרבה תאים שהם HPRT- ומשתמשים בתאים שהם TK- ולמדיום קוראים HAT שזה TK HPRT Aminopterin. הרפס הוא וירוס ענקי הזקוק לאנזים TK וניתן להשתמש בסלקציה הזו אך חייבים להשתמש בתאים שהם TK- בכדי שהסלקציה תתבצע.

המרקר לסלקציה יכול להיות על אותו פלסמיד של גן המטרה או על פלסמיד אחר ואז צריך לבצע קו-טרנספקציה כלומר, להדביק את התאים בשתי פלסמידים. במקרה זה מתקבל מצב שלא כל תא עמיד מבטא את גן המטרה כיוון שלא חייבת להיות כניסה משותפת של שתי הפלסמידים לאותו תא. בשיטה זו עלינו לסרוק את כל המושבות העמידות על מנת לגלות אלו מהן מכילות את הגן הרצוי. בדרך כלל כאשר מבצעים קו-טרנספקציה אז שני הפלסמידים נכנסים לאותו אזור בגנום.

מערכת ביטוי טיפוסית צריכה להכיל מרכיבים שיאפשרו לה להתרבות בחיידקים. אנו צריכים אתר לשיבוט הגן שלנו פרומוטור לביטוי רצפים לטרמינציה ורצף שגורם להוספת פולי A. הגן לסלקציה והגן שלנו יכולים להיות תחת אותו פרומוטור כאשר מדובר בחיידקים אך לא ביצורים אנימליים בהם חייב להיות אתר Splicing בין שני הגנים. הווקטור של מוליגן מכיל לאחור אתר השיבוט אתר לשיבוט כך מתקבל מצב בו מקבלים את הגן הראשון בלבד כלומר את גן המטרה או את גן המטרה וגן העמידות. כיום משתמשים בשני פרומוטורים בכיווניות הפוכה ובמקומות רחוקים אחד מהשני על הפלסמיד בכדי למנוע הפרעה בניהם. הפרומוטורים יכולים להיות מוירוסים ובניהם יש כאלו שמבוטאים באופן קונסטיטוטיבי ויש כאלו שהפעלתם תלויה בגורם מסוים וניתן לשלוט בהם להפעלה או לכיבוי של הגנים. לפרומוטורים כאלה קוראים פרומוטורים הינדיסויבילים. אחד הפרומוטורים שבהם ניתן להשתמש הוא מהוירוס MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus). וירוס זה גורם לסרטן בבלוטת החלב של עכברות בזמן ההיריון. פרומוטור זה רגיש למתכות ולכן ניתן להשתמש בו. קיימים פרומוטורים שונים כולל כאלו המתבטאים רק ברקמות מסוימות (Tissue Specific).

קיימות מערכות להגברת הביטוי של הגן אחת מהן היא מערכת של תאי COS תאים אלו יכולים לבטא גנים ברמת ביטוי גבוהה מקורם של תאים אלו הוא מרקמת אפיתל בקוף. הוירוס SV40 הוא וירוס בעל DNA מעגלי הוירוס הזה גדל בתאים של קופים והוא נגיף ליטי. לצורך הרפליקציה שלו מיוצר החלבון T אנטיגן (Larg T או LT) חלבון זה נקשר ל-Ori של הוירוס וגורם להכפלתו. בנוסף לכך הוא גם נקשר לאינהנסור ומגביר סינתזה של חלבונים. כאשר לוקחים תאים של קוף ומבצעים בתוכם את LT אז גן זה עובר אינטגרציה עם ה-DNA הגנומי.

כיוון שמאד קשה להכניס DNA לתאים אנימליים בשיטת הקלציום פוספאט פותחו שיטות נוספות ואחת מהן היא על ידי וירוסים. שיטה זו חשובה מאד ב-Gene Therapy. שיטה נוספת להכנסת DNA היא על ידי אלקטרופורציה, בשיטה זו על ידי שוק חשמלי גורמים לממבראנה להיפתח וכך חודר ה-DNA פנימה כתוצאה מטראומה זו שורדים רק כ-50% מהתאים. ועל אילו השורדים יש לבצע סלקציה. שיטה נוספת היא על ידי ליפוזומים אשר מתאחים עם התאים ואז ה-DNA נכנס פנימה חלקו מגיע לגרעין ועובר אינטגרציה שיטה זו יקרה יותר מקלציום פוספאט.

### החדרת DNA על ידי וירוסים

וירוסים יכולים לשמש כ-Shuttle שמעבירה DNA לתוך התא ובכך להדביק יצורים שלמים. נגיף הוא אורגניזם מאד פשוט המכיל מעט גנים. הוא ככל שמספר הגנים קטן יותר בווירוס יש לו פחות פונקציות שלו והוא יותר תלוי בפונקציות התא אותו הוא מדביק. ברטרווירוס יש גן אחד לצורך יצירת ה-DNA מה-RNA. ומספר גנים סטרקטורלים. בנוסף לכך יש עוד גן המקודד לחלבון שהוא גליקופורטאין של

הוירוס. הגנום של הוירוסים מצוי בתוך קפסיד ולכן יש מגבלה לגודלו. וכדי להכניס גן שלנו לתוך גנום הוירוס יש להוציא גן מתוך הוירוס ובכך מתקבל נגיף דפקטיבי.

אחד הדברים החשובים שניתן לבצע בעזרת נגיפים הוא קביעת מפת גורל. וזאת בזמן ההתפתחות העוברית. אנו מדביקים את התאים בוירוסים שמקנים להם צבע. ואז בודקים להיכן הם נודדים. ניתן לעשות זאת גם ממספר צבעים שונים וכך לקבל מפה של התמינות ונדידה של תאים בגוף. בוירוסים ניתן להשתמש גם למטרות ריפוי וזאת על ידי הכנסת גן תקין אל התאים.

הרטרווירוס מכיל שני מולקולות RNA בגנום שלו והוא לא נגיף ליטי. ולכן ניתן להשתמש בו לריפוי גנטי כיוון שהוא גורם אינטגרציה לתוך גנום המאחסן. בנוסף למולקולות ה-RNA יש בקפסיד הוירוס גם את האנזים רוורס טרנסקריפטאז. ב-RNA יש 3 גנים והם pol אשר יוצר את הפולימראז והאינטגרז, gag האחראי לייצור גליקופרוטאינים ו-env שהוא אחראי ליצירת חלבוני המעטפת.

הרטרווירוסים הם וירוסים מורכבים המכילים מעטפת חיצונית ליפידית. בהדבקה התא מעטפת זו מתאחה עם ממברנת התא והקפסיד נכנס לציטוזול ממנו יוצא ה-RNA ואנזים RT המסנתז את הסיב הראשון של ה-DNA אז מפורק ה-RNA על ידי פונקציה של RNaseH שמפרק RNA שקשור ל-DNA. פונקציה זו מתבצעת על ידי אותו אנזים RT אך באתר אחר בו. אז מתבצעת השלמה של הסיב השני של DNA ומתקבל DNA מעגלי אשר נכנס לגרעין ועובר אינטראקציה לגנום. שם הוא יוצר RNA שיוצא לציטופלזמה וגורם ליצירת חלבוני הנגיף. וגם את ה-RNA של הנגיף עצמו. חלבוני המעטפת נוצרים ב-RER והם גליקופרוטאינים. ולכן הם יכולים לתת פעילות אנטיגנית. הרטרווירוסים מסוגלים להדביק רק תאים מתחלקים ולכן קיימת בעיה מסוימת בשימוש בהם בריפוי גנטי כיוון שתאים רבים בגופינו אינם מתחלקים לכן בריפוי גנטי משתמשים בסוג מסוים של רטרווירוסים השייך למשפחת הלנטי וירוס שהוא ממשפחת האיידס.

ה-LTR (Long Terminal Repeat) הם חזרות עוקבות המכילות את הפרומוטור וגם סמן לפליאדנילציה של RNA. בנוסף לזה גנום הנגיפי יש רצף הכרה ל-RT ורצפים שיאפשרו כניסה של הגנום הנגיפי לקפסיד. וירוסים אלו יודעים לבצע אנטיגניק דריפט כלומר, שינוי מסוים בחלבוני המעטפת על מנת להתחמק מהמערכת החיסונית.

בהנדסה גנטית לוקחים את הגנום הנגיפי ומוציאים מתוכו את החלקים המקודדים ל-pol, gag, env – 1 ומכניסים במקומם אתר של MCS ובנוסף מרקר לעמידות. אחד הוקטורים הנפוצים הוא הוקטור של מוליגן המכיל בתוכו עמידות לניאומיצין. בנוסף הוקטור מכיל אתרי הכפלה בחיידקים (Ori) מ-PBR ומ-SV40 הוא חתך את הפלסמיד אחרי ה-LTR ומהם הכין פלסמיד סגור. בפלסמיד זה חייב היה להישאר אתר ההכרה ל-RT ואתר לאריזה בקפסיד. את הפלסמידים מרבים בחיידקים ואז משתמשים בהם להכנת וירוסים, אשר איתם מדביקים את התאים הרצויים. אנו חייבים לספק את הגנים ליצירת קפסיד מעטפת וחלבונים שונים על מנת שנקבל וירוס עם הגן שלנו בתוכו כלומר, עלינו להיעזר בוירוס ה-WT. אפשרות נוספת היא להשתמש בתאי האריזה. עליהם נפרט בהמשך.

כאשר אנו משתמשים בנגיף WT על מנת ליצור את הוירוסים אנו מקבלים תערובת של וירוסים דפקטיביים ווירוסים WT. דבר זה לא יעיל לריפוי גנטי כיוון שהוירוסים WT יגרמו לנזק הוירוסים הדפקטיביים לעומתם מסוגלים לבצע רק אינפוזיציה אחת ולכן יעילותם לרפוי גנטי גבוהה כיוון שלא יעברו שינויי וידויקו את התאים האחרים. האפשרות השנייה כפי שצינו קודם היא תאי אריזה בתאים אלו אנו יוצרים תאים שמכילים את החלבונים הנחוצים לייצור הוירוס להם אנו מוסיפים את גינום הוירוס הדפקטיבי שהכנו וכך נוצרים לנו רק נגיפים דפקטיביים כיוון שהוירוס שהכנסנו יוצר את ה-RNA והתא יוצר את החלבונים לשם אריזה ה-RNA. וירוסים אלו יעילים רק להדבקה אחת אך התאים מייצרים כמות אדירה של וירוסים כל הזמן.

תאי שריר יעילים לתיקון פגמים במערכת השריר עצמה או לביטוי של פקטורים מופרשים כגון הורמוני גדילה. כשלקחו תאי שריר שלד של עכבר שלהם קוראים C2C12 שאלו הם קו של תאי שריר נצחי והם שמרו על נורמאליות. כאשר מוסיפים להם בהנדסה גנטית גן בעזרת וירוסים דפקטיביים ומזריקים אותם

למכרסם תואם (קומפטיבילי) הם גדלים שם ומבטאים את הורמון הגדילה שהוכנס בגן על ידי הוירוסים ועוברים דיפרנציאציה והופכים לסיבי. מניסוי זה ראו גם כי תאי שריר מסוגלים לעבור ממקום אחד למקום אחר בתוך שריר שעטוף בממבראנה בזאלית וזאת על ידי הוספת  $\beta$ -Gal.

### החדרת גנים לעכברים

אחד הניסויים הראשונים עם SV40 שהוזרק לבלסטוצל בהתפתחות העוברית התקבלו עכברים שהם מוזאיקה עם חלק מהתאים שיצר את הגן שהיה ב – SV40 וחלק את הגן המקורי. התגלה כי לעכברים אלו הגנים שהוזרו לא חדרו לתאי המין. ורק עברו אינקורפורציה לגנום המאחסן. לאחר מכן הגיע רעיון להכניס DNA בשלבי ההתפתחות הראשונים כלומר, בשלב הפרונוקליי שבו הגרעינים של הביצית ותא הזרע עדיין לא התאחו. בשלב זה ניתן לעשות מיקרו הזרקה של ה – DNA בכמות של  $10^{-12}$   $\mu$ ל אחד הגרעינים. את התא הזה מחזירים לעכברה הנמצאת בהריון מדומה ולאחר 21 יום מקבלים צאצאים שבערך 40% מהם טראנסגנים. היעילות תלויה בעיקר במיקרו הזרקה. השיטה הטובה ביותר לבדוק את העכברים שנולדו מבחינת מי מהם מכיל את הגן ומי לא הוא על ידי Southern Blot או PCR.

בין הצאצאים אנו מבצעים הכלאות לקבלת צאצאים F2. העכבר הראשון שמכיל את הגן נקרא מייסד Founder Mouse. כשנבצע הכלאה שלו עם עכבר נורמאלי נקבל כ – 50% מהצאצאים מכילים את הגן. ומכאן שהגן עבר לתאי המין והוא סטבילי. בשיטה זו אין אנו יכולים לכוון את מיקום האינטגרציה ולכן חשוב שיהיה יותר מגן אחד באנליזה.

הניסויים הראשונים מסוג זה היו על אונקוגנים כך שהכינו אונקוגן עם פרומוטור מבלוטות חלב וראו שהעכברות שנכנסו להריון קבלו סרטן שד. הגן שהוחדר אינו פועל לבדו אלא בעזרת גורמים נוספים המתבטאים בזמן ההיריון. את ביטוי הטראנסגן ניתן לכוון לרקמה ספציפית על ידי כך שלוקחים SV40 הנותן אינפקציה המפסיקה באמצע עד הוספת Large T לתאי העכבר ואז נוצרת טרנספורמציה סרטנית. כשרוצים לגרום לסרטן בתאים ספציפיים אנו משתמשים בפרומוטור המתבטא רק ברקמה זו ואחריו אנו שמים את האונקוגן. בשיטות אלו מתקבלים במקרה הטוב רק כ – 40% צאצאים טראנסגנים ויש צורך לחפש דרכים פשוטות יותר.

ניתן לגדל תאים בתרבית ואליהם להכניס את הגן המבוקש לאחר מכן להעביר אותם סלקציה ואותם להחדיר לתוך בעל החיים. בשיטה זו אנו משתמשים בתאים עובריים הנקראים ES – Cell (Embryonic Stem Cell) תאים אלו הם תאים פלורופוטנטים ויכולים להפוך לסוגי תאים רבים. כאשר תאים אלו מונחים על צלחות גידול רגילות הם עוברים דיפרנציאציה ואז הם מפסיקים להתחלק. את זה ניתן למנוע על ידי הוספת גורם גדילה הנקרא LIF (Locimia Inabitory Factor). שיטה נוספת היא גידול של תאים אלו על תאים אחרים הנקראים תאים מזינים Feeder Layer שכבה זו מטופלת על ידי חומר מיטוגני או הקרנה וכך הם יוצרים פעילות מטבולית אך הם לא יכולים להתחלק יותר. תאים אלו מפרישים חומרים המעכבים את הדיפרנציאציה.

תאי ה – Stem נלקחים בשלבים העובריים שלב המורולה הוא שלב בהתפתחות בו יש שמונה עד 32 תאים. אחריו מגיעים לשלב שבו יש כ – 100 תאים המסתדרים בצורה של כדור עם חלל פנימי המלא בנוזל. כדור זה נקרא בלסטוציט והחלל עם הנוזל נקרא בלסטוצל. בבלסטוציט השכבה החיצונית נותנת את השפיר והשליה. שכבה זו נקראת Trophectoderm ובפנים יש את השכבה הנקראת Inner Cell Mass או בקיצור ICM וממנה מתפתח העובר. התאים בשכבה זו הם תאי ה – ES – Cell. את ה – DNA הרצוי מכניסים ל – Stem Cell על ידי טרנספקציה, אלקטרופורציה או אינפקציה ואז יש לבצע סלקציה. את התאים שעברו סלקציה מכניסים ל – ICM של בלסטוציט חדש ומתקבל עכבר מוזאיקה. אנו לוקחים את תאי ה – Stem Cell המקוריים מעכבר בעל צבע פרווה שונה מזה שממנו לוקחים את הבלסטוציט השני וכך הצאצאים העכברים שנוצרים בעלי פנוטיפ מוזאיקה הם גם טראנסגנים. כיום שיטה זו היא השיטה העיקרית ליצור עכברים טראנסגנים.

בכל טרנספקציה רק חלק מה – DNA עובר אינטגרציה לגנום של המאחסן יעילות האינטגרציה אינה גבוהה ולכן יש לבצע סלקציה. ניתן להגביר את הסיכוי לכניסת ה – DNA לתאים והאינטגרציה על ידי לינרזציה שבה מקבלים מקטע ישר שהקצוות שלו נוטות לעבור אינטגרציה לגנום.

ניתן לקבוע גם Knockout לפנוטיפ על ידי פגיעה ברצפטורים כך שבדימר יהיה מוטאנט דומיננט נגטיב. לדוגמה: קרטין הוא אינטרמידיאט פילמנט בתאי אפיתל ומוטאנט כזה פוגע בתאים המתחלקים מתחת לשכבת העור כלומר התאים בשכבה הבאזלית כך שעכברים בעלי מוטאנט זה לא יתקנו פצעים הנגרמים להם כלומר, כאשר יש פצע בעכבר הוא לא יתרפא. הבעיה בשיטה זו שאין אפשרות לבצע Knockout מלא.

ניתן לבצע אלימינציה נגד אוכלוסיה שלמה של תאים את על ידי הכנסת גן של טוקסין עם פרומוטור שפועל רק באוכלוסיה זו כלומר, פרומוטור שהוא TSP (Tissue Specific Promotor). חסרון של שיטה זו הוא שהתאים יכולים להיות מאד נחוצים לחיה ואם נהרוג אותם בשלב מוקדם מדי החיה לא תתפתח, לכן משתמשים במערכת אינדוקטיבית. כאשר משתמשים בפרומוטור ומתחתי שמים את הגן טימידין קינאז ניתן להשתמש בתרופה הנקראת גן ציקלווייר שהיא אנלוג לטימידין והטימידין קינאז מזהה אותה והופך אותה לתוצר רעיל שהורג התאים. בשיטה זו ניתן לגלות יחסי גומלין בין תאים עובריים שונים מה שנקרא Lineage Relationship כלומר, אלו תאים מסייעים לאלו איך ומתי. דוגמה לכך היא ביותרת המוח שם נוצרים הורמון גדילה ופרולקטין כדי לדעת מי משפיע על מי יצרו פעם אחת את הגן ל – TK תחת הפרומוטור של הורמון הגדילה ופעם אחת תחת הפרומוטור של פרולקטין. התאים שהיו תחת בקרה של הורמון הגדילה היו גמדיים בהם לא היה הורמון גדילה וגם לא פרולקטין. ומכאן הורמון הגדילה גורם ליצירת פרולקטין. במקרה ההפוך כשהבקרה הייתה על פרולקטין התקבלו צאצאים בריאים כיוון שהפרולקטין לא משפיע על תאים מתחלקים ולכן לא הושפע ה – TK.

## Gene Knockout

המוסג Gene Knockout זה אינאקטיבציה של גנים ועל ידי זה שנראה איך דבר זה משפיע נוכל ללמוד על ההתפתחות תאים ועל הקשרים בניהם בחיה השלמה. אינאקטיבציה זו לא חייבת להיות דווקא כפגיעה בגן יתכן והפגיעה תהיה על ידי הפרעה לביטוי החלבון או לפעילותו כלומר, יצירת מוטאנט שלילי דומיננטי. בגישת ה – Anti Sense אנו פוגעים ביכולת התרגום של החלבון מ – mRNA וזה על ידי תעתיק של אותו גן בפולאריות הפוכה. דבר זה יוצר אנלינג ו – RNA דו סיבי שממנו לא יכול להיווצר חלבון. את הגן ל – RNA ההפוך מכינים על ידי לקיחת הגן המקורי והוספתו בכיוון ההפוך לפרומוטור כלומר, מהסוף להתחלה. בתוך התאים ה – RNA הדו גדילי מפורק אך הדבר לא מוריד לאפס את רמת החלבון.

המוסג Genotypic Knockout מתייחס לפגיעה בגן עצמו. במידה ויוצרים Knockout ללא פגיעה בגן אלא רק בפנוטיפ הדבר נקרא Phenotypic Knockout. הטכניקה לפגיעה בגן היא על ידי ריקומבינציה בה לוקחים מתא DNA שדומה לגן עצמו למקטע זה קוראים קסטה. והיא עוברת ריקומבינציה הומולוגית לתוך הגן.

אנו משתמשים ב – ES Cells למניפולציה ולסלקציה אחריה לאחר מכן אנו משתילים את התאים בבסטוציט ומבצעים הכלאות עד קבלת הומוזיגוט. בפעולה זו חשוב מיקום האינטגרציה. וצריך להיפטר מהתאים בהם נכנס הגן בריקומבינציה לא הומולוגית. כך שרק אחד מתוך כ – 100 תאים יש אינטגרציה וריקומבינציה מתאימים. התדירות של הריקומבינציה הלא הומולוגית גדול פי  $10^3$  עד  $10^4$  מריקומבינציה הומולוגית.

בקסטה שלנו יש מקטע של אינטרון המסייע לזיהוי וריקומבינציה הומולוגית. כך שאם הכניסה תהיה קרובה לפרומוטור תהיה עמידות. בנוסף אנו צריכים לעשות סלקציה חיובית ושילית. על הקסטה אנו מכניסים 2 גנים שונים בעמידות לדוגמה TK ו – APH לכל אחד מהם יש פרומוטור משלו. הקטע של האקטיבציה מכיל את העמידות לניאומיצין (APH) ובסוף החלק ההומולוגי יש החלק של ה – TK. אם הקסטה עוברת אינטגרציה וכולה נכנסת לגנום אז יש 2 עמידויות. ואם האינטגרציה היא רק על פי אזורים הומולוגיים אז יש רק עמידות אחת של ה – APH ולא של ה – TK.



שני עמידויות (לא הומולוגי)

עמידות אחת (הומולוגי)

הסלקציה החיובית מתבצעת על ידי גידול של כל התאים ב - G418 וזה מסלק את התאים ללא האינפקציה. לאחר מכן מבצעי את הסלקציה השלילית והיא על ידי הוספת גן ציקלווייר הגורם לביטוי עם ה - TK ליצירת חומר רעיל שהורג את התאים המכילים אותו. וכך מתקבלים רק התאים שבהם יש ריקומבינציה הומולוגית.

בשיטה זו קיים חיסרון של לטליות שלא מאפשרת לחקור פונקציות בשלבים שונים של ההתפתחות עם הורגים את התאים מוקדם מדי. ההתגברות על בעיה זו היא על ידי אינדוקטיביות בשינוי קל. אנו מכניסים קסטה בתוך אינטרון (יותר מאחד אפילו) הכוללת בתוכה גן לעמידות ורצפים המכירים את האנזים ריקומבינאז. הגורם לריקומבינאציה ולאינאקטיבציה של הגן.

האנזים Cre Recombinase שמקורו בפאג' P1 הוא מכיר את האתרים הנקראים lox p. והוא צריך 2 אתרים כאלה לביצוע ריקומבינציה. אנו משתמשים בו לצורך יצירת הריקומבינציה בתאים שבהם אנו רוצים ליצור Knockout וזאת על ידי הוספתו משני צידי הגן. העכבר הטראנסגני שמתקבל מוכלא עם עכבר המכיל את ה - Cre ואז מתבצעת הריקומבינציה ומתקבל תוצר לא פעיל עקב שינוי במסגרת הקריאה או יצירת קודון עצירה. שיטה זו היא כלי יעיל לחקירת פונקציות של גנים.

### אקונדרופליזיה

מחלה זו היא מחלה גנטית בבני אדם הגורמת לגמדות. מחלה זו היא מחלה תורשתית והיא לא תלויה במחסור בהורמון גדילה אלא עקב התקשות מהירה מדי של העצמות. בנוסף הידיים עגולות וקשה לישר אותם אך הגידים והסחוסים גמישים מאד במחלה זו אין בעיה של התפתחות קוגניטיבית רק מבחינה מוטורית. המחלה נגרמת ממוטציה נקודתית ברצפטור ממשפחת הטירוזין קינאז הנקרא FGFR3 המוטציה היא בחלק החוץ תאי והיא הופכת גליצין לארגנין. השינוי מאד משמעותי כיוון שגליצין היא ללא קבוצה צדדית ואילו ארגנין הוא בעל קבוצה צדדית גדולה וטעונה. דבר זה גורם לדימריזציה של הרצפטורים ללא כל צורך בליגנד וכך מופעל הרצפטור. כשעושים לגן אינאקטיבציה מקבלים עכבר גדול יותר כלומר הגן מעכב את התפתחות העצם ושהוא לא קיים הוא גורם לגדילת יתר אך כשהוא פגום הוא גורם לעצירה מוקדמת של ההתפתחות.

ניתן להכניס באינטרון אתרים לאנזימי רסטרקציה ייחודיים או כאלו שידוע כמה פעמים הם מופיעים ומה גודלם וזאת לצורך הקלה של אנליזה. כשמכניסים את הניאומיצין לגנום הוא מפריע לשיחבור ומקבלים אינאקטיבציה אך דבר זה לא נותן מודל למחלה. ולכן יש להוריד את הסלקציה לניאומיצין על ידי lox p וריקומבינציה. באנליזה של ה - RNA ראו ב - WT שהניאומיצין לא עובר ריקומבינציה גם לא בריקומבינציה עם הרצפטור. בהטרוזיגוט בלי הכלאה עם Cre יש אלל נורמאלי ואלל עם מניפולציה דבר שיתן ביטוי נורמאלי בחצי מהתאים. ומכאן שיהיה הפרעה לשיחבור כיוון שנוצר תעתיק גדול יותר.



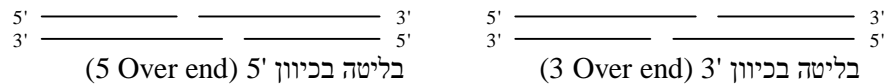
## סיכומים בהנדסה גנטית חלק א'

כל התפתחות ההנדסה הגנטית היתה אפשרית הודות לעובדה שלכל האורגניזמים החיים יש מידע גנטי הכתוב באותה שפה והיא שפת הנוקלאוטידים. בהתפתחות הביולוגיה היתה עצירה ארוכה בין השנים 1965 ל-1974, עצירה זו נגרמה עקב מחסור בטכניקה שכלל חוסר באנזימי רסטריקציה ספציפיים, עד אז ידעו רק על כאלו שפירקו את כל ה-DNA, וחוסר נוסף הוא ביכולת של קריאת רצפי ה-DNA, כלומר את רצף הבסיסים דבר שבלעדיו לא היה ניתן לעשות דבר.

בשנות ה-60 התגלה מיסעף ההכפלה ובו נמצאו אנזימים רבים שמשמשים אותנו היום בהנדסה הגנטית שהראשיים בניהם הם ה-DNA פולימראזות, אנזימים אלו נרתמו תוך כדי מחקר לעבודת הסינתזה במבחנה. בנוסף לאנזימים אלו צריך די-אוקסי נוקלאוטידים, ותבנית Template כיוון שה-DNA פולימראז 3 זקוק לתבנית לשם שיכפול ה-DNA. אנזים חשוב נוסף הוא הליגאז Ligase שמחבר את ה-Nicks במקטעי אוקאזקי, אנזים זה מחבר שני בסיסים צמודים שנמצאים על DNA זו גדילי והוא זקוק ל-ATP לשם פעולתו.

אנזימי הרסטריקציה החשובים מאוד לביצוע של הנדסה גנטית מקורם מחידקים אשר יוצרים אותם כאמצעי הגנה מ-DNA זר, כאשר DNA זר ניכנס לחיידק אז אנזימי הרסטריקציה חותכים אותו וכדי למנוע מהם לפגוע ב-DNA של החידק עצמו הוא מוגן באיזורים שאותם מזהים אנזימי הרסטריקציה על ידי התמרות כמו מתילציה וכו'. אנזימי הרסטריקציה הם חלבונים המזהים רצף ב-DNA, רצפים אלו הם בדרך כלל בעלי ציר סימטריה כלומר פלינדרומים.

קיימות מספר צורות בהם אנזימי הרסטריקציה יכולים לחתוך DNA, האחת היא בקו ישר ויצירת קצוות כהים, צורה שניה היא על ידי יצירת מדרגה שנקראת קצוות דביקים, הקצוות הדביקים יכולים להיות באורכים שונים של 4, 6 או 8 בסיסים וגם המדרגה יכולה להיות עם בליטה בכיוון 5' או בכיוון 3':



אם נחתוך DNA משני אורגניזמים שונים על ידי אותו אנזים רסטריקציה אז המיקטעים יתאימו זה לזה ויוכלו להתחבר בתהליך הנקרא Annealing, בחיבור זה נוצר Nick שמחובר על ידי ליגאז לקבלת DNA רקומביננטי.

במשך השנים התגלו אנזימי רסטריקציה רבים וכיום קיימים כמה מאות של אנזימים כאלו. גם מאנזימים היוצרים קצוות כהים ניתן ליצור רקומבינציות אבל ביעילות נמוכה פי 500 בערך, במידה ויש לנו שני קצוות דביקים שונים אחת מהשני עדיין ניתן לחברם באחת משני שיטות, הראשונה היא על ידי אקסונוקלאזות שיפרקו את אחד הקצוות ופולימראזות שיסנתזו מיקטע מתאים או שיטה שנייה סינתזה על ידי פולימראזות לקבלת קטע משלים. כדי למנוע מקצוות כהים להתחבר אחד לשני ניתן להוריד מהם את הזרחה על ידי פוספטאז ואז הליגאז לא יכול לחבר אותם, את הפוספט ניתן להחזיר לאחר מכן על ידי קינאז מתאים.

את ה-DNA ניתן להפריד על ידי הרצה בג'ל אקריל-אמיד בעזרת שדה חשמלי בו רץ ה-DNA לאנודה ומופרד לפי גודלו, מהג'ל ניתן להוציא את מקטע ה-DNA על ידי חתיכה והוצאתו על ידי מיצוי מה שמאפשר שימוש נוסף בו. שימוש ב-DNA רקומביננטי שיצרנו הוא השלב השני בהנדסה הגנטית.

את מיקטע ה-DNA שיצרנו צריך להגדיל בכמות למצב שהיה ניתן לעבוד איתו, המערכת הראשונה שאיפשרה זאת היא הפלסמידים שהם חלקיקי DNA אקסטרה כרומוזומלי המצויים בפרוקריוטים ומתרבים באופן בלתי תלוי בכרומוזום, הפלסמידים נוצרו בטבע בכדי להגדיל את הוירביליות כלומר לקבלת DNA דינמי.

בכדי להשתמש בפלסמידים להנדסה גנטית צריך שהם יכילו אתרי רבים לאנזימי רסטרקציה אבל שכל אנזים יוכל לחתוך רק פעם אחת את הפלסמיד לזה קוראים Multi Cloning Site או בקיצור MCS, בנוסף על הפלסמיד צריך להיות אתר התחלת שיכפול של DNA שזה אתר המכיל כ- 25 בסיסים ונקרא Origin Of Replication או בקיצור Ori. על הפלסמיד להיות בגודל ממוצע של 3 עד 5 אלף בסיסים כיוון שזה הגודל הנחוץ ביותר לעבודה. בכדי לשלוט על כיווניות של המיקטע המוכנס לפלסמיד אנו חותכים את המיקטע בשני אנזימים שונים אחד להתחלה ואחד לסוף ואיתם אנו חותכים גם את הפלסמיד כך שהמיקטע יכול להיכנס רק בכיוון אחד.

את הפלסמידים מכניסים לחיידקים על ידי עירבובם עם החיידקים ואז בתדירות של 1 למיליארד ניכנס פלסמיד לתוך החיידק, את היחס הזה ניתן לשפר בשתי דרכים האחת היא החלשת דופן תא החיידק ואז היחס הוא 1 למיליון, שיטה שניה היא על ידי שימוש בשוק חשמלי הגורם לממברנה להפתח ולהיסגר ובחלק מהמיקרים ניכנס פלסמיד לתוך החיידק בשיטה זו גם מגיעים ליחס של 1 למיליון. לאחר החדרת הפלסמיד חייבים לבצע סלקציה וזאת על ידי עמידות לאנטיביוטיקה שהגן לעמידות זו מצוי על הפלסמיד וכך רק תאים שקלטו את הפלסמיד ישרדו, הסלקציה היא קריטית כיוון שיחס החדרת הפלסמיד נמוך וזמן הכפלת התאים שכוללים את הפלסמיד ארוך יותר כך שתוך זמן קצר כמות החיידקים נושאי הפלסמיד זניחה. בכדי שגן העמידות לאנטיביוטיקה יעבור ביטוי חייב הפלסמיד להכיל גם פרומוטור לגן לשם יצירת ה- mRNA וביטוי החלבון.

בנוסף לכך על הפלסמיד להכיל גם את הגן  $\beta$ -Gal שגם הוא מכיל פרומוטור בכדי שיוכל לעבור ביטוי, הפרומוטור לא חייב להיות של הגן הזה ובדרך כלל משתמשים בפרומוטור מוירוסים שהוא חזק יותר. גן זה משמש כגן מדווח על ידי יצירת צבע כחול בפעולתו ומכאן מושבה שצבעה כחול אז לא ניפגע הגן ומכאן לא ניקלט הגן שצירפנו, במידה והמושבה לבנה אז הגן ליצירת  $\beta$ -Gal פגום וזאת כיוון שהגן או מיקטע ה- DNA שהכנסנו ניקלט וגרם לשינוי מיסגרת הקריאה של הגן  $\beta$ -Gal ולחוסר של ביטוי הצבע, כך ניתן לבחור את המושבות המתאימות לגדל את החיידקים ולקבל הכפלה של המיקטע שלנו.

בשיטה זו השתמשו בעבר עד שפותחה שיטת ה- PCR, בשיטה זו מנצלים את ה- DNA פולימראז המתחיל לעבוד רק מאיזור דו גדילי כל שנתינו לכוונו על ידי פריימרים מתאימים ונותן הכפלת DNA אקספוננציאלית. בשלב הראשון של שיטה זו לוקחים את קטע ה- DNA (לא צריך להיות נקי) ומחממים אותו לטמפרטורה של  $94^{\circ}$  מה שגורם להפרדת הסיבים וקבלת DNA חד גדילי, בשלב השני לוקחים פריימרים שתוחמים את המיקטע המבוקש (פריימר אחד לסיב העליון ואחד לתחתון), הפריימרים שמוספים הם בעודף רב מאוד וכל פריימר הוא בגודל של 10 – 15 בסיסים לפריימר, שלב זה נעשה בטמפרטורה של 50 – 65 מעלות כדי לאפשר את החיבור. השלב הבא הוא בטמפרטורה של  $72^{\circ}$  והוא סינתזה של הסיבים מהפריימרים עד סוף הגדיל, על שלושת שלבים אלו חוזרים מספר פעמים, בעבר היו צריכים להחליף את הפולימראזות כל שלב כיוון שהם לא עמדו בטמפרטורה הגבוהות עד שנמצאו פולימראזות שעמידות בתנאים אלו.

בשיטת ה- PCR לאחר המחזור הראשון מקבלים 2 מולקולות DNA ואחר המחזור השני מקבלים 4 ולאחר השלישי מקבלים 8 מיקטעים ספציפיים, כלומר רק של מיקטע ה- DNA הרצוי, 1 – 6 מיקטעים גדולים, כך ממשיכים עד שמגיעים לאחר המחזור ה- 30 ליותר ממיליארד מולקולות DNA ספציפיות ומעט מולקולות לא ספציפיות מה שנותן לנו תמיסה המכילה את המיקטע הרצוי כמעט נקי לחלוטין.

כשניתן ליצור חלבון בחיידק הדבר מאוד קל לביצוע ומקבלים כמויות גדולות של חלבון. ב- 1973 יצא הפלסמיד הראשון ושנתיים לאחר מכן כבר אושר השימוש בחלבון שיוצר על ידי פלסמיד שהוחדר לחיידקים וזה האינסולין. בשלב מאוחר יותר באו חיסונים נגד צהבת וחלבונים נוספים.

בפלסמיד ביטוי יש אלמנטים נוספים שהם פרומוטור חזק רצוי אינדיוסיבילי שניתן לשלוט ביצירה כיוון שחלק מהחלבונים יכולים להיות רעילים לחיידק. אלמנט נוסף בפלסמיד ביטוי הוא אתר לקשירת ריבוזומים. כמו כן חשוב לשמור על מסגרת הקריאה. בפלסמיד שלא קשור לביטוי צריך פרומוטור בנשא וגן לאמידות לאנטיביוטיקה או גן מדווח.

בגנים של בני האדם יש אינטרונים וכדי לבטא חלבון מהם בחיידקים יש לקחת את ה – cDNA של החלבון ולא את ה – DNA המקורי.

מפלסמיד ביטוי או נרצה שתהיה כמות חלבון רבה ולכן צריך פרומוטור חזק בנוסף או נרצה High Copy Number כלומר שהפלסמיד יכפיל את עצמו מספר רב של פעמים. ובנוסף רצוי שהמערכת תהיה אינדוקטיבית לחלבונים רעילים.

לפעמים יוצרים חלבונים קטנים מאוד שקשה להפרידם ולכן מוסיפים להם אלמנטים שיאפשרו הפרדה באמצעים ביוכימיים כלומר, הפרדה בקולונה לפי זיקה. שיטה זו מקלה על ההפרדה אך קיים החיסרון בכך שמקבלים חלבון שעליו יש תוספת לא רצויה. ברוב המקרים התוספת לא פוגעת בפעילות החלבון או שהפגיעה זניחה לעבודה במעבדה.

גם ליצירת ה – cDNA צריך תחל. במידה ויודעים את הרצף ניתן לבנות תחל מתאים אם לא יודעים את הרצף ניתן להשתמש בזנב הפולי A של ה – mRNA ולבנות תחל של אוליגו dT.

בפלסמיד הביטוי לאחר הפרומוטור החיידקי והאתר לקשירת הריבוזומים מכניסים חלבון מחיידקים הנקשר למלטוז מאוד חזק ושמו MBP וגודלו 43Kd. למקטע הזה מחברים את ה – MCS הכולל את האתרים לאנזימי הרסטריקציה, לאזור זה יכנס הגן שיבוטא, כל זה בהקפדה לשמור על מסגרת הקריאה. מביטוי פלסמיד זה מקבלים חלבון כימרי המורכב מ – MBP והחלבון שלנו. את חלבון הכימרה או מפרידים קולונה של אמלוז שהוא אנלוג של מלטוז. כדי להיפתר מהתוספת או מכינים אתר קיטוע בין ה – MBP לחלבון שלנו. דבר זה לא תמיד עובד ואז נשארים תקועים עם חלבון הכימרה.

חיסרון נוסף של מערכת זו הוא שהפרומוטור החיידקי הוא בעל רמת ביטוי באזלית ולכן עם החלבון רעיל לחיידק אז החיידק ימות בטרם עת. לבעיה זו יש פיתרון והוא שימוש בפרומוטורים מורוסים. פרומוטורים אלו חזקים מאוד ומספיקים מספר קטן של בסיסים לפרומוטור (ב – T7 מספיקים 17 בסיסים). פרומוטור זה ואזורים נוספים לקידוד פקטורים נוספים מוכנסים לפלסמיד בשיטות של הנדסה גנטית וכך מקבלים מערכת קלה לשימוש. הפרומוטור של T7 הוא כל כך חזק עד שהוא מפסיק את פעולת הביטוי של שאר הגנים בחיידק.

לצורך כך צריך גם פולימראז רגיש מאוד לפרוטאז מסוים ולכן נוסף גם אותו לגנום החיידקי זה כדי לפרק את הפולימראז מאט כל פעם ולהאט את קצב הביטוי.

החלבון Intein הוא גם סוג של Tag לשם הפרדה קלה של החלבון המבוקש. חלבון זה יודע לבצע Splicing עצמי כאשר הוא מחוזר עם DTT. השחבור העצמי הוא על ידי יצירת Cleavage. חלבון זה גם ניקשר לרצף CBD של חלבון אחר המצוי בקולונה הזיקה וכך מפרידים את החלבון שלנו. גם שיטה זו לא תמיד עובדת.

אם או רוצים חלבון בעל מודיפיקציות אז צריך מערכת אאוקריוטית כמו שמרים או תרביות רקמה או חרקים שונים.

רצף של DNA ניתן להכיר על ידי היברידיזציה וכך ניתן לתת לשני גדילים להתחבר ואם אחד מהם מסומן אז העובדה שהם נקשרים אומרת שהרצף קיים בגן. במילים אחרות מקטע אחד משמש כגלאי האם הרצף קיים בגן שלנו. בריכוז מלח גבוה ההיברידי של הגלאי והגדיל היו חזקים יותר ובטמפרטורה גבוהה הקישור היה חלש יותר. כך ניתן לשלוט בזה שחלק מהבסיסים היו בהתאמה כלומר לשלוט באינטראקציה.

כדי לזהות גן או חותכים אותו ומבצעים Southern Blot עם מספר גלאים שונים כדי לקבל תוצאות בטוחות. תהליך דומה ניתן לבצע על RNA ולזה קוראים Northern Blot ואז הגלאי הוא RNA של הסיב המשלים או DNA. קיימת גם אפשרות לזהות חלבונים בשיטה דומה והיא נקראת Western Blot ואז הגלאים הם נוגדנים.

קיימות שיטות נוספות לבדיקת מידת הביטוי. אחת מהם היא RT – PCR עם פריימרים של cDNA על mRNA. הבעיה היא שה-PCR מגביר אקספוננציאלית ולכן צריך לעשות RT – PCR.

טכניקה נוספת היא על ידי פריימרים ובסיסים מסומנים והאנזים רוורס טרנסקריפטאז לשיטה זו קוראים Primer Extension. שיטה נוספת היא רגישה מאוד והיא יצירת Anti Sense RNA או DNA שמתאים לחלק מה- RNA הנתון כך שהם מסומנים רדיואקטיבית למערכת מוסיפים נוקלאז המעקל רק אזורים חד סיבים ומה שנישאר זה המקטעים הכפולים אותם מריצים בג'ל ובודקים קרינה. לשיטה זו קוראים DNase/RNase Protection.

כדי לבדוק את קצב הפרומוטור אנו משתמשים בגן מדווח בעל אפקט שניתן למדידה כמו צבע ובודקים כמה צבע נוצר ליחידת זמן. הצבע הנפוץ ביותר הוא הצבע הירוק הזוהר מגן של מדוזה. שיטה נוספת לבדיקת מהירות הפרומוטור הוא על ידי פולס של UTP רדיואקטיבי, דבר זה גורם ל- RNA שנוצר להיות מסומן כך אנו מקבלים אוכלוסיית RNA שנוצרה בזמן ידוע של הפולס. אנו מריצים בג'ל את כל הגנום ומעבירים לממבראנה כמו ב- Blot רגיל אך שבמקום להשתמש בגלאי לגן שלנו משתמשים בכל הגלאים מה- RNA שיצרנו וכך איכן שיש סימון רב הייתה פעילות חזקה של הפרומוטור. לשיטה זו קוראים RNA On/Off Assay. בשיטה זו קיימת הנחה שאין פרוק בזמן של הפולס של UTP המסומן שנתנו.

### ספריות מידע גנטי

כשאנו מחפשים כלי שיאפשר לנו למצוא מקטע של DNA לתכונה מסוימת ניתן או לחפש כל פעם בכל הגנום ולמצוא את המקטע או להכין מאגר מידע שבו יש רק צורך להריץ חיפוש. הספריות הגנטיות מהוות מאגר כזה. הספריות יכולות להיות כמקטעי DNA הנמצאים בפלסמידים או בפאג'ים, בין המקטעים קיימים חפיפות וזאת כדי שניתן היה לקבוע את סדר הופעתם בגנום.

כאשר סמים בתמיסה את חלבוני הפאג' ואת מקטעי ה- DNA הם מסתדרים לפאג'ים שלמים אך זה קורה רק עם אורך מקטעי ה- DNA הוא מתאים (50000 בסיסים בפאג' λ). כדי שפעילות הפאג' (הדבקת תאים) תשמר אנו מכניסים את מקטע ה- DNA לבין שתי קצוות ה- DNA של הפאג' כך שהאורך הסופי הוא האורך הנחוץ לסידור הפאג'. גן שבודד מספרייה גנומית זהה בכל התאים של אותו אורגניזם ואינו תלוי בזמן (אלה אם יש שינויים ברמת ה- DNA בשלבי התפתחות).

הספרייה הגנומית כוללת יותר מידע מהנחוץ וזאת עקב כל ה- Junk DNA ולכן ניתן להכין גם ספרייה של cDNA. בספרייה מסוג זה יש הבדל בין רקמות שונות כיוון שלא כל הגנים מתועתקים ל- RNA בכל הרקמות ולכן נקבל בכל סוג תאים ספרית cDNA שמאפיינת אותו. קיים גם סוג שלישי של ספריות והוא ספריות הביטוי בהן גורמים ל- cDNA לעבור ביטוי ואת החלבונים מזהים על ידי גלאי. ספריות כאלו מכינים מהרקמה בה מבוטא ה- mRNA שאנו מחפשים במקסימום. את הפאג'ים ניתן להחזיק בשתי צורות האחת במבחנה והשנייה היא על ידי גידול על דשא של חיידקים.

כל mRNA ניתן לחלק לשלושה חלקים: CAP---AUG-----UGA----AAAAA החלק הראשון הוא מה- CAP עד ל- AUG הראשון חלק זה לא מתורגם לחלבון, חלק שני הוא מה- AUG עד קודון העצירה (UGA במקרה זה) וחלק שלישי זה מקודון העצירה עד וכולל זנב הפולי A. כדי להכין מ- mRNA זה cDNA אנו משתמשים באנזים Reverse Transcriptase (RT) ובתור פריימרים אנו משתמשים בפריימרים רנדומאליים של 4-5 בסיסים או באוליגו dT (עדיף כיוון שרנדומאלי יכול להתחבר ל- RNA מסוג אחר).

האנזים RT בדרך כלל עובר את קודון הסיום ויוצר את ה- cDNA המלא אך לפעמים הוא נופל בדרך. לאחר יצירת הסיב הראשון של ה- cDNA אנו צריכים להכין את הסיב השני וזאת על ידי שימוש בפריימרים רנדומאליים ו- DNA פולימראז. ניתן לנצל כאן את האנזים RNaseH שיוצר Nick

ב – RNA שנימצא על סיב ה – cDNA, מקטעים אלו של RNA משמשים כפריימרים עבור ה – DNA פולימראז. לאחר מכן מוחדר הסיב הכפול לתוך הוקטור (פאג'  $\lambda$ ) על ידי שימוש באנזימי רסטריקציה.

ניתן לחבר מקטע עם קצה כהה וקצה החתוך ב – EcoR I לצד אחד של המקטע שיצרנו ובצד השני החיבור היה על ידי כך שהפריימר היה של האוליגו dT שאליו מחובר הרצף של Xho I. כך נקבל מקטע שבשני צידיו יש אזורים שמשלימים את זרועות ה – DNA של הפאג'. כדי למנוע חתיכה של מקטע ה – DNA על ידי אנזימי הרסטריקציה יש צורך לחסום את אתרי הרסטריקציה הללו (עם יש כאלו). חסימת אתרי הרסטריקציה מתבצעת על ידי מתילציה של ציטוזינים. את המתילציה עושים מראש ומשתמשים בציטוזינים ממותלים לסינתזת הסיב אבל בלינקרים אנו משתמשים בציטוזינים לא ממותלים.

יש אפשרות שהבקטריופאג' יבטא את הגן בחיידקים וזאת על ידי הוספה של פרומוטור, אופרטור ו – RBS (אתר קשירת ריבוזומים). הפרומוטור והאופרטור הם של  $\beta$ -Gal ומופעלים על ידי IPTG. כדי לשמור על מסגרת הקריאה אנו משתמשים גם ב – AUG הראשון של ה –  $\beta$ -Gal. רק בשליש מהמקרים אנו מקבלים ביטוי בספריה חד כיוונית ואילו בספריה דו כיוונית אז רק בשישית מהמקרים. במידה ובמקטע המוחדר היה גם קטע שלפני ה – AUG הראשון לא נקבל חלבון כלל כיוון שלפניו יש קודוני עצירה בכל מסגרות הקריאה.

את הפאג'ים ניתן לגדל על צלחת וליצור פלאקים כך שבכל פלאק יש גן אחר. בכדי למצוא את המקטע המבוקש אנו נשתמש בגורם שמכיר אותו, יתכן גם מאורגניזם אחר, ואם יש לנו רצף ניתן לטרוק איתו את הספרייה על פי עיקרון ההיברידיזציה עליה ניתן לשלוט על ידי שינוי ריכוזי המלח והטמפרטורה.

על הצלחת עם הפלאקים אנו שמים ממבראנה שאליה נדבקים פאג'ים והמקטעים השונים. את הממבראנה אנו שמים להיברידיזציה עם הגלאי. את המושבות שבהם הייתה התאמה אנו מבודדים וחוזרים על התהליך עד שכל הפלאקים מכילים את המקטע שחיפשו. את המקטע ניתן לחתוך עם אנזימי רסטריקציה או על ידי PCR כך שה –  $\lambda$  מהווה את הפריימר. כיום קיימים גם אלמנטים שמקנים לחלק האמצעי של הפאג'  $\lambda$  את האפשרות למיצי עצמי במערכת המעגל המתגלגל ולהכניסו לפלסמיד Blue-script. לזה קוראים In Vivo Restriction.

במידה ואנו מחפשים תכונה שאין לנו רצפים שמכירים את ה – DNA שאחראי לביטוי שלה ואז משתמשים בספריית ביטוי. בשיטה זו אנו משתמשים במנגנון זיהוי של הפלאקים שהועברו לממבראנה והזיהוי נעשה על ידי נוגדנים שאותם מזהים על ידי נוגדנים אחרים בעלי סימון. כך אנו מזהים את המושבות בהם יש את החלבון שאנו מחפשים.

אם אין לנו את ה – DNA או את החלבון אז ניתן לבדוק לפי אילו RNA-ים משתנים כשהתכונה מתבטאת ועל ידי כך לאתר ולבודד את הגן. אם יש לנו מוטנט בו יש פגיעה בתכונה מסוימת שאנו מחפשים אז ניתן לחפש בספריה מקטע שייתן החזרה של התכונה על ידי קומפלימנטציה.

קיימות שלושה שיטות להפרדה. השיטה הראשונה היא ספריה דיפרנציאלית בה יוצרים שתי ספריות של cDNA מה – RNA של אותם תאים פעם אחת שהם משופעלים (על ידי הורמון) ופעם שהם לא משופעלים. אנו משווים בין ספריות אלו ורואים אלו גנים בוטאו רק בשפעול ואילו גנים הפסיקו את הביטוי בעקבות השפעול.

שיטה שנייה היא ווריאציה של השיטה הראשונה והיא נקראת ספריית הפחתה. גם בשיטה זו מכינים את שתי אוכלוסיות התאים (עם/בלי הורמון) ובשניהם יוצרים cDNA מה – mRNA אך שבשיטה זו מבצעים היברידיזציה בין שתי הספריות ואז נקבל DNA דו גדילי בכל המקרים חוץ מהגנים שמבוטאים רק באחד מבין האוכלוסיות את הסיבים נעביר דרך קולונה שסופחת DNA דו גדילי ואז נקבל רק את ה – DNA של הגנים שביטויים השתנה. את ה – cDNA משני האוכלוסיות מסמנים בצורות שונות וכך ידוע האם ה – DNA שהתקבל היא כתוצאה מביטוי באוכלוסיה של ההורמון או שמה ההורמון גרם להפסקת הביטוי ואז הגן בא מהאוכלוסיה שלא עברה טיפול בהורמון.

שיטה שלישית בנויה על עיקרון ההבדל בין האוכלוסיות ונקראת הצגה דיפרנציאלית בה מבודדים mRNA משתי האוכלוסיות ומסנתזים בעזרת פריימרים רנדומאליים ב – PCR את כל אוכלוסיית ה – mRNA כך שאחד הנוקליאוטידים מסומן רדיואקטיבית. את זה מריצים בג'ל וחושפים לפילם כתוצאה מכך אנו רואים רצף של פסים כך שבאחת האוכלוסיות חסרים מספר פסים או פס אחד זה אומר שהגנים או הגן מבוטאים רק באוכלוסייה השנייה. את גן זה חותכים וממצעים מהג'ל ובודקים לאן הוא שייך.

כשאינן גם את זה יש צורך להשתמש בנקודת מישען כמו RFLP או שימוש בתכונה מוכרת שאותה אנו יודעים למצוא והיא צמודה לפגם, כלומר תכונה שלמי שיש אותה יש גם את הפגם.

עד ליפני כשנה רוב העבודה הייתה דרך ספריות, לפני כ – 5 שנים החלה העבודה במסות גדולות כלומר קביעת רצף של כל הגנום.

כשיש לנו ספריית ביטוי ניתן להשתמש בתכונותיה לדברים שונים, למשל כשאנו מתעניינים בחלבונים קושרי DNA ניתן לסרוק את הספרייה על ידי מקטע DNA מסומן וכך לאתר את החלבון, כנ"ל ניתן לבצע גם עם RNA. ניתן גם לסרוק את הספרייה עם חלבון אחר וליראות קישור בין חלבונים.

ניתן להכניס לבקטריופאגים חלקים ממערכת החיסון ולגרום לכך שהפאג' יכיל גן ליצירת נוגדן שגיב עם חלבונים מסוימים, לשיטה זו קוראים Phage Display. שיטה זו הומצאה על מנת שתיתן שיטה להכנת נוגדנים, אך עדיין מיצרים נוגדנים על ידי הזרקה של הגורם לבעלי חיים, זאת כיוון שקיימות בעיות שונות עם הנוגדנים שנוצרים ב – Phage Display כגון אפיניות נמוכה של הנוגדן.

מערכת נוספת היא 2 Hybrid והיא בנויה לבדוד חלבונים הקשורים לחלבונים אחרים, למשל אילו חלבונים נקשרים לחלבונים שקשורים לתעתוק. מערכת זו פותחה בשמרים וכוללת פרומוטור הבנוי מאתר קשירה ל – RNA פולימראז ולפניו רצף שהוא אתר קשירה של אקטיבטור וללא אקטיבטור זה התעתוק היה ברמה הבאזלית. כאשר נקשר האקטיבטור אז מנגנון התעתוק מוגבר מאוד. אנו מוסיפים למערכת גם גן מדווח אחרי הפרומוטור כמו Lac Z הנותן צבע כחול עם IPTG.

כאשר ניקח את אתר הקשירה של החלבון Gal4 ומחברים אותו לחלבון שהוא מקור השאלה שלנו אנו מקבלים חלבון כימרי. כשמכניסים מערכת זו לשמרים בודקים עם יש ביטוי של הגן המדווח, במידה ולא מתקבל ביטוי אז אין אקטיבציה של התעתוק ומכאן החלבון הכימרי לא ניקשר במקומו כלומר החלבון המבוקש לא ניקשר לגורמי התעתוק באזור. במערכת זו ניתן לסרוק ספריית ביטוי מלאה כך שכל פעם מחליפים את החלבון אליו אנו בודקים את הקשירה של החלבון שלנו.

מערכת נוספת היא מערכים זהירים Micro Array. בשיטה זו אנו יוצרים מערך שזה מטריצה שעליה יכולים להיות עשרות אלפי גנים ובעזרת מערכת רובוטים ניתן לשלוט על כל תא ותא במערך. ולדעת מה יש בו ואז לבצע היברידיזציה וקריאה האם יש סיגנל או לא. שיטה זו הוכנה במקור לבדיקת רצף של הגנום כך שבכל אתר היה חלק ממנו עם חפיפות והמחשב ישלים בניהם אך זה לא הצליח עקב שונות בנוקליאוטידים בודדים שפגעו בהיברידיזציה, אך נמצאו לשיטה זו שימושים אחרים.

במערכים אלו בעזרת רובוט מטביעים רצפי DNA שאנו רוצים באחת משתי שיטות. הראשונה היא אפימטריקס והיא על ידי בניית אוליגו-נוקליאוטידים רצויים בכל תא ותא במטריצה כלומר, הרובוט בונה רצפים שונים בכל תא ותא במטריצה כך שידוע מה הרצף בכל תא. שיטה זו יקרה מאוד. אפשרות שנייה היא במקום לבנות אוליגו-נוקליאוטיד כל מקום אנו ניצור ב – PCR הרבה גנים כל פעם בעזרת פריימרים שונים ואז ניטען כל גן במקום אחר במטריצה. ה – PCR נעשה בצלחות של 96 באריות כך שבכל בארית יש גן אחר, והרובוט יכול לעבוד עם 4 צלחות כאלו בו זמנית. המערך מורכב על זכוכית אליה נידבק ה – DNA קוולנטית בעזרת UV. הזכוכית מצופת בפולייליזין להורדת הרקע.

בשיטת ה – Micro Array ניתן לבדוק אילו חלבונים מופעלים בתנאים מסוימים, לדוגמה שני תאים אחד רגיל והשני סרטני ובודקים את ה – RNA וניתן לזהות כך גנים שמבוטאים באופן שונה בין

התאים. אנו מייצרים cDNA בעזרת בסיסים המסומנים פלואורסצנטית כך שאדום לתאים סרטניים וירוק לתאים בריאים. את ה-cDNA הזה אנו מוסיפים למטריצה ואז בתנאי היברידיזציה נקבל באדום גנים שמבוטאים בסרטן בירוק זנים שמבוטאים בתאים רגילים וצהוב עם יש היברידיזציה של שניהם ושחור שאין היברידיזציה כלל. כיוון שאנו יודעים אילו גנים יש בכל תא ניתן לדעת אילו גנים פועלים בסרטן. קריאת הזכוכית נעשית על ידי מצלמת CCD בעלת יכולת זיהוי פלואורסנטי.

בעזרת שיטה זו התגלה גם כי קיימות מחלות שנובעות משני גורמים שונים, כלומר המחלות מורכבות משני מחלות דבר שלא היה ניתן לזיהוי עד שיטה זו שהראתה בברור שתי קבוצות של חולים שאצל כל קבוצה גנים אחרים מבוטאים.

כדי לעבוד עם גנומים גדולים צריך לפתח שיטות שונות. שיטה ראשונה היא לביצוע אלקטרופורזה של חתיכת DNA גדולה בג'ל לשיטה זו קוראים Pulls filed Electrophoresis. בשיטה זו אנו נותנים זרם חשמלי בפולסים ומדי פעם מחליפים את הכיוון כך מתקדם ה-DNA עד שהוא ניתקע ואז הפולס בכיוון השני משחרר אותו ומתקבל כעבור שעות הפרדה של מקטעים גדולים.

כדי לשמר מקטעים גדולים של DNA אנו משתמשים בתאים אאוקריוטים בהם המקטע נידחס בצורת כרומוזום מלאכותי כאשר עושים זאת בשמרים הדבר ניקרא YAC זשה Yeast Artificial Chromosome. היום משתמשים בוקטורים שהם כרומוזומים חיידקיים ולשיטה זו קוראים BAC זשה Bacteria Artificial Chromosome. בשיטה זו מכניסים את הכרומוזום לבקטריה עם גן מדווח ועמידות לאנטיביוטיקה וכך יודעים שהוא ניכנס שלם.

### הנדסה גנטית בצמחים

צמחים הם בעלי יכולת לעבור הכלאה עצמית מה שמקנה להם יתרון רב, כמו כן ניתן גם לקחת חלק מהצמח ולגדלו לצמח חדש, בנוסף מספר הצאצאים בהכלאה יכול להיות רב מאוד. לעומת זאת החסרונות הם שהגנום של הצמחים גדול מאוד, לדוגמה באורז הגנום ארוך פי 2 מגנום אדם. ברוב הצמחים קיים פוליפלואידיות ודבר נוסף הוא שתא הצמח הוא בעל דופן הקשה לחדירה.

כשמחפשים שיטה להכנסת גן לתוך צמח אנו יכולים ללכת בשתי גישות האחת לחפש משהוא חדש והשנייה זה לראות האם קיים כבר פיתרון לכך בטבע. במקרה זה הפיתרון של הטבע יעיל מאוד והוא על ידי חיידק קרקע אגרובקטריום החיי בקרקעי והוא מתקיף צמחים שקיבלו חתך וגורם לתאים באזור להתחלק בצורה לא מבוקרת וליצור משהוא דמוי גידול סרטני הנקרא Crown Gall (אפץ הכתר).

בשנות ה-80 תואר מנגנון הפעולה של החיידק והיום סוימה קריאת הגנום שלו שמכיל 4.5 מיליון בסיסים ופלסמיד של 200 אלף בסיסים שניקרא Ti Plasmid (Tumor Induce Plasmid). חלק מפלסמיד זה הוא T-DNA והוא זה שעובר לגנום הצמחי. בעבר הייתה סימביוזה בין חיידק זה לצמח כך שהוא נתן לצמח חנקות בתמורה לחומצות אמינו, אך חיידק זה הפך לפרזיט והוא מנצל את הצמח לקבלת חומצות אמינו שמהם הוא גדל מתפתח וגורם לגידול בלתי מבוקר של תאים.

במעבדה ניתן להכניס גנים שונים לתוך ה-T-DNA ולהכניסם לצמח. אנו עושים זאת על דסקיות עלים ובנוסף לגן אנו מכניסים גם עמידות לאנטיביוטיקה בכדי שהיה ניתן ליצור סלקציה של הדסקיות שאליהם ניכנס הגן. מדסקיות אלו אנו מכינים צמחים חדשים על ידי שימוש בהורמונים שגורמים לתאים להתנוונות והתמיינות מחודשת, כלומר חוזרים שלב התפתחותי, ולזה קוראים קלוס אשר ממנו מתפתח צמח שלם.

הפלסמיד בחיידק מחולק לשני חלקים האחד הוא Vir שזה האזור הרעיל ונושא בתוכו את הגנים שגורמים לתאים להפוך לסרטניים, והחלק השני הוא ה-T-DNA שעובר לגנום הצמחי. בקצבותיו של ה-T-DNA יש רצפים של 25 בסיסים (רצף אחד בכל צד) ואלו הרצפים היחידים שקובעים שמה שבניהם יועבר לצמח.

ההדבקה של הצמח היא במנגנון הדומה לקונוגזיה כך ששני התאים (של הצמח ושל החיידק נצמדים) ואז נוצר בניהם קשר, הדומה ל – GAP Junction בתאים אנימלים, ודרכו מועבר ה – T-DNA לתא הצמח. בתא הצמח ה – T-DNA מוכנס לגרעין ושם הוא ניכנס אקראית לגנום של הצמח. החיידק יודע להיצמד לצמח על ידי חומרים שהצמח מפריש שהוא נחתך, מטרת חומרים אלו היא להרחיק חרקים אך הם מושכים את החיידק.

ה – T-DNA מוכנס לתא הצמח כשהוא עטוף במספר חלבונים, כך שיש חלבון אחד שניקשר לקצה ומוביל את ה – T-DNA. בחלבון המוביל יש גם את הרצף לכניסה לתוך הצמח. כפי שציינו הכניסה של המקטע לגנום הצמח היא אקראית ואם המקטע יכנס לתוך גן אז זה יפגע בתא הצמח ויגרום למוות שלו. כדי שבכל זאת נקבל תאים בהם יש את המקטע שמוחדר אנו נבצע את התהליך על תאים רבים וכך יתקבלו כאלו שהיו תקינים ואם הגן מוכנס לגנום שלהם. ב – T-DNA יש מערכת של תעוק ותרגום אאוקריוטים על אף שזה פלסמיד חיידקי.

קיימת בעיה לעבוד עם פלסמיד כל כך גדול (200 אלף בסיסים), כדי לפתור בעיה זו יצרו מהפלסמיד המקורי שני פלסמידים שהאחד הוא ה – Vir והשני הוא קטן יותר ומכיל את ה – T-DNA. כדי שהחיידק יכיל את שני הפלסמידים על כל אחד אנו סמים עמידות לאנטיביוטיקה אחרת ומגדלים את החיידקים במצע המכיל את שני האנטיביוטיקות. ניתן גם לגרום לריקומבינציה בין הפלסמידים וקבלה מחודשת של פלסמיד אחד.

זו השיטה שהטבע יצר והיא מתאימה רק לצמחים דו פסיגיים, אך רוב הצמחים בחקלאות הם חד פסיגיים. כדי לבצע בהם הנדסה גנטית הומצאה שיטה על ידי האדם בה לוקחים חלקי DNA שמצפים אותם בזהב או בטנקסטון, ואז יורים אותם דרך זרם חזק של הליום לתוך העלה. ה – DNA שאנו מחדירים הוא פלסמיד בעל גן סלקציה והגן הרצוי, את העלים מגדלים על צלחות עם אנטיביוטיקה ואז כמו בשיטה הראשונה מגדלים מהם צמחים חדשים. עדיין לא ידוע בדיוק למה ואיך הגרעין מכניס את ה – DNA המוחדר לגרעין ולתוך הגנום. כיום משתמשים בשיטה זו גם בבעלי חיים על מנת לחסנם.

בשיטות אלו ניתן לשפר את החקלאות על מנת לקבל תוצרת חקלאית בעלת טעם טוב יותר, ויטמינים ואורך חיים רב יותר. כמו כן ניתן גם להגדיל את תפוקת המזון. ניתן גם לתת לצמחים עמידות נגד מזיקים שונים וזאת על ידי החיידק BT המפריש רעל חזק נגד חרקים אך לא פוגע כלל בבעלי חיים עליים. כשמעבירים גן כזה לצמח צריך להוסיף לו פרומוטור, RBS, אקסונים ואינטרונים. בנוסף צריך לשים לב גם ל – Codon Usage (עדיפות לרצפים שונים לחומצות אמינו) וכמובן שמירה על מסגרת הקריאה. בסופו של דבר במקרה זה הוכן ה – DNA בצורה סינטטית כיוון שהיה שוני גדול, וכך התקבלו צמחים מחוסנים מחרקים ומזיקים.

קיימים בעולם כבר תוצרים רבים של הנדסה גנטית בצמחים כמו ה – Golden Rice המכיל ויטמין A וגנים שנלקחו מנרקיסים. בשיטה דומה רוצים לחסן אוכלוסיות שלמות על ידי הכנסת גנים לתוך בנות או פרות אחרים.

בעגבניות קיימת הפרשה של אתילן כשהם מבשילות וזאת על ידי אנזים מסוים. את ביטוי אנזים זה ניתן לעצור על ידי Anti Sense RNA, בשיטה זו משתמשים ב – RNA של הסיב המשלים או באותו גן בכיוון ההפוך שיוצר בעצמו את ה – Anti Sense RNA, וכך על ידי היברידיזציה מושבת הגן והעגבנייה לא מבשילה והיא יכולה להישאר זמן רב במצב זה. כשרוצים להבשיל את העגבנייה מכניסים אותם לתא הבשלה ואז מתקבלות עגבניות בשלות. עגבניות אלו הוכלאו עם העגבניות הטעימות ביותר כדי לקבל עגבניות טעימות עם היכולת להבשלה מותנית.

כדי שמנגנון הנוגדנים בעגבנייה לא ישמיד את ה – Anti Sense RNA שהוא RNA זר אנו משתמשים במנגנון שניקרא RNA Interference בפועל ברמת החלבון לפני מנגנון הנוגדנים. כלי נוסף הוא שימוש בריבוזים שהם אנזימים המורכבים מ – RNA וחוטכים מולקולות RNA אחרות וכך הם יחטכו את ה – RNA של הגן שאחראי להבשלה והוא יושבת.



האריבידופסיס הוא הצמח הראשון שפוענח לו הגנום, ובקרוב יסוים הגנום של האורז, שהוא הצמח החקלאי הראשון שקוראים את הגנום שלו. באריבידופסיס יש כ – 26 אלף גנים וכמעט כל הגנום הוא כפול, כלומר יש רק 13-15 אלף גנים שונים שזה המינימום הנדרש למעבר מיצור חד תאי ליצור רב תאי.

ט.ל.ח.