

ענת ירדן

דן מיכאל

# הנדסה גנטית

## מעקרונות ושיטות למחקר ויישומים



מכון ויצמן למדע

WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE

המחלקה להוראת המדעים



מטה מל"מ

המרכז הישראלי לחינוך מדעי טכנולוגי  
על-שם עמוס דה-שליט



משרד החינוך

האגף לתכנון ולפיתוח תוכניות לימודים



משרד החינוך התרבות והספורט

4207

אישור מס'

5.10.08

אושר בתאריך



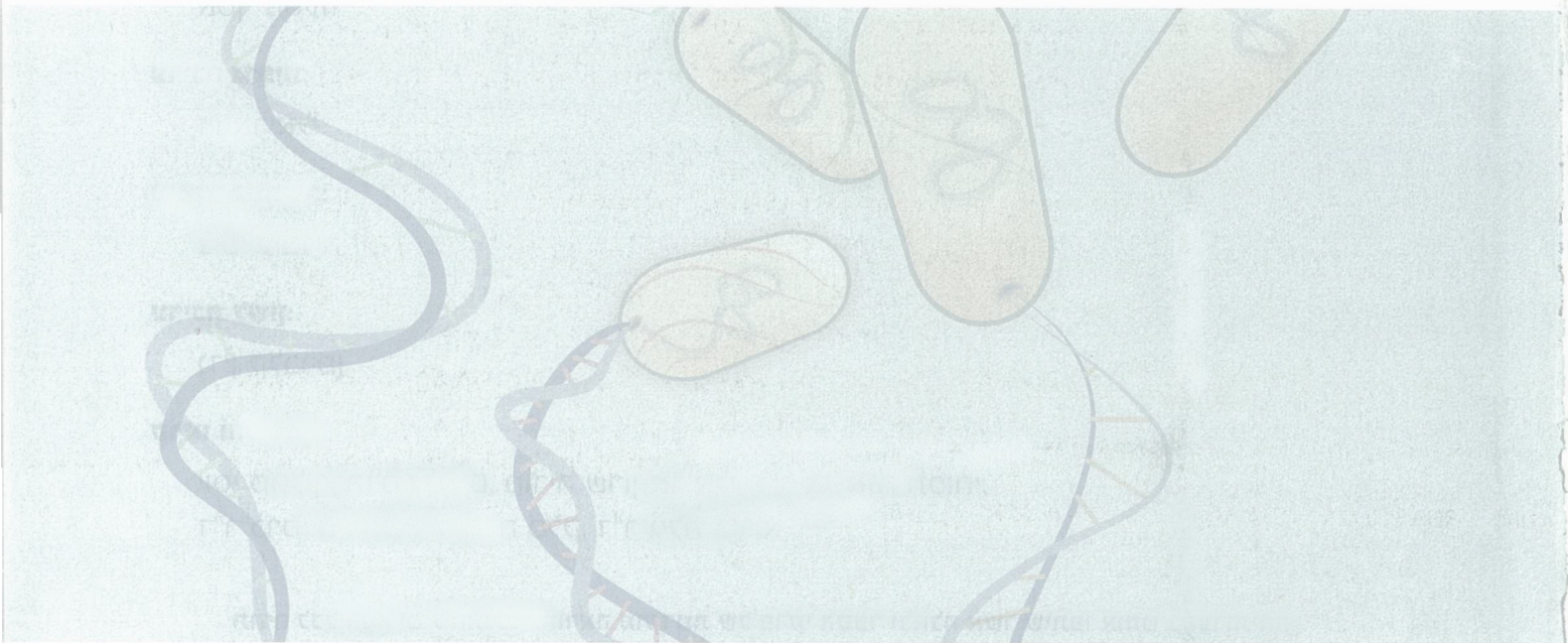


ענת ירדן

דן מיכאל

# הנדסה גנטית

## מעקרונות ושיטות למחקר ויישומים



האתר המלווה את הספר: <http://stwww.weizmann.ac.il/g-bio/geneengine/home.html>

מכון ויצמן למדע

WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE  
המחלקה להוראת המדעים



מטה מל"מ

המרכז הישראלי לחינוך מדעי טכנולוגי  
על-שם עמוס דה-שליט



משרד החינוך התרבות והספורט

4207 אישור מס'

5.10.08 אושר בתאריך

משרד החינוך



האגף לתכנון ולפיתוח תוכניות לימודים

# Genetic engineering: from principles and methods to research and applications

Dan Michael<sup>1,2</sup> and Anat Yarden<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Department of Science Teaching and <sup>2</sup>The Department of Molecular Cell Biology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel.

## ייעוץ מדעי:

פרופ' משה אורן, פרופ' מיכאל ווקר, פרופ' הלל פרום

## ליווי הפיתוח וייעוץ דידקטי:

אילת אברהם, ד"ר זהבה ברק, ד"ר רות לנץ

## עיצוב גרפי:

אסף מסעוד

## עריכה גרפית:

זיו אריאלי

## עימוד במחשב:

ציפי עובדיה

## עריכת לשון:

נדין קלברמן

## קראו והעירו:

יוסי מחלוף, הדס גלברט, מוריה שרון-אריאלי, ד"ר אליאנה תפוחי,  
ד"ר כרמלה רוגל, ד"ר הדה פלק, ד"ר גילת בריל

תודה לכל המורים שהתנסו בהוראה מוקדמת של פרקי הספר ולאילה אשר שיתפו אותנו בהערותיהם:  
הדס גלברט, ד"ר אילתה דלל, ד"ר רוייה ישראלי, ד"ר אליאנה תפוחי, ד"ר רוני לב, עמוס גואז,  
ד"ר אפרת מאיר, ד"ר רחל דמרי, ענת לוי, ניבה כהן, ד"ר ברוך וקס, ד"ר שמואל כהן

אין לשכפל, להעתיק, לצלם, להקליט, לתרגם, לאחסן במאגר מידע, לשדר או לקלוט בכל דרך או אמצעי אלקטרוני, אופטי או מכני או אחר כל חלק שהוא מהחומר שבספר זה. שימוש מסחרי מכל סוג שהוא בחומר הכלול בספר זה אסור בהחלט אלא ברשות מפורשת בכתב מהמוציא לאור.

©  
כל הזכויות שמורות  
משרד החינוך  
הודפס בישראל נובמבר 2008  
דפוס מאירי בע"מ

# אל הקוראים,

אנו חיים בעידן שעוצב באופן ניכר על-ידי מהפכת ההנדסה הגנטית. למעשה, קשה שלא לחוש בתרומת ההנדסה הגנטית בתחומי המחקר הבסיסי, הרפואה, החקלאות ואפילו בתחומי הכלכלה והמשפט. תוכני הספר שבידיכם נועדו לאפשר לכם להתרשם מעוצמת ההשפעה שיש להנדסה הגנטית על חיינו באמצעות הבנה מעמיקה של עקרונותיה, שיטותיה ויישומיה.

תחילתה של מהפכת ההנדסה הגנטית היא בהצלחת הגישה המאפשרת לייצר צירופי DNA חדשים במבחנה. צירופי DNA חדשים ניתן להחדיר לתאים וכך לנצלם למחקר וליישומים. יתרה מכך, צירופי DNA חדשים ומגוון גישות נוספות מאפשרים לנו להשביח תאים ואורגניזמים וגם לגרום להם לייצר עבורנו מוצרים בעלי ערך ביוטכנולוגי, כדוגמת תרופות. לא פחות חשוב לציין כי מגוון יישומיה של ההנדסה הגנטית נפוצים בתחומים נוספים כגון אבחון גנטי, זיהוי פלילי ובמיוחד בשטחי מחקר רבים ומגוונים כדוגמת חקר מחלת הסרטן.

ההנדסה הגנטית מאפשרת לחוקרים להתקדם בשלושה מסלולים עוקבים עיקריים (איור 8.1 בפרק 8):  
**m-DNA לגן, מגן לתפקידו ולבסוף מתפקידו של גן ליישומים ביוטכנולוגיים.** מסלולי חקר ויישום אלה מהווים את נושאו של סיפור המסגרת שבספר שחלקיו פרושים גם על פני הפתיחים של פרקי הספר. מימוש ההתקדמות בשניים מתוך שלושת מסלולי החקר והיישום העוקבים מומחש באיור 8.18.

בפרק טיפוסי ניתן למצוא את החלקים הבאים:

1. **הפתיח** הוא אחד מחלקי הפרק החשובים ביותר. הוא מופיע מיד לאחר כותרת הפרק ונועד לתרום להבנת סיפור המסגרת לספר כולו.
2. **האיורים** תוכננו ועוצבו כך שיספרו את העקרונות והשיטות של ההנדסה הגנטית בתמצית ובדרך ידידותית.
3. **תיבות סיכום העמוד** המופיעות בתחתית העמוד נועדו לתמצת את הכתוב בעמוד ובעמודים הסמוכים תוך הדגשת מושגים, עקרונות ותהליכים.
4. **גוף הפרק** נועד לאפשר הבנה מקיפה של כלל נושאי הפרק. גוף הפרק מכיל הפניות לאיורים שנועדו לפרש ולהמחיש בדרך ויזואלית את נושאי הפרק.
5. **התיבות**, ובכללן התיבות הצדדיות שאינן ממוספרות, נועדו להקל על רצף הקריאה. בנוסף, התיבות מאפשרות להדגיש או להרחיב נושאים מסוימים ולהעשיר את הידע.
6. **השאלות** נועדו לתרגול החומר הנלמד ולעתים גם להרחבת בסיס הידע.

הספר בנוי בצורה ייחודית המאפשרת קריאת חלקיו השונים תוך מעבר מחלק אחד של הפרק לחלק אחר שלא על פי סדר מוגדר. לדוגמה, הספר תוכנן כך שקריאה של הפתיחים, סיכומי העמודים והאיורים תוכל לאפשר כיסוי סביר, גם אם לא מלא של תוכני הספר.

לסיום, תמצאו כי בספר קידוד צבעוני של חלקי הפרק השונים ובכלל זה תתי-הפרק, התיבות והאיורים. הצבע האדום מציין כי הקריאה הכרחית להבנת כלל תוכני הספר. לעומת זאת, הצבע האפור מציין כי החומר נועד להעשרת הידע.

קריאה מהנה!

**כריכה קדמית:** האיור בכריכה הקדמית ממוחיש עקרון בסיסי בהנדסה גנטית שלפיו ניתן להעביר DNA מאורגניזם אחד לאורגניזם אחר לצרכים ביוטכנולוגיים. לדוגמה, ניתן להעביר DNA מאדם לחיידק ומחיידיק לצמח. בעקבות העברת DNA כזו, הנעשית תוך כדי יצירת צירופי DNA חדשים, ניתן לגרום לשינוי בתכונות האורגניזם שקיבל את ה-DNA. לעתים השינוי בתכונות מתבטא ביצירת חלבון-תרופה ולעתים ביצירת חלבונים המשביחים את תכונות האורגניזם המקבל. כך לדוגמה, DNA מאדם מאפשר לייצר אינסולין אנושי בחיידק. במקרה אחר, DNA שמקורו בחיידק מאפשר לצמח לבטא חלבון-רעלן חיידקי המקנה לצמח עמידות בפני חרקים.

**כריכה אחורית:** ניתן למצוא בספר מגוון של עקרונות ושיטות עכשוויים של ההנדסה הגנטית המאפשרים גישות מחקר ויישומים רבים. בחרנו לציין בכריכה האחורית את מקצת העקרונות (בירוק), החומרים והשיטות (בלבן) ומקצת משטחי המחקר והיישומים (באדום) המיוצגים בספר.

### מקורות לתמונות:

1. צילום של תא רקמת חיסוי פנימית, עמוד 23:  
באדיבות פרופ' בנימין גיגר ואילנה סבנאי, מכון ויצמן למדע.
2. צילום של תאי דם, עמוד 23:  
With kind permission from Dr. K. Nagashima NCI-Frederick USA.
3. צילום של תא עצב, עמוד 23:  
With kind permission from Prof. Arendt of the Paul-Flechsig-Institut at Leipzig.
4. צילומים של ילד חולה סוכרת, עמוד 31:  
Courtesy of the Clendening History of Medicine Library, University of Kansas Medical Center.
5. חיידקים על ראש סיכה, עמוד 40:  
With permission from Natasha Mulder, Science Photoshop Library.
6. בקטריופאג'ים רבים ספוחים לחיידק, עמוד 40:  
With kind permission from Prof. M. V. Parthasarathy CIMC, Cornell University, NY.
7. בקטריופאג' בודד, עמוד 40:  
With kind permission from Prof. Andreas Kuhn, University of Hohenheim, Germany.
8. פלסמיד מבעד למיקרוסקופ אלקטרוני, עמוד 56:  
With kind permission from Prof. Stanley N. Cohen, Stanford University.
9. דג סלמון טרנסגני, עמוד 184:  
With kind permission from Dr. G. L. Fletcher and Dr. Choy Hew at the Ocean Sciences Center, Memorial University of Newfoundland, St. John's Newfoundland.
10. עפץ בצמח עגבנייה, עמוד 193:  
With kind permission from K. Kuzmanovic, School of Biological Sciences, University of Sydney, Australia.

# תוכן העניינים

## 1. מגנטיקה מולקולרית לביוטכנולוגיה מודרנית

1 יסודות הגנטיקה המולקולרית.....

2 מתכונות ליחידות התורשה.....

2 ה-DNA כחומר התורשתי בעולם החי.....

10 המסלול מ-DNA לחלבון והקוד הגנטי.....

16 מתכונה לגן והגרסאות של גן.....

20 מכרומוזום לרצף הגנום.....

22 הבקרה על ביטוי גנים ותוצריהם.....

24 בקרת ביטוי ברמת ה-DNA.....

24 תהליכי שינוי ובקרה ברמת ה-RNA.....

28 תהליכי שינוי ובקרה מ-RNA לחלבון.....

30 מביוטכנולוגיה מסורתית לביוטכנולוגיה מודרנית המבוססת על הנדסה גנטית.....

## 2. חיתוך DNA על-ידי אנזימי הגבלה ואפיונו

39 "סיפור מלחמה": גילוי אנזימי ההגבלה.....

41 העוצמה היא במגוון: סוגים שונים של אנזימי הגבלה וסוגים שונים של חיתוך.....

46 אפיון ראשוני של מולקולת DNA: חיתוך, הפרדת מקטעי DNA בג'ל ומפות הגבלה.....

## 3. שיבוט DNA באמצעות נשאים

56 פלסמידים כנשאים בשיבוט.....

62 שיבוט בו-זמני של מספר מקטעי DNA באמצעות פלסמיד.....

69 הבקטריופאג' כנשא המשמש בשיבוט.....

## 4. שיבוט DNA בעזרת ספריות וגלאים

77 שיבוט גן מסך־ן באמצעות ספרייה גנומית.....

84 שיבוט באמצעות ספריות DNA משלים.....

85 האנזים המתנתק במהופך ויצירת DNA משלים.....

86 יצירת ספריית DNA משלים.....

88 איתור הגן/ה-DNA הרצוי בספרייה באמצעות גלאי, תספיג והיברידיזציה.....

92 אסטרטגיות לשיבוט DNA משלים הנגזר מגנים שונים.....

## 5. קביעת רצף הנוקלאוטידים ב-DNA והשימוש במידע הנאגר

98 שיטת סנגר לקביעת רצף נוקלאוטידים ב-DNA.....

104 מרצף DNA לרצף חלבון.....

108 ..... השוואה ממוחשבת בין רצפים והסקת מסקנות.

## 6. תגובת השרשרת של הפולימראז (PCR)

112 ..... הדרך לפריצת דרך טכנולוגית: הצצה נדירה למוחו של הממציא.

115 ..... ה-PCR - עקרונות ומהות

122 ..... שימושים ל-PCR

122 ..... RT-PCR

124 ..... PCR במשפט וברפואה

## 7. אפיון ביטוי גנים ותוצריהם

136 ..... אפיון ביטוי גנים ברמת ה-DNA

140 ..... אפיון ביטוי RNA

140 ..... אפיון ביטוי RNA באמצעות תספיג צפוני

143 ..... אפיון ביטוי RNA באמצעות RT-PCR

145 ..... אפיון ביטוי RNA באמצעות שבבי DNA

150 ..... אפיון ביטוי חלבונים

## 8. הנדסת תאים ואורגניזמים לצורכי מחקר וליישומים ביוטכנולוגיים

166 ..... כש-DNA רקומביננטי וכסף נפגשים: "לידת" הביוטכנולוגיה המודרנית

169 ..... ביטוי-יִתָּר של תוצר גן בתאים של בעלי-חיים הגדלים בתרבית

176 ..... השתקת ביטוי גן בתאים של בעלי-חיים

177 ..... ניצול "RNA מפריע" להשתקת ביטוי גן

182 ..... ביטוי-יִתָּר של תוצר גן בבעלי חיים טרנסגניים

190 ..... הנדסה גנטית בצמחים

191 ..... הנדסה גנטית בעזרת תרביות צמחים

191 ..... סיפורו של חיידק האגרובקטריום הנחשב "למהנדס הגנטי הקדום ביותר"

194 ..... החדרת DNA רצוי לתאי צמח: ניצול האגרובקטריום וכלים אחרים

199 ..... יצירת צמחים טרנסגניים בעלי יתרונות חקלאיים וביוטכנולוגיים

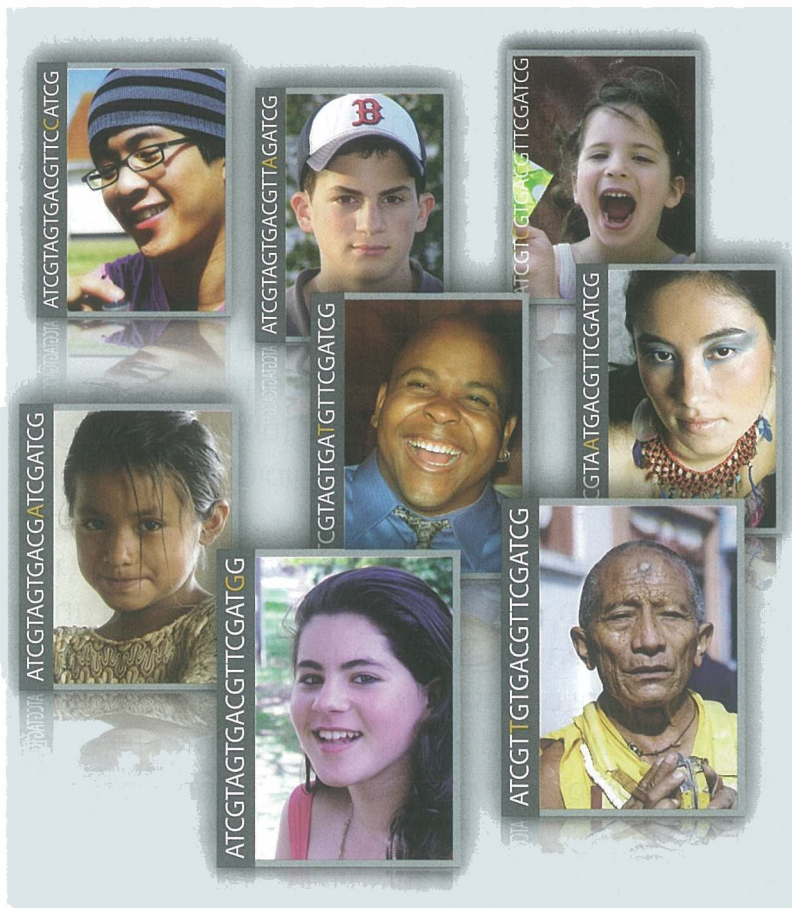
203 ..... מ-DNA לגן ומגן לתפקידיו וליישומים ביוטכנולוגיים

207 ..... **הפניות**

213 ..... **אינדקס**



# מגנטיקה מולקולרית לביוטכנולוגיה מודרנית



כאשר בוחנים את ה-DNA של אנשים שונים, מתגלה כי אנו דומים זה לזה יותר מכפי שאנו שונים זה מזה! למעשה ה-DNA של כל שני בני אדם על פני כדור הארץ זהה ב-99.5% ורק 0.5% מרצף ה-DNA אחראי לשונות הגנטית בין אנשים. חשוב לחקור את השונות בין אנשים ברמת ה-DNA, שכן ניתן לעתים להסביר באמצעותה מדוע לאנשים מסוימים יש נטייה לחלות במחלות מסוימות בעוד שאחרים עמידים לאותן מחלות. אם נדע לקבוע במדויק היכן ב-DNA קיימת שונות בין פרטים, שהיא בעלת חשיבות רפואית, נוכל לא רק להבין את הגורמים הגנטיים למחלות אלא גם לייצר את הפרופיל הרפואי של אדם כדי לעזור בבחירת התרופה הטובה ביותר למענו. למעשה, היכולת לדעת מהו רצף הבסיסים המלא ב-DNA של כל אדם ואדם, רצף המונה כ-3 מיליארד בסיסים, והידעה מה היא תרומתם של בסיסים במקום מסוים לתכונות הפרט, פותחת בפני החוקרים והרופאים את עידן הרפואה האישית. בעידן כזה מתאימים תרופה לא רק על פי סוג המחלה אלא גם על פי המידע שמקורו ברצף ה-DNA של כל פרט.

## יסודות הגנטיקה המולקולרית

כבר לפני אלפי שנים היה האדם מודע לעובדה שלפרטים שונים המשתייכים לאורגניזם מסוים יש **תכונות ייחודיות העוברות בתורשה**. כך לדוגמה, פרות הנותנות חלב בשפע, ימליטו פרות בעלות תכונה דומה, וצאצאיהם של צמחים הנושאים פרות גדולים, ישאו אף הם פרות גדולים. משעמד על עיקרון זה החל האדם לעסוק בבחירה (Selection) של פרטים בעלי תכונות רצויות ובהשבחתם. את ההשבחה השיג על ידי הכלאה (זיווג) בין פרטים בעלי תכונות רצויות כדי לקבל תכונות משופרות בצאצאיהם. האדם, כיעקב המקראי שזיווג בין כבשים לקבלת כבשים בעלי תכונות רצויות, מחפש כל העת דרכים "להתערב בסדרי בראשית" של עולם החי, כדי לממש את מטרותיו ולספק את צרכיו.

1 תכונות ייחודיות של האורגניזם עוברות בתורשה. האדם עוסק כבר אלפי שנים בהשבחת בעלי-חיים וצמחים כדי לקבל את האורגניזמים בעלי התכונות הרצויות לו. גרגור מנדל "התניע" את מדע התורשה לאחר שהסיק מניסיונותיו הכמותיים כי לתכונות העוברות בתורשה אחראיות "חידות בדידות מוגדרות". כל יחידה מוגדרת שכזו העוברת בתורשה נקראת "גן".

## מתכונות ליחידות התורשה

איך עוברת תכונה מסוימת בתורשה מפרט לצאצאיו, כלומר מדור לדור? גרגור מנדל (Gregor Mendel) שחי בין השנים 1822-1884, תרם תרומה ראשונית ומשמעותית בדרך לפתרון תעלומת דרך ההורשה של תכונות. מנדל "התניע" את מדע התורשה, ויש הקוראים לתורתו בשם החיבה "מנדליזם". הוא תרם

□ לאחר שוויתר מנדל על כוונתו לשמש ככומר ולאחר שהפסיק את לימודי הפיזיקה, שימש כמורה מחליף. במקביל החל לעסוק בתורשה מן ההיבט הכמותי, היבט שביולוגים לא חשבו לעסוק בו קודם. את גישתו הכמותית שהביאה לפריצת דרך מייחסים לדיעותיו בפיזיקה.

□ "יחידה מוגדרת" העוברת בתורשה נקראת "גן" ולכן הפדע העוסק בתורשה נקרא "גנטיקה". לכל גן ייתכנו גרסאות שונות ו**גרסה של גן** מכנים גם "צורה" או "אלל". גן מיוצג אצל כל פרט על ידי זוג אללים, אלל אחד מהאב ואלל אחר מהאם. ייתכן כי בפרט מסוים האללים של גן שונים זה מזה, ולעתים הם זהים זה לזה. מקור המילה "אלל" (Allele) מהמילה היוונית "allelon" שפירושה "זה עם זה" (בזוג).

להבנה כי ישנן "יחידות בדידות מוגדרות" שמשתתפות בקביעת תכונות העוברות בתורשה מפרט לצאצאיו. "יחידה מוגדרת" שמשתתפת בקביעת תכונה כונתה לראשונה בשנת 1909 על ידי החוקר הדני יוהנסן בשם "גן". מנדל השכיל להכיר בעובדה כי לכל פרט **זוג גרסאות** של כל "יחידה מוגדרת" הקובעת תכונה. כמו כן קבע שפרט מסוים מקבל גרסה אחת של יחידה כזו מהאב וגרסה אחרת מהאם. לעתים הגרסה המתקבלת מהאב זהה לזו המתקבלת מהאם.

כך לדוגמה, כאשר מנדל חקר את דרך הורשת הצבע של זרעוני אפון שלעתים צבעם צהוב ולעתים ירוק, הוא קבע כי "היחידה המוגדרת" המשתתפת בקביעת תכונה זו מתקיימת בשתי גרסאות (אללים). אלל אחד המשתתף בקביעת צבע זרעון האפון ניתן לסימון באות  $Y$  (Yellow), ואילו האחר ניתן לסימון באות הקטנה  $y$ . הוא קבע כי אם לצמח שני אללים מסוג  $Y$ , כלומר אם הצמח הוא  $YY$ , הרי שצבע זרעוניו יהיה צהוב. אומרים כי צמח המסומן  $Yy$  קיבל אלל  $Y$  אחד מתא המין הנקבי ואלל  $y$  זהה מתא המין הזכרי של הצמח. מנגד, אם הצמח הוא בעל שני אללים מהסוג  $y$ , כלומר אם הצמח הוא  $yy$ , יהיו זרעיו ירוקים. לעומת זאת, אם הצמח הוא  $Yy$ , צבע הזרעונים יהיה צהוב. לכן אומרים על האלל  $Y$  שהוא דומיננטי ביחס ל- $y$  ואילו האלל  $y$  הוא רצסיבי ביחס ל- $Y$ . כמו כן אומרים כי  $Y$  ו- $y$  הם שתי גרסאות של גן מסוים, וכל צמח מקבל כל אחת מהגרסאות מכל אחד מתאי המין. למעשה, בצמח האפון, כמו גם באדם אשר לו כ-20,000 גנים, כמעט כל גן מיוצג **בפרט** על ידי שתי גרסאות, כאשר לעתים הגרסאות זהות זו לזו ולעתים שונות במקצת זו מזו.

□ נהוג לומר בהכללה כי כל הורה מוריש באמצעות תא המין שלו רק גרסה אחת (אלל אחד) של כל גן לכל צאצא שלו.

ממה מורכבים הגנים שמושגתם בקביעת התכונות ושעוברים בתורשה? במילים אחרות, מהו החומר התורשתי? היכן בתא ממוקם החומר התורשתי?

## DNA- כחומר התורשתי בעולם החי

מנדל הציע בשנת 1865 כי **התכונות מורשות מדור לדור על ידי "יחידות מוגדרות" בדידות** הנקראות כיום **גנים** והמועברות באמצעות תאי המין. מכיוון שהגנים עוברים בתורשה, הם נחשבים לחומר תורשתי. כיום ידוע כי החומר התורשתי אינו מורכב רק מגנים. המשימה לזיהוי החומר התורשתי בתא היתה מאתגרת.

מנדל הסיק כי בכל פרט לכל גן יש זוג גרסאות. כל גרסה נקראת גם "צורה" או "אלל". לגבי כל זוג אללים שבפרט מסוים - מקורו של אלל אחד בתא המין הזכרי, ושל האחר בתא המין הנקבי. ייתכן מצב שבו בפרט מסוים שני האללים של גן מסוים זהים. כאשר האללים של גן מסוים שונים זה מזה, ייתכן שאחד האללים דומיננטי ביחס למשנהו והאחר נחשב לרצסיבי.

השורשים המדעיים שהביאו לזיהוי החומר התורשתי נעוצים באותה תקופה שבה עוצבו עקרונות התורה המנדלית. בשנת 1869 חקר המדען השוויצרי מישר (J. F. Miescher) את הכימיה של גרעין התא, אברון המצוי בתאים של כל היצורים החיים מלבד החיידקים. לשם כך הרחיק מישר את הציטופלסמה המקיפה את גרעין התא ובודד את גרעין התא. הוא מצא כי בגרעיני התאים ישנו חומר חומצי העשיר בזרחן והמאורגן כמולקולה גדולה. כעבור זמן נקרא החומר שזיהה בגרעין בשם "חומצת גרעין" (Nucleic acid). בחומצת גרעין יש שלושה מרכיבים החוזרים על עצמם: קבוצת זרחה (קבוצת פוספאט), סוכר ובסיסים חנקניים.

בשנת 1920 כבר היה ידוע כי ישנן שתי חומצות גרעין בתא: האחת נמצאת בגרעין התא ונקראת DNA, ואילו חומצת הגרעין האחרת מצויה בגרעין וגם בציטופלסמה והיא נקראת RNA. באותה תקופה הייתה ידועה גם מולקולה אחרת שהיא חלק ממרכיבי היסוד של התא: החלבון. המשותף ל-DNA, RNA וחלבונים הוא שכולן מולקולות פולימריות הבנויות מאבני בניין מוגדרות החוזרות על עצמן.

עם גילוי המולקולות הפולימריות נשאלה השאלה אם אחת מהן היא המולקולה האחראית להורשת התכונות של אורגניזם. בשנת 1944 בהתבסס על ממצאים ראשוניים של החוקר גריפית' (F. Griffith), הצליחו המדענים אברי, מקלויד ומקרת' (O. Avery, C. MacLeod and M. McCarthy) להראות כי **ה-DNA הוא החומר התורשתי**. חוקרים אלה הוכיחו זאת כאשר גרמו לשינוי בתכונות של חיידק לאחר שהוחדר לתוכו DNA של חיידק אחר. אברי ועמיתיו גילו כי אם מחדירים DNA של החיידק מחולל דלקת הריאות לחיידק "תמים" שאינו מסוגל לחולל מחלה זו, הרי שהחיידק "התמים" שאליו חדר ה-DNA נעשה גם הוא חיידק אלים הגורם לדלקת ריאות. התכונה האלימה "שנרכשה" על ידי החיידק מועברת בתורשה לכל צאצאיו של החיידק. לכן ניתן לומר כי ה-DNA הזר הוא זה שהקנה לחיידק "התמים" שקיבל אותו, תכונה חדשה העוברת בתורשה.

□ אומרים שהחיידק שרכש תכונה חדשה בעקבות החדרת DNA לתוכו עבר "טרנספורמציה" (Transformation).

אברי ועמיתיו הגדירו לראשונה את ה-DNA כחומר התורשתי, ומכאן התגבשה ההנחה שלפיה הרכבם הכימי של הגנים הוא DNA ושמשכנם הוא בגרעין התא. אך חלפו עוד שנים רבות עד שהתברר כיצד מתפקד ה-DNA כחומר תורשתי המכיל גנים המשתתפים בקביעת תכונות. שתי שאלות חשובות עלו בהקשר זה: מהו המבנה המולקולרי של ה-DNA והאם המבנה יכול להסביר את תכונותיו כחומר תורשתי?

□ מכיוון שהיחידה הבסיסית המשתתפת בקביעת תכונה תורשתית נקראת "גן", מכלול הגנים שפרט קיבל מהוריו נקרא "גנוטיפ" (Genotype). הגנוטיפ הוא בעל תרומה מכרעת לתכונות כפי שהן באות לידי ביטוי בכל פרט. תכונות הפרט הן ה"פנוטיפ" (Phenotype). הפנוטיפ הוא תוצר של יחסי גומלין בין הגנוטיפ לבין הסביבה.

שני חוקרים, פרנסיס קריק (Francis Crick) הבריטי וג'יימס ווטסון (James Watson) האמריקני, הצליחו בשנת 1953 להציג מודל תלת-קמדי של מולקולת ה-DNA ולהעלות באמצעותו השערה המסבירה כיצד מבנה ה-DNA עשוי לאפשר לו לשמש

כנשא מולקולרי של מידע העובר בתורשה. הישג מרשים זה זיכה אותם כעבור 9 שנים בפרס נובל. כדי להבין את מבנה ה-DNA ואת השפעתו על תפקודו של ה-DNA, יש להקדים ולהכיר את תכונות ה-DNA ובכלל זה את מרכיביו הכימיים ואת יחסי הגומלין בין המרכיבים השונים.

מכיוון שהגנים עוברים בתורשה, הם נחשבים **לחומר תורשתי**. מה הם מאפייניו המולקולריים של החומר התורשתי והיכן הוא ממוקם בתא? המדען השוויצרי מישר מצא כי בגרעין התא ישנה מולקולה גדולה וחומצית שנקראת "חומצת גרעין". בתא יש למעשה שתי חומצות גרעין פולימריות: האחת נקראת DNA והאחרת נקראת RNA. הניסוי של אברי ועמיתיו הוכיח כי **המולקולה הפולימרית המשמשת כחומר התורשתי היא ה-DNA**.

## עיקרי המרכיבים והתכונות של ה-DNA כחומר התורשתי הם אלה:

1. **ב-DNA 3 תרכובות** (איור 1.1): סוכר מטיפוס דאוקסי-ריבוז, קבוצת זרחה (המכילה במרכזה אטום זרחן, Phosphate) ו-4 בסיסים חנקניים שהם:

- אדנין [A] (Adenine)
- ציטוזין [C] (Cytosine)
- גואנין [G] (Guanine)
- תימין [T] (Thymine)

תרכובות אלה חוזרות על עצמן מספר רב של פעמים ב-DNA.

2. **הסוכר, קבוצת הזרחה ואחד מהבסיסים החנקניים מתקבצים ליחידה בסיסית החוזרת על עצמה מספר רב של פעמים ב-DNA והנקראת נוקלאוטיד** (Nucleotide, N) (איור 1.2). בעוד שנוקלאוטיד ב-DNA מורכב ממולקולת סוכר אחת, בסיס חנקני אחד וקבוצת זרחה אחת (איור 1.2א'), בנוקלאוטיד המצוי חופשי בתא והמיועד לקישור וליצירת פולימר ה-DNA יש 3 קבוצות זרחה, ששתיים מהן מוסרות במהלך קשירת שני נוקלאוטידים סמוכים בעת סינתזת ה-DNA (איור 1.2ב').

3. **נוקלאוטיד חופשי המיועד לשיבוץ ב-DNA** (איור 1.2ב') **מכיל אחד מ-4 בסיסים שונים. אלה ארבעת הנוקלאוטידים:**

□ הקידומת "דאוקסי" מציינת את היעדרה של קבוצת הידרוקסיל (OH) מעמדה 2' של הסוכר דאוקסי-ריבוז.

■ דאוקסי אדנוזין תלת-פוספאט  
(dATP: deoxyAdenosine-tri-phosphate)  
(באיור 1.2ב' יש להציב את הבסיס אדנין במשבצת "הבסיס החנקני").

■ דאוקסי גואנוזין תלת-פוספאט (dGTP)

■ דאוקסי ציטידין תלת-פוספאט (dCTP)

■ דאוקסי תימידין תלת-פוספאט (dTTP)

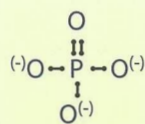
כאשר רוצים לציין את העובדה כי כל ארבעת הנוקלאוטידים נוכחים בתא או במבחנה, משתמשים בשם המתייחס לכולם: dNTP. dNTP הוא קיצור של: deoxy-Nucleotide-tri-phosphate.

□ למרכיבי ה-DNA ולנגזרות שלהם יש מינוחים מדויקים המשקפים את השיבותם. כאמור, ב-DNA קיימים 4 בסיסים חנקניים: Adenine (A), Guanine (G), Cytosine (C), Thymine (T). כאשר הבסיס החנקני קושר סוכר מסוג דאוקסי-ריבוז, מתקבל **נוקלאוזיד** (Nucleoside). ארבעת הנוקלאוזידים הם: deoxy-Adenosine, deoxy-Guanosine, deoxy-Cytidine, deoxy-Thymidine, בהתאמה. כאשר אל הנוקלאוזיד קשורות קבוצות הפוספט מתקבל נוקלאוטיד (Nucleotide). מספר קבוצות הפוספט הקשורות אל הנוקלאוזיד נע בין 1 (mono-phosphate), כמו ב-DNA, ובין 3 (tri-phosphate), כמו בנוקלאוטיד חופשי המיועד לשיבוץ ב-DNA. לשם הנוחות מסמנים בקיצור את רצף הנוקלאוטידים ב-DNA לפי הבסיס החנקני בכל נוקלאוטיד: A, G, C, T.

4. **בסוכר הדאוקסי-ריבוז חמישה אטומי פחמן הממוספרים 1'-5'** (איור 1.1). הפחמן בעמדה 1' נקשר לבסיס החנקני שבנוקלאוטיד. פחמנים 3' ו-5' הם בעלי חשיבות ביצירת קשרים תוך מולקולריים בין נוקלאוטידים.

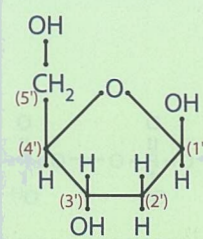
לאחר שהוכח כי ה-DNA הוא החומר התורשתי, הצליחו פרנסיס קריק וג'יימס ווטסון להציג מודל תלת-ממדי של מולקולת ה-DNA ולהסביר באמצעותו כיצד ה-DNA משמש כחומר התורשתי. עיקרי המרכיבים והתכונות של ה-DNA כחומר התורשתי מובאים בסעיפים 1-10 בעמוד זה ובעמודים הבאים. כמתואר באיור 1.1, ב-DNA יש שלוש תרכובות: הסוכר דאוקסי-ריבוז, קבוצת הזרחה וארבעה בסיסים חנקניים.

## ב. מרכיב הזרחה



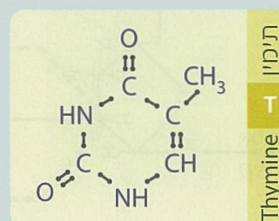
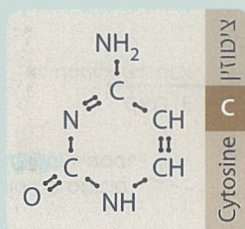
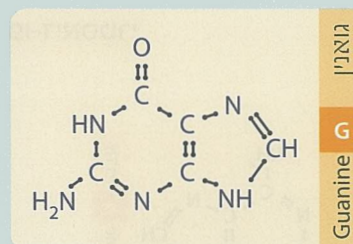
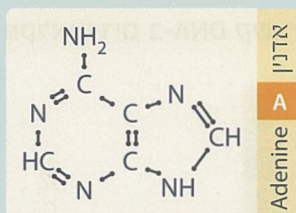
קב' זרחה  
(קב' פוספט)

## א. המרכיב הסוכרי



דאוקסי-ריבוז

## ג. מרכיב הבסיס החנקני: ב-DNA 4 בסיסים חנקניים

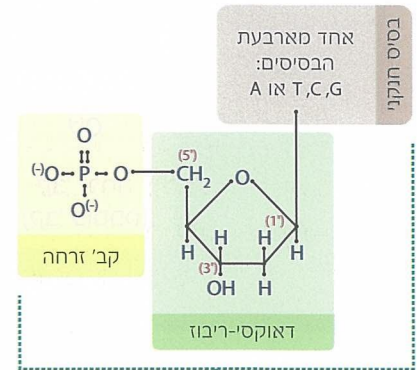


## איור 1.1: מבנה שלושת מרכיבי ה-DNA: הסוכר, קבוצת הזרחה והבסיסים החנקניים.

- א. לסוכר הדאוקסי-ריבוז 5 פחמנים המסומנים 5'-1'. "דאוקסי" מצוין היעדר קבוצת הידרוקסיל (OH) בפחמן שסימונו 2'.  
 ב. קבוצת הזרחה, שהיא חומצה זרחתית, מקנה ל-DNA את מטענו השלילי ואת חומציותו ולכן את שיוכו לקבוצת "חומצות הגרעין". תפקידה של קבוצת הזרחה ב-DNA הוא, בין היתר, לקשר בין שני סוכרים סמוכים.  
 ג. ב-DNA ארבעה בסיסים חנקניים. לבסיסים G ו-A 2 טבעות חנקניות, והם משתייכים לתת-קבוצת הפורנים (Purine). לעומת זאת, לבסיסים החנקניים C ו-T טבעת חנקנית אחת, והם משתייכים לתת-קבוצת הפירימידינים (Pyrimidine). כל בסיס חנקני ב-DNA מנצל אטום חנקן אחד שלו לצורך קישור לדאוקסי-ריבוז דרך פחמן 1' בסוכר.

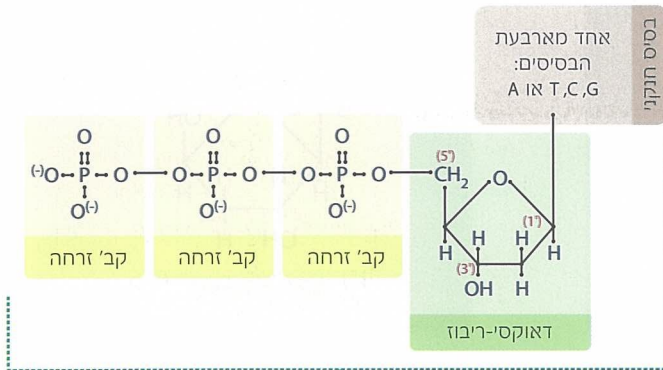
הסוכר, קבוצת הזרחה ואחד מהבסיסים החנקניים מתקבצים ליחידה הנקראת **נוקלאוטיד** והחוזרת על עצמה ב-DNA מספר רב של פעמים (איור 1.2). באיור 1.2 מתואר נוקלאוטיד המיועד לשיבוץ ב-DNA ולידו מתואר מבנה נוקלאוטיד המשוייך ב-DNA.

**א. הרכב ומבנה נוקלאוטיד המצוי כיחידה ב-DNA**



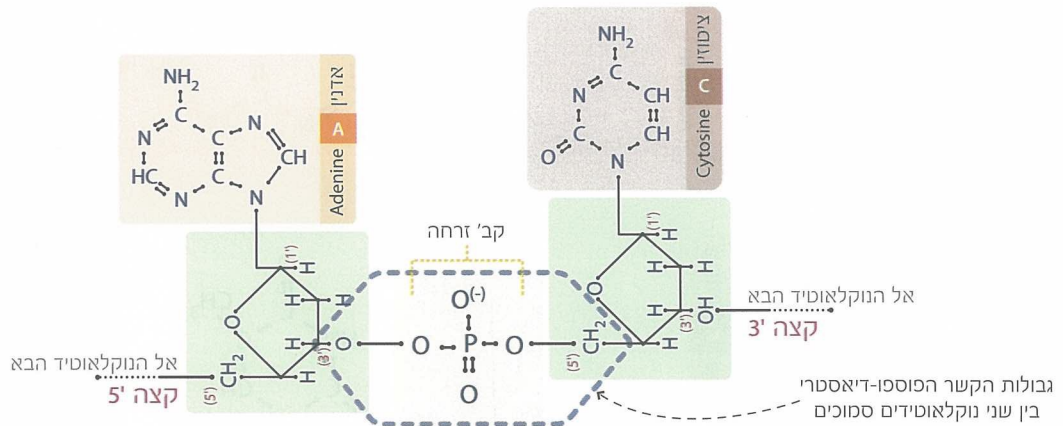
נוקלאוטיד חד-זרחה  
deoxy-Nucleotid Mono-Phosphate (dNMP)

**ב. הרכב ומבנה נוקלאוטיד חופשי לפני השיבוץ ב-DNA**



נוקלאוטיד תלת-זרחה  
deoxy-Nucleotid Tri-Phosphate (dNTP)

**ג. כל שני נוקלאוטידים ב-DNA קשורים ביניהם בקשר פוספו-דיאסטרי**



**איור 1.2: הנוקלאוטיד והקשר הפוספו-דיאסטרי בין שני נוקלאוטידים ב-DNA.**

היחידה הבסיסית החוזרת על עצמה מספר רב של פעמים ב-DNA נקראת נוקלאוטיד. בנוקלאוטיד בודד המצוי ב-DNA יש בסיס חנקני הקשור לסוכר הדאוקסי-ריבוז, והסוכר קשור לקבוצת זרחה אחת (חלק א' של האיור). ב-DNA ארבעה סוגי נוקלאוטידים הנבדלים רק בזוהות הבסיסים החנקניים שבהם. לנוקלאוטידים חופשיים, המיועדים לשיבוץ ב-DNA, יש 3 קבוצות זרחה (חלק ב' של האיור).

שם הכללי של הנוקלאוטידים החופשיים הוא dNTP. קיימים ארבעה סוגי dNTP חופשיים המיועדים לשיבוץ ב-DNA, וכל אחד מהם הוא בעלי אחד מארבעת הבסיסים החנקניים. ארבעת הנוקלאוטידים החופשיים הם: dATP, dTTP, dCTP, dGTP. אפשר לנות נוקלאוטידים אלה בקצרה A, T, C, G. נוקלאוטיד חופשי שמיועד לשיבוץ ב-DNA יאבד עם שיבוץ ב-DNA שתי קבוצות זרחה.

בחלק ג' של האיור ניתן לראות כיצד כל שני נוקלאוטידים ב-DNA מחוברים ביניהם באמצעות קשר פוספו-דיאסטרי. קבוצת הזרחה היא לבו של הקשר הפוספו-דיאסטרי. קשר פוספו-דיאסטרי משתרע מפחמן 3' של סוכר אחד ועד פחמן 5' של סוכר בנוקלאוטיד סמוך. קשרים פוספו-דיאסטריים עוקבים בין נוקלאוטידים מאפשרים יצירת המבנה הפולימרי של ה-DNA.

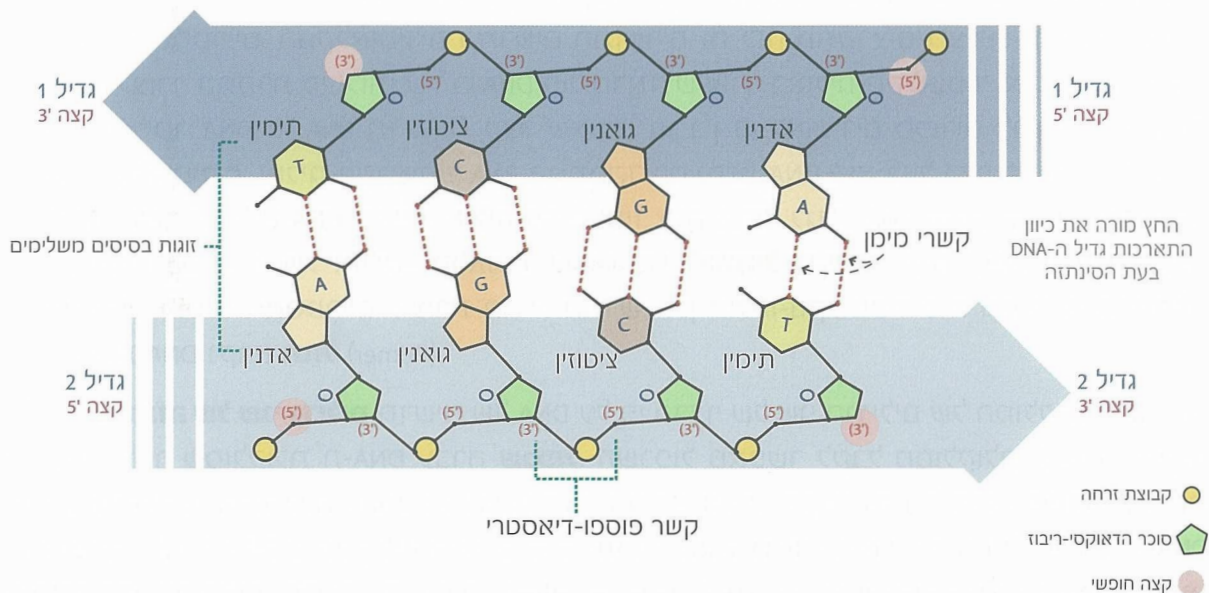
בסוכר הדאוקסי-ריבוז 5 אטומי פחמן הממוספרים מ-1' ל-5' (איור 1.1). אטומי הפחמן 3' ו-5' הממוקמים בסוכרים סמוכים ב-DNA משתתפים בקשר הפוספו-דיאסטרי שבמרכזו קבוצת זרחה. קשר זה קושר נוקלאוטידים שכנים זה לזה (איור 1.2). כמתואר באיור 1.3, מולקולת ה-DNA בנויה משני גדילים פולימריים, והבסיסים ב-DNA מסודרים בזוגות: A-T ו-C-G. באיור 1.3 מתוארים גם קצוות 3' ו-5' של כל גדיל DNA.

5. **הנוקלאוטידים שב-DNA קשורים זה לזה באמצעות קשר פוספו-דיאסטרי ויצרים "גדיל" (Strand) פולימרי.** הקשר הפוספו-דיאסטרי בין נוקלאוטידים (איור 1.2ג') נוצר בין קבוצת הזרחה של הנוקלאוטיד המתווסף (איור 1.2ב') ובין הסוכר הנוכח בקצה הקיים של ה-DNA (קצה 3' באיור 1.3). גבולות הקשר הפוספו-דיאסטרי (איור 1.2ג') הם פחמן 3' של הסוכר בנוקלאוטיד אחד ופחמן 5' שבנוקלאוטיד הסמוך כשבמרכזו של הקשר מצויה קבוצת זרחה.

6. **מולקולת ה-DNA בנויה משני גדילים פולימריים, והבסיסים ב-DNA מסודרים בזוגות.** כמתואר באיור 1.3, ה-DNA הוא מולקולה דו-גדילית. כל בסיס שמקורו בגדיל אחד ממוקם מול בסיס שמקורו בגדיל השני, ומכאן שהבסיסים מסתדרים בזוגות. כמתואר באיור 1.3, זוגות הבסיסים נצמדים זה לזה באמצעות קשרי מימן בחוקיות מוגדרת: A נצמד תמיד ל-T שממוקם בדיוק מולו, ו-G נצמד תמיד ל-C משלים מולו. לפיכך מתקיים הכלל ש-T משלים ל-A ו-C משלים ל-G.

□ ככלל, מבנה ה-DNA ויציבותו כמעט ואינם מושפעים מרצף הבסיסים שבו. עם זאת, אזורים ב-DNA שבהם ייצוג יחסי גבוה לזוג הבסיסים G-C, נחשבים ליציבים יותר מאזורים עשירי A-T. הסיבה לכך היא כי בעוד שבין G ל-C יש שלושה קשרי מימן, את הזוג A-T מייצבים רק שני קשרי מימן.

7. **רצף הבסיסים בגדיל אחד מנתיב את רצף הבסיסים בגדיל האחר.** כיוון שבסיסים מסוים בגדיל אחד נצמד לבסיס מסוים מולו בגדיל השני, אומרים על בסיסים אלה שהם משלימים זה את זה. לכן כלל רצף הבסיסים בגדיל אחד **משלים** לרצף הבסיסים בגדיל האחר.



**איור 1.3: מולקולת ה-DNA היא מולקולה דו-גדילית, והגדילים קשורים ביניהם בקשרי מימן.**

מולקולת ה-DNA בנויה משני גדילים פולימריים. מראה שני הגדילים באיור זה הוא כשל משטח פתוח וזאת לצורכי המחשה בלבד. כל גדיל הוא פולימר של נוקלאוטידים. הנוקלאוטיד הוא היחידה הבסיסית המונומרית החוזרת על עצמה בפולימר. כל בסיס בגדיל אחד קשור בקשרי מימן עם הבסיס המשלים המצוי בגדיל השני מולו, לפי הכלל ש-A נקשר ל-T ובאופן דומה G נקשר ל-C. כך למעשה זוגות הבסיסים A-T ו-G-C מאפשרים קישור של גדיל אחד לשני בקשרי מימן. הכיוונית של כל גדיל נקבעת על פי זהות אטומי הפחמן החופשיים של הסוכר המצוי בקצוות הגדיל ("קצה חופשי"). אטומי הפחמן שאליהם מתייחסים הם תמיד בעמדה 3' או בעמדה 5' של הסוכר. כיוונית גדיל אחד מונגדת לכיוונית הגדיל השני: האחד הוא תמיד 5' → 3', ואילו השני הוא תמיד 3' → 5'.

7 על פי ההגדרה, כל בסיס הנצמד לאחר, אומרים כי הוא משלים לו. כך לדוגמה, A נצמד ל-T באמצעות קשרי מימן, ולכן מתארים את A כ**משלים** ל-T, ובאופן דומה מתארים גם את זוג הבסיסים C-G. למעשה, רצף הבסיסים בגדיל אחד מנתיב את רצף הבסיסים בגדיל האחר. בשל כך נהוג לומר כי רצף הבסיסים בגדיל אחד של ה-DNA **משלים** לרצף הבסיסים בגדיל האחר של ה-DNA.

8. **המבנה המרחבי של ה-DNA הוא כשל סליל כפול.** פענוח המבנה המרחבי התלת-קומדי של

ה-DNA על ידי ווטסון וקריק אפשר להם לקבוע כי שני גדילי ה-DNA אחוזים זה בזה כשהם מפותלים. כמותואר באיור 1.4, מבנה ה-DNA מזכיר סליל לולייני ("הליקס") כפול ולכן ה-DNA נקרא בשם החיבה "הסליל הלולייני הכפול" (The double helix) או בקיצור "הסליל הכפול".

9. **שכפול ה-DNA בתא נחוץ להורשת המידע התורשתי לתאי**

**הבת.** מולקולת ה-DNA אוצרת בתוכה את המידע הנחוץ לשכפול שלה, כלומר ליצירת עותק שני שלה. שכפול ה-DNA בתא מצריך סינתזה של שני גדילי DNA חדשים. **בשכפול DNA כל גדיל קיים משמש לסינתזה גדיל חדש.**

הסינתזה מצריכה בראש ובראשונה אנזימים המפרידים את גדילי ה-DNA (דוגמת ההליקז) ואת האנזים DNA פולימראז.

10. **האנזים DNA פולימראז הוא האחראי הראשי לסינתזה גדילי ה-DNA החדשים.** השכפול של

ה-DNA (סינתזה שני גדילים חדשים) מתאפשר לאחר הפרדת הגדילים. כפי שגילה ארתור קורנברג (A. Kornberg) חתן פרס נובל, האנזים DNA פולימראז מאפשר להציב מול כל נוקלאוטיד המצוי בגדיל קיים נוקלאוטיד חדש המשלים לו ולקשור בין הנוקלאוטידים החדשים באמצעות קשרים פוספו-דיאסטרניים. הנוקלאוטידים החדשים הנקשרים זה לזה מתקבצים ליצירת גדיל DNA חדש. אולם לצורך התחלת פעילותו של ה-DNA פולימראז יש צורך באוליגו-נוקלאוטיד. הוא פולימר DNA או RNA חד-גדילי קצר שאורכו נע בין נוקלאוטידים ספורים לבין כמה עשרות של נוקלאוטידים. אוליגו-נוקלאוטיד RNA המתפקד בסינתזה DNA הוא בעל רצף בסיסים המשלים לרצף קצר בגדיל ה-DNA הקיים. אוליגו-נוקלאוטיד כזה נצמד לגדיל DNA קיים. ה-DNA פולימראז משתמש בקצה 3' של אוליגו-נוקלאוטיד שכזה כדי **להתחיל** בקישור הנוקלאוטידים המשלימים בקשרים פוספו-דיאסטרניים ליצירת הגדיל החדש. לכן אוליגו-נוקלאוטיד כזה המשמש להתחלת סינתזה DNA נקרא **תחיל** (Primer).

לאחר **סינתזה של שני גדילים** חדשים של DNA על פי הרצף של שני הגדילים של המולקולה הקיימת, נכון יהיה לומר שמולקולת ה-DNA עברה **שכפול**. השכפול מאפשר לקבל כמולקולת DNA דו-גדילית אחת 2 מולקולות דו-גדיליות זהות. כל מולקולה כזו בנויה מגדיל מקורי ומגדיל חדש. במהלך חלוקת התא (מיטוזה), כל אחת ממולקולות ה-DNA הללו תעבור לאחד משני התאים שיתקבלו. שכפול ה-DNA מאפשר להעביר באופן מדויק את המידע התורשתי מתא לתא. כמו כן שכפול ה-DNA מאפשר לתאי המין להעביר מדור לדור עותק אחד של המידע התורשתי, ובכלל זה את הגנים שבו, לאחר חלוקת הפחתה (מיטוזה).

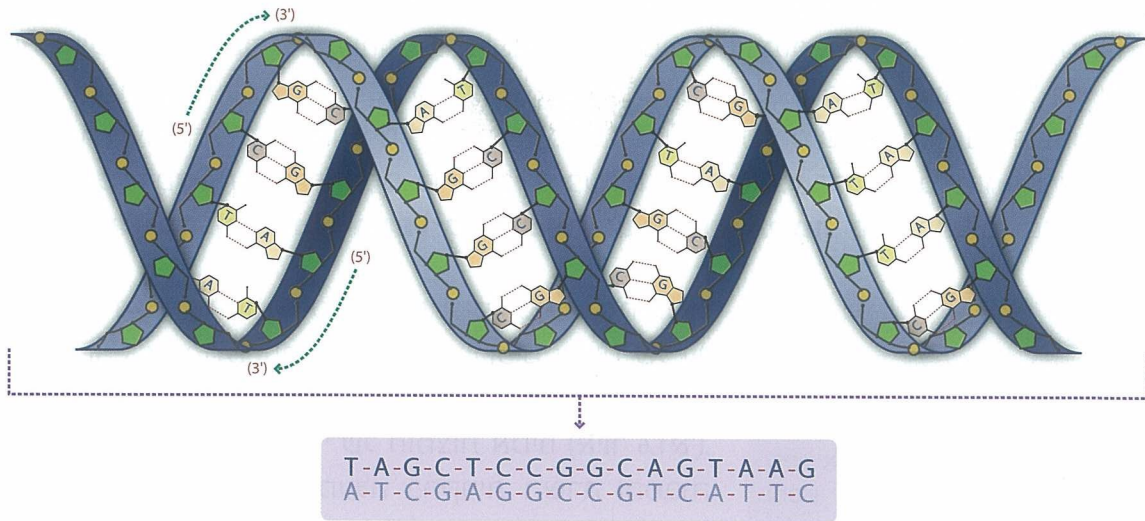
שכפול ה-DNA יכול להסביר את דרך הורשת התכונות, אך אין הוא מסביר מדוע פרטים שונים זה מזה בתכונותיהם. הפרטים שונים בתכונותיהם בראש ובראשונה כי יש להם גרסאות שונות של גנים. מכיוון שהגנים הם מקטעים מוגדרים ב-DNA, נשאלת השאלה כיצד הגנים המצויים ב-DNA מספקים "מידע" לקביעת התכונות. בנוסף חשוב להבין כיצד מאורגן "המידע" וכיצד התא "קורא" ו"מתרגם" את המידע שבגנים.

□ מבנה הסליל הכפול חזק די הצורך כדי להבטיח לאורך זמן את שלמות המולקולה בעלת שני הגדילים. עם זה, בעיתוי הרצוי גדילי ה-DNA יכולים להיפרד זה מזה לצורך שכפול ה-DNA או לצורך ביטוי גנים, כפי שיוסבר בהמשך הפרק.

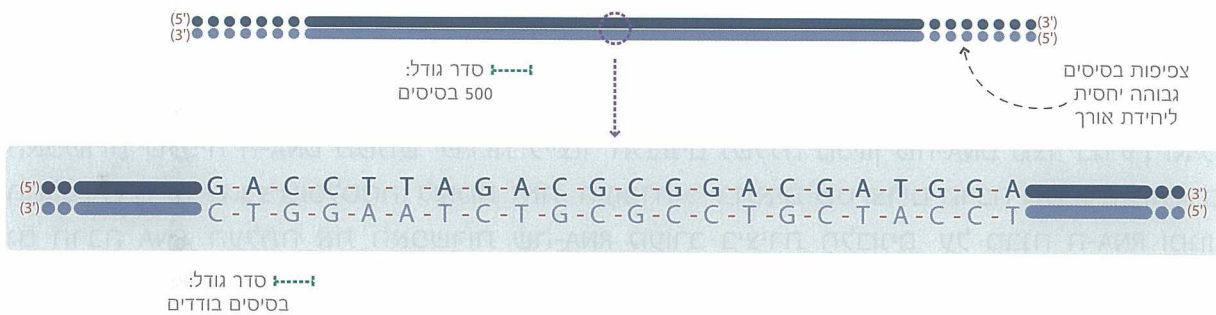
□ השכפול של ה-DNA הוא שלב חיוני לפני חלוקת התא והוא מאפשר לתא להוריש את מלוא המידע התורשתי לשני תאי הבת שיווצרו.



א. המבנה המרחבי של ה-DNA הוא כשל סליל כפול



ב. צורות סכמטיות להצגת ה-DNA כפי שהן מופיעות בספר זה



ג. צורות להצגת DNA חד-גדילי דוּגמת האוליגו-נוקלאוטיד

A-T-C-G-A-G-G    או    —    או    —

**איור 1.4: הצגת ה-DNA - מראה הסליל הכפול וצורות סכמטיות כפי שהן מופיעות בספר זה.**

א. מודל מרחבי של ה-DNA כפי שפנחנו והציגו ווטסון וקריק. גדילי ה-DNA מפותלים ואחוזים זה בזה הודות לקשרי המימן שבין זוגות הבסיסים.

ב: צורות גרפיות שעוצבו במיוחד עבור ספר זה כדי לתאר בדרך סכמטית ומקוצרת DNA דו-גדילי ו-DNA חד-גדילי. קנה המידה שונה מאיור אחד בספר לאיור אחר וגם באיור מסוים עשוי קנה המידה להשתנות לפי הצרכים. נקודות מציינות צפיפות בסיסים גבוהה ליחידת אורך בהשוואה לקו רציף. אוליגו-נוקלאוטיד הוא DNA חד-גדילי פולימרי שיש לו תפקידים בשכפול DNA במבחנה וכן תפקידים בתהליכי איתור (גילוי) חומצות גרעין (פרקים 6-7).

## המסלול מ-DNA לחלבון והקוד הגנטי

עד כה הושם דגש על העובדה כי לפרטים שונים של אותו אורגניזם עשויות להיות תכונות שונות. אבל שונות אפשר למצוא אפילו בתכונותיהם של תאים מסוגים שונים בתוך אותו פרט עצמו. כך, מאיור 1.11 אפשר להתרשם כי לתאי דם, תא עצב ותא אנדותל מראה שונה. המראה השונה של תאים אלה משקף את העובדה כי לסוגי התאים השונים של פרט מסוים יש תכונות שונות. התכונות השונות מקנות לתאים יכולת למלא תפקידים שונים. כדי להבין תופעה זו יש להכיר בעובדה כי בכל סוג תא יש חלבונים "יחודיים". **החלבונים הם "אחראיים ישירים" המשתתפים בקביעת תכונות.** מה הם החלבונים?

□ נהוג לומר שה-DNA מכיל גנים שהם מעין "קבצים של תכניות" המשפיעות על התכונות והתפקידים של התא. את החלבונים, לעומת זאת, מכנים "סוסי העבודה" של התא שמוציאים לפועל את "הוראות ה-DNA" ומכאן חשיבותם של החלבונים בקביעת התכונות.

חלבונים הם מולקולות פולימריות המורכבות מחומצות אמינו (איור 1.5). החלבונים מורכבים מצירופים שונים של 20 סוגי חומצות אמינו הנקשרות זו לזו בקשרים פפטידיים ליצירת החלבון. לכל חלבון רצף ייחודי של חומצות אמינו (איור 1.6א'), שיש לו חשיבות ראשונה במעלה בהקניית הצורה והמבנה המרחבי הייחודיים לו (איור 1.6ב'). המבנים השונים של החלבונים השונים מאפשרים להם לבצע תגובות כימיות שונות המשתתפות בקביעת תכונות התא ותפקודו.

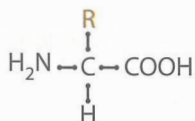
כאמור, ה-DNA מכתוב תכונות (כפי שהומחש לראשונה בניסיון של אברי ועמיתיו), והוא גם החומר התורשתי, ואילו החלבונים משתתפים בקביעת תכונות, אך הם אינם החומר התורשתי. לפיכך הועלתה ההשערה בשנות ה-50 של המאה ה-20 כי ה-DNA מכיל את הקוד ליצירת החלבונים. האפשרות שלפיה ה-DNA משמש ישירות לייצור חלבונים נשללה מכיוון שה-DNA מצוי בגרעין ואילו החלבונים מיוצרים בציטופלסמה. לעומת זאת, העובדה כי בתאים שמייצרים הרבה חלבונים מוצאים גם הרבה RNA, העלתה את האפשרות שה-RNA מעורב ביצירת חלבונים. על מבנה ה-RNA ומגוון צורתיו ראו איור 1.7. ההשערה הממוקדת הייתה כי ה-RNA יכול לשמש כעין "שליח" המעביר מידע מה-DNA הממוקם בגרעין לצורך ייצור החלבונים בציטופלסמה.

□ שלא כ-DNA, מולקולות RNA שונות הן מטבען בעלות מבנה שאינו אחיד. ישנם מקרים שבהם רצף הנוקלאוטידים במולקולת RNA מסוימת מאפשר יצירתם של זוגות בסיסים משלימים תוך מולקולריים. במקרים כגון אלה נוצרים אזורים דו-גדיליים במולקולת ה-RNA וה-RNA המסוים שמתקבל הוא בעל מבנה מוגדר ויציב יחסית.

השערה זו זכתה לחיזוק כאשר נמצא בשנת 1959 האנזים **RNA פולימראז**. אנזים זה מסוגל לייצר RNA על פי רצף הבסיסים ב-DNA. תהליך ייצור RNA מ-DNA על ידי האנזים RNA פולימראז נקרא **"תעתוק"** (Transcription). במהלך התעתוק האנזים RNA פולימראז מציב מול כל נוקלאוטיד ב-DNA נוקלאוטיד משלים (של RNA) וקושר את סדרת הנוקלאוטידים החדשים הללו זה לזה באמצעות קשרים פוספו-דיאסטריים לקבלת מולקולת RNA. האנזים מנצל רק גדיל אחד של DNA כ"תבנית" כדי לסנתז RNA חד-גדילי.

הגנים הם מקטעים מוגדרים של DNA. נשאלת השאלה כיצד הגנים המצויים ב-DNA מספקים "מידע" המשמש לקביעת התכונות של התא וגם לאלה של האורגניזם. כדי להבין זאת, יש להכיר בעובדה כי בכל סוג תא ישנם חלבונים ייחודיים לתא. למעשה, החלבונים הם "אחראים ישירים" המשתתפים בקביעת תכונות. כפי שעולה מאיור 1.5, חלבונים הם מולקולות פולימריות המורכבות מחומצות אמינו.

R הוא שייר; לכל חומצה אמינית שייר ייחודי

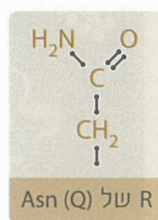
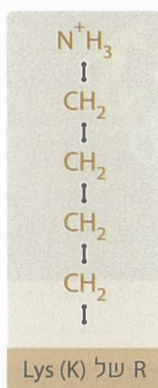
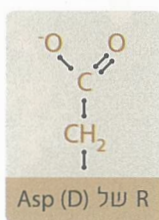


א. מבנה כללי של כל חומצות האמינו

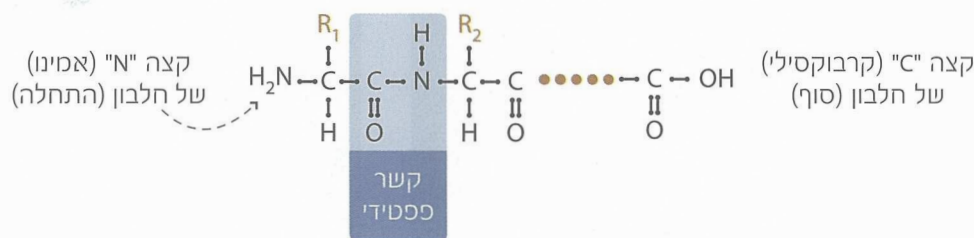
ב. סימון וסיווג של מקצת חומצות האמינו

שם:	גלוטמין	אספאגין	היסטידין	ארגינין	ליזין	חומצה גלוטמית	חומצה אספרטית
סימון:	Gln	Asn	His	Arg	Lys	Glu	Asp
סימון מקוצר:	Q	N	H	R	K	E	D
סיווג:	R עם קבוצה אמידית	R עם קבוצה אמידית	H	R בסיסי	K	R חומצי	D

ג. שיירים ייחודיים ("R") של חומצות אמינו לדוגמה



ד. החלבון והקשר הפפטידי בין שתי חומצות אמינו



**איור 1.5: חומצות האמינו הן "אבני הבניין" (היחידות המונומריות) של החלבונים.**

חלבונים מורכבים מ-20 סוגים שונים של יחידות מונומריות הקרויות חומצות אמינו, בכל מיני צירופים. בחלק הקבוע של כל חומצה אמינית יש קבוצה קרבוקסילית (COOH) וקבוצה אמינית (NH2). קבוצות אלה משתתפות ביצירת הקשר הפפטידי בין כל שתי חומצות אמינו בחלבון. לכל חומצה אמינית יש שייר כימי ייחודי ("R") המקנה לחומצה האמינית את תכונותיה המיוחדות. חומצות האמינו נחלקות לתת-קבוצות על פי אופי השייר הייחודי (חומציות, בסיסיות, לא-טעונות, הידרופוביות ועוד). הקשר הפפטידי בין 2 חומצות אמינו הוא קשר קוולנטי המתפרק בתא רק בנוכחות אנזימים מיוחדים.

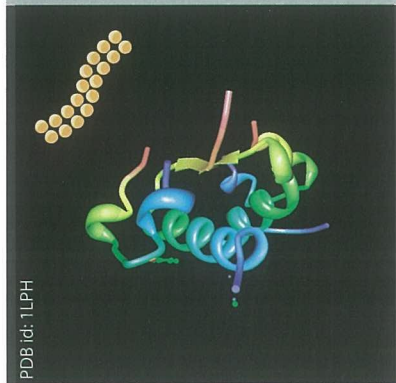
חלבונים מורכבים מצירופים שונים של 20 סוגי חומצות אמינו הנקשרות זו לזו בקשרים פפטידיים ליצירת החלבון. איור 1.6 א' ממחיש כי לכל חלבון יש רצף ייחודי של חומצות אמינו. לרצף הייחודי של החלבון יש חשיבות ראשונה במעלה בהקניית הצורה והמבנה המרחבי הייחודיים לו (איור 1.6). המבנים השונים של החלבונים השונים מאפשרים להם לבצע תגובות כימיות שונות המשתתפות בקביעת תכונות התא, ובכלל זה צורתו.

## א. כל חלבון מורכב מרצף ייחודי של חומצות אמינו

1. תת-יחידה  $\alpha$  של חלבון ההמוגלובין  
141 חומצות אמינו  
V-L-S-P-A-D-K-T-N-V-K-A-A-W●●●●
2. שרשרת A של חלבון האינסולין  
21 חומצות אמינו  
G-I-V-E-Q-C-C-T-S-I-C-S-L-Y●●
3. החלבון Ras  
189 חומצות אמינו  
M-T-E-Y-K-L-V-V-V-G-A-G-G-V●●●●
4. החלבון p53  
393 חומצות אמינו  
M-E-E-P-Q-S-D-P-S-V-E-P-P-L●●●●●●

## ב. לכל חלבון מבנה מרחבי ייחודי המכתיב את תפקודו הייחודי

2. האינסולין הפעיל (שרשרות A+B)



בין יתר תפקידיו, האינסולין מאפשר ויסות רמת הגלוקוז בדם

הצבעים השונים במודל המרחבי של החלבונים מציינים צורות קיפול שונות ואזורים מיוחדים בחלבון.

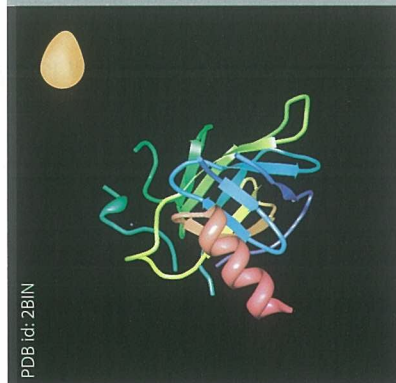
התמונות באדיבות  
Protein Data Bank  
www.pdb.org

1. המוגלובין (4 תת יחידות)



ההמוגלובין מצוי בכדוריות הדם האדומות והוא נושא חמצן

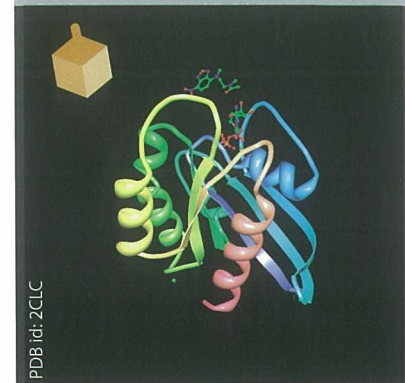
4. p53 (אזור קושר DNA)



p53 הוא חלבון גורם תעתוק בעל תפקיד במניעת סרטן

משמאל לכל מודל חלבוני מצויה הצורה הסכמטית שנבחרה מטעמי נוחות לתאר את החלבון. הצורות הסכמטיות הן שרירותיות ועוצבו במיוחד לספר זה.

3. Ras כשהוא קשור לנוקלאוטיד GTP



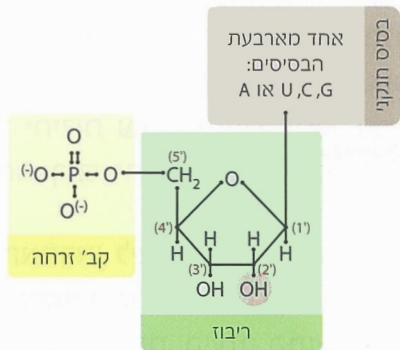
Ras מעודד חלוקת תאים

## איור 1.6: רצף חומצות האמינו הייחודי לכל חלבון מכתוב את המבנה המרחבי הייחודי שלו.

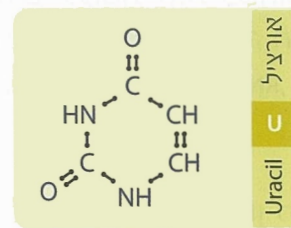
העובדה כי בחלבונים יש צירופים שונים של 20 חומצות אמינו, מתבטאת בשוני עצום בין החלבונים השונים. יש חלבונים שאורכם כמה עשרות חומצות אמינו, ואילו אורכם של חלבונים אחרים עשוי להיות מעל ל-1000 חומצות אמינו. רצף חומצות האמינו בחלבונים שונים (חלק א' של האיור) הוא גורם חשוב בקביעת מבנהו המרחבי של החלבון (חלק ב' של האיור). המבנה הייחודי לכל חלבון מאפשר לו למלא בתא או מחוצה לו תפקיד ייחודי רק לו.

בשנות ה-50 של המאה ה-20 הוכח כי ה-DNA מכיל את המידע (הקוד) ליצירת החלבונים. לצורך יצירת חלבון על פי המידע שב-DNA יש צורך ב-RNA. בהיותו חומצת גרעין, ה-RNA בנוי אף הוא מנוקלאוטידים, אך במקום הבסיס תימין (T) מצוי בו הבסיס אורציל (U) (איור 1.7). בעוד שמושבו של ה-DNA הוא בעיקר בגרעין התא, ניתן למצוא כמויות ניכרות של RNA מסוגים שונים (איור 1.7) בעיקר בציטופלזמה.

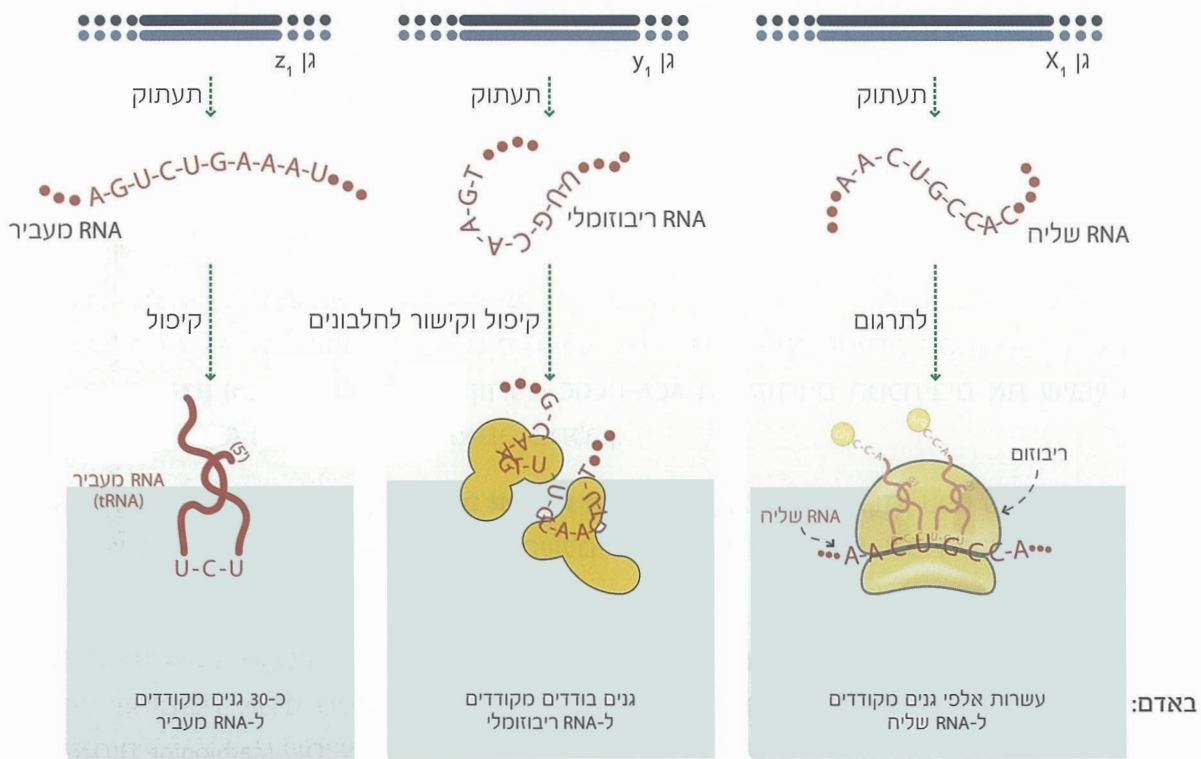
**ב. מבנה נוקלאוטיד במולקולת RNA**



**א. הבסיס החנקני אורציל (U) מצוי ב-RNA במקום תימין (T)**



**ג. RNA נוצר בתהליך התעתוק כחד-גדיל; למולקולות RNA שונות מבנים ותפקידים שונים**



כמו כן כ-30% מהגנום מקודד למולקולות RNA שיש להן תפקידי בקרה בתא והן אינן מתוארות באיור זה

**איור 1.7: הרכב, צורה ותפקוד של מולקולות RNA שונות.**

ה-RNA מורכב אף הוא מנוקלאוטידים אלא שהסוכר שבו הוא ריבוז ולא דאוקסי-ריבוז כמו ב-DNA. בעמדה 2' של הריבוז ישנה קבוצת הידרוקסיל הנעדרת מסוכר הדאוקסי-ריבוז. בנוסף, ה-RNA אינו מכיל את בסיס התימין והוא מכיל במקומו את הבסיס אורציל. ה-RNA נוצר בגרעין על ידי תעתוק שאחראי לו אנזים ה-RNA פולימראז. הוא נוצר כגדיל אחד חסר מבנה יציב. לעתים, כמו במקרה של ה-tRNA, יש בגדיל ה-RNA רצפים קצרים המשלימים זה את זה ליצירת זוגות בסיסים משלימים תוך-גדיליים שמאפשרים לגדיל ה-RNA להתקפל וליצור מבנה שיוני יציב. ה-RNA ריבוזומלי הוא דוגמה לכך ש-RNA יכול להיקשר לחלבונים. קישור שכזה נחוץ ליצירת הריבוזום.



### שאלה 1.1

1.1

לפניכם תיאור של עשרה מקטעי DNA חד-גדילי (אוליגו-נוקלאוטידים) הנמצאים בתמיסה במבחנה אחת ובטמפרטורה גבוהה. בהינתן האפשרות, כשמקררים את התמיסה, כל חד-גדיל מבין אילה המתוארים כאן ייצמד לחד-גדיל מסוים בעל רצף משלים. לאחר ההיצמדות תתקבלנה 5 מולקולות DNA דו-גדיליות.

$D_1$ : A-T-C-G-G-T-T-A       $D_9$ : T-A-C-C-C-G-T-A       $D_4$ : G-G-C-C-T-A       $D_7$ : T-A-G-C-C-A-A-T  
 $D_6$ : G-T-A-A-T-T       $D_3$ : A-T-G-G-G-C-A-T       $D_{10}$ : T-A-A-A-T-A-T-T  
 $D_2$ : C-A-T-T-A-A       $D_8$ : C-C-G-G-A-T       $D_5$ : A-T-T-T-A-T-A-A

אתרו את זוגות האוליגו-נוקלאוטידים שיש להם יכולת להיצמד היצמדות מלאה זה לזה.

### שאלה 1.2

1.2

לפניכם 3 רצפי DNA ( $D_1$ - $D_3$ ), שלושה רצפי RNA ( $R_1$ - $R_3$ ) ושלושה רצפי חלבון ( $P_1$ - $P_3$ ). כל רצף DNA מסוים מקודד לרצף RNA מסוים, וכל רצף RNA מקודד לרצף חלבון מסוים.

$D_1$ : CCA - CCG - AGG - CGT  
 GGT - GGC - TCC - GCA  
 $D_2$ : GAA - ATG - GGG - TAA  
 CTT - TAC - CCC - ATT  
 $D_3$ : TTT - TCT - TGG - CGT  
 AAA - AGA - ACC - GCA  
 $R_1$ : GAA-AUG-GGG-UAA       $R_2$ : CCA-CCG-AGG-CGU       $R_3$ : UUU-UCU-UGG-CGU  
 $P_1$ : P-P-R-R       $P_2$ : F-S-W-R       $P_3$ : E-M-G

סדרו את הרצפים בשלשות כך שבכל שלשה ימצאו רצף אחד של DNA, רצף אחד של RNA ורצף אחד של חלבון, כאשר רצף ה-DNA מקודד לרצף ה-RNA ורצף ה-RNA מקודד לרצף החלבון. היעזרו בטבלת הקוד הגנטי המצויה בחלק הפנימי של הכריכה האחורית.

### שאלה 1.3

1.3

לפניכם ארבעה רצפי DNA קצרים שמקורם באותו פרט.

$D_1$ : AGCTTGGTTGCT  
 $(3)$ TCGAACCAACGA  
 $D_2$ :  $(5)$ AGATTTCCGGCGT  
 TCTAAAGCCGCA  
 $D_3$ : ATGCCCGTAAAC  
 TACGGGCATTTG  $(5)$   
 $D_4$ : AGAATTCGGCGT  $(3)$   
 TCTTAAGCCGCA

- רק שניים מבין ארבעת הרצפים הם רצפים אלליים. מהם, לדעתכם? נמקו.
- השלימו את סימונם של קצות הגדילים השונים ( $3'$  או  $5'$ ) בכל אחד ממקטעי ה-DNA אשר באיור של שאלה זו.

## נקרונותיו ומאפייניו של תהליך סינתזת החלבון הנקרא "תרגום" (Translation) הם אלה:

1. על פי "הדוגמה המרכזית" ("The central dogma") שנוסחה על ידי פרנסיס קריק, DNA מאפשר לייצר RNA בתהליך התעתוק בגרעין ו-RNA שליוח עובר תרגום בציטופלזמה ליצירת חלבון (החלק העליון הימני באיור 1.8).

2. **ה-RNA השליח מגיע לריבוזום.** כדי שהמידע המצוי כרצף קודונים ב-RNA שליוח יעבור תרגום לרצף של חומצות אמינו בחלבון, על ה-RNA השליח להתמקם בגופיף הנקרא **ריבוזום** (Ribosome) (איור 1.8). הריבוזום הוא קומפלקס של מולקולות RNA ריבוזומלי ושל חלבונים, והוא בעל שתי תת-יחידות.

**□ "תרגום"** הוא שמו של התהליך שבו RNA שליוח, הריבוזום ו-RNA מעביר מאפשרים סינתזת חלבון, שכן רצף קודונים מתורגם לרצף חומצות אמינו. בתהליך התרגום יש למעשה תהליך של פענוח הקוד המצוי ב-RNA וזאת על ידי המרכיבים השונים הנחוצים לסינתזת חלבונים.

3. **התרגום של RNA שליוח לחלבון מצריך מספר מרכיבים** ובראש ובראשונה את ה-RNA השליח, את הריבוזום וכן מולקולות RNA קטנות הנקראות "**RNA מעביר**" (transfer RNA) או בקצרה tRNA.

4. **ה-tRNA מעביר חומצות אמינו מהציטופלזמה אל אתר הסינתזה של החלבון בריבוזום, והוא נחוץ לפענוח הקוד הגנטי שב-RNA השליח.** tRNA הוא RNA קצר שבקצה אחד

שלו קשורה חומצה אמינית, ואילו במיקום בולט מצויה שלשת בסיסים שהיא ה"**אנטי-קודון**" (איור 1.8). האנטי-קודון הוא בעל יכולת להיצמד לקודון המצוי ב-RNA שליוח, שכן בסיסים באנטי-קודון משלימים לבסיסים בקודון. ל-RNA מעביר עם אנטי קודון מסוים קשורה חומצה אמינית מסוימת.

5. **במהלך התרגום נוצר קשר פפטידי בין שתי חומצות אמינו הקשורות לשתי מולקולות tRNA הממוקמות זו ליד זו בריבוזום.** במהלך יצירת הקשר הפפטידי, מולקולת ה-tRNA הקשורה לחלבון שנוצר (איור 1.8) מתנתקת מחומצת האמינו הקשורה אליה, והיא חוזרת לציטופלזמה. ה-tRNA שנותר בריבוזום ושאליו קשור החלבון שנוצר מוסט לאחור ואל הריבוזום מגיע tRNA חדש הנושא חומצה אמינית שעתידה להיקשר לחלבון שנוצר. התהליך חוזר על עצמו מספר פעמים עד לסיומו.

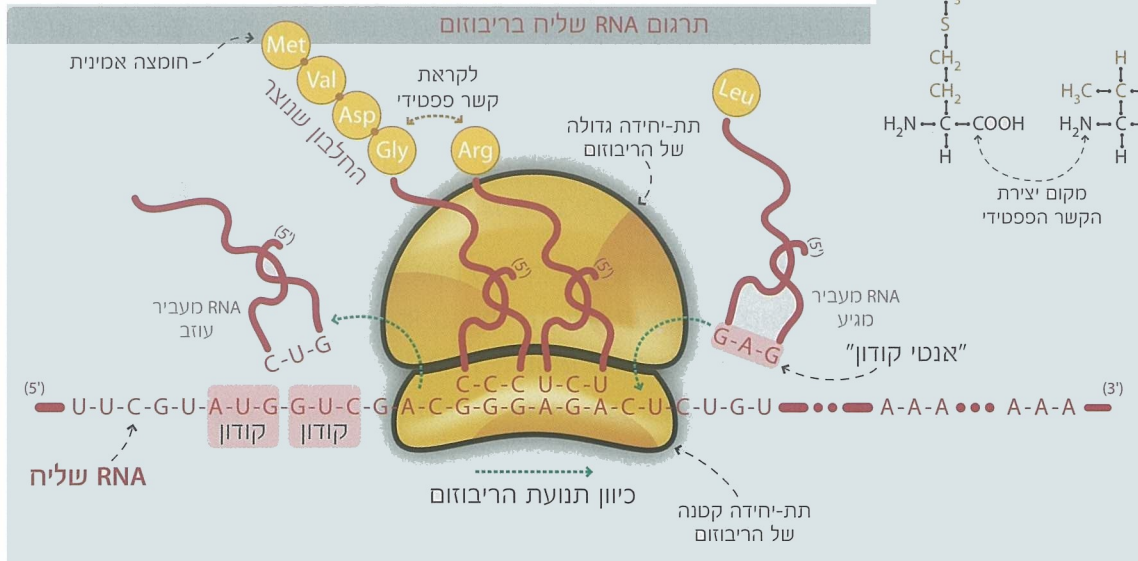
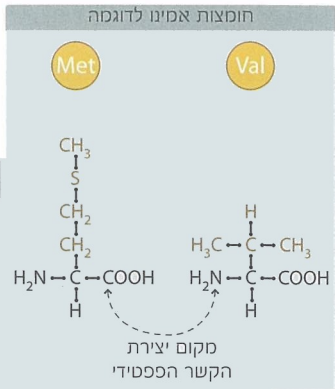
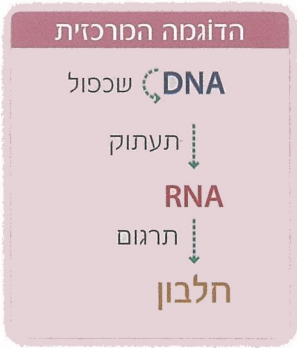
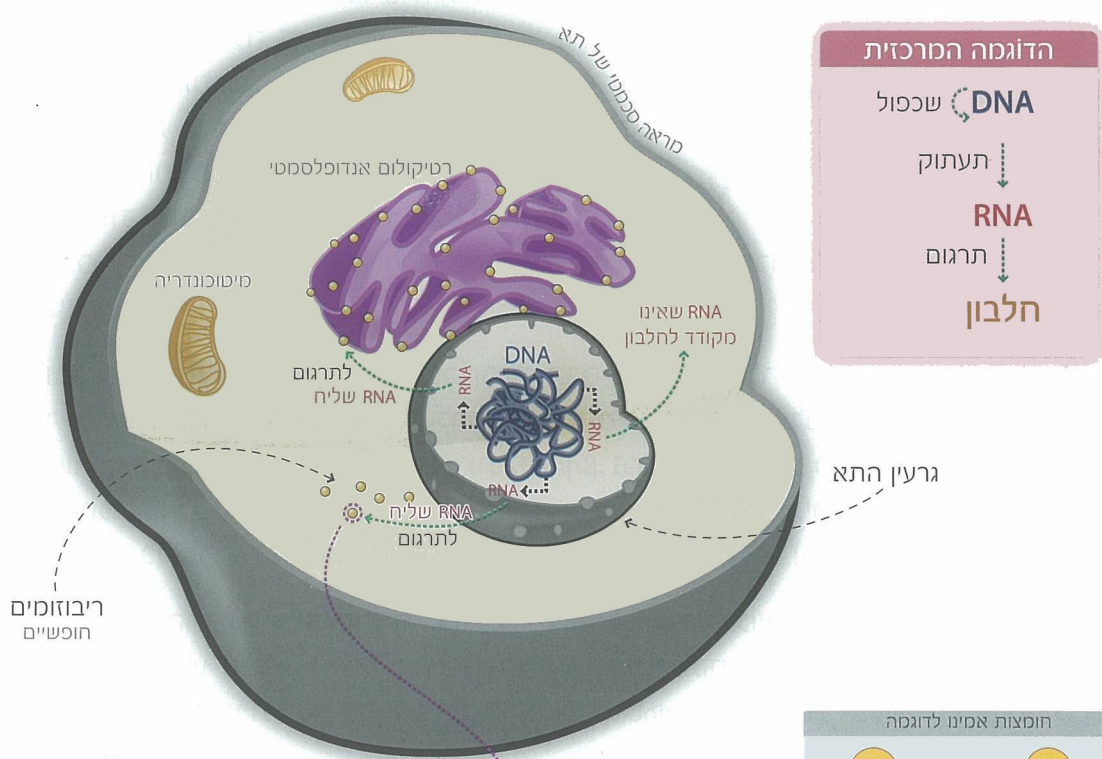
6. **תהליך התרגום מסתיים כאשר הריבוזום מגיע לקודון סיום, שהוא קודון המכתיב הפסקת תרגום.** שלושת קודוני הסיום הקיימים בקוד הגנטי הם: UAG, UAA, UGA.

## מתכונה לָגן והגרסאות של גן

הפרק נפתח בחידת מנגנון ההורשה של תכונות. כאמור, ל-DNA תפקיד מרכזי בקביעת תכונות, ושכפול ה-DNA נדרש להורשת התכונות. כפי שצוין, ה-DNA מכתוב יצירת חלבונים, ואלו נוצרים בתהליך התרגום. החלבונים מוציאים לפועל את "הוראות ה-DNA", ויש להם תפקיד פעיל בקביעת תכונות. נותרה **שאלה מערכתית** מרכזית והיא: כיצד מאפיינים ומסבירים תכונות ברמת האורגניזם, ברמת התא וגם ברמה המולקולרית? ננסה לענות על שאלה זו בעזרת הדוגמה של מחלת האנמיה החרמשית.

על פי הדוגמה המרכזית (The central dogma), DNA משמש כתבנית ליצירת RNA בתהליך התעתוק, ו-RNA שליוח משמש לסינתזת חלבון. סינתזת חלבון שנקראת גם "**תרגום**", מתרחשת בריבוזום, שם מתמקם ה-RNA שליוח. לצורך תרגום החלבון בריבוזום נחוץ גם "RNA מעביר" (tRNA). מאפייני התרגום מובאים בסעיפים 1-6 שבמעמוד זה ובאיור 1.8.





**איור 1.8: הדוגמה המרכזית ותרגום RNA שליה ליצירת חלבון.**

לצד הדוגמה המרכזית ניתן להתרשם מהאופן שבו מתקבל חלבון מ-RNA שליה (mRNA) הנוצר בגרעין והנוודד לציטופלסמה. ה-RNA השליח הוא RNA שיש בו קודונים המקודדים לחומצות אמינו. כשהוא מתמוקם בריבוזום, המידע שבו מתורגם לחלבון בעזרת מולקולות ה-tRNA (RNA מעביר) הנושאות כל אחת חומצה אמינית ייחודית על-פי האנטי-קודון הייחודי הנצמד לקודון.

מולקולות ה-tRNA משמשות להעברת חומצות אמינו מהציטופלסמה אל אתר סינתזת החלבון בריבוזום. לכל מולקולת tRNA ייחודית קשורה חומצת אמינו מסוימת, ובנוסף ממוקמת בה שלוש בסיסים ייחודיים הנקראת "אנטי-קודון". האנטי-קודון של ה-tRNA נצמד לקודון ב-RNA השליח שהוא בעל רצף משלים. תהליך הסינתזה מוסבר בסעיפים 6-5 בעמוד הקודם ובאיור 1.8.

לא תמיד התכונה העוברת בתורשה היא תכונה חיובית. כך קורה לחולים במחלת האנמיה החרמשית. לחולים במחלה זו קשיים בזמן מאמץ פיזי בשל מחסור בחמצן ברקמותיהם, והם סובלים מכאב בשל סתימות כדוריות דם אדומות מעוותות שצורתן מזכירה חרמש (איור 1.9). בשל העיוות המבני, הכדוריות אינן נושאות חמצן ביעילות הנדרשת (תכונה ברמת התא). כדוריות דם אדומות חרמשיות מעורבות בסתימת הנימים, ולכן חלק מהחולים נידונים למוות מוקדם.

□ חרמש (Sickle) הנקרא גם מגל, הוא כלי חקלאי חד לקצור תבואה שצורתו כשל ירח שפחות ממחציתו מלאה.

ההמוגלובין הוא החלבון הנפוץ ביותר בכדוריות הדם האדומות. להמוגלובין קשורה מולקולת ה־Heme, והיא מתפקדת בנשיאת חמצן לרקמות. ההמוגלובין הוא חלבון הבנוי מארבע שרשרות חלבוניות: שתי שרשרות גלובין  $\alpha$  ושתי שרשרות גלובין  $\beta$ . נמצא כי המטען החשמלי והמבנה של גלובין  $\beta$  (β-globin) שמקורו בכדוריות דם של חולים באנמיה חרמשית, אינם תקינים בהשוואה לחלבון שמקורו בפרטים בריאים. כלומר, חלבון הגלובין של החולים פגום ונחשב מוטנטי (תכונה ברמה המולקולרית).

איך מסבירים את התכונה המולקולרית המוטנטית של β-globin שנמצא בחולים? תחילתו של ההסבר הוא בעובדה כי המידע הנחוץ לייצור החלבון גלובין  $\beta$  מצוי במקטע DNA מוגדר השוכן בגרעין התא. מקטע ה-DNA הנחוץ ליצירת החלבון גלובין  $\beta$  נקרא "הגן β-globin". להגדרת המושג גן ראו תיבה 1.1.

### □ תיבה 1.1: גן (Gene).

אומרים כי גן משתתף בקביעת תכונה. כשאומרים זאת אין מתכוונים לומר שתכונה מסוימת נקבעת בהכרח על ידי גן אחד בלבד. תכונות רבות כמו תנובת החלב או גודל פרי העץ ואפילו יכולתם של צמחים להיות עמידים ליובש כמושך, הן תכונות הנקבעות על ידי יותר מגן אחד. גם תכונותיהם של התאים השונים, כגון יכולתם של תאים להתחלק ולהתרבות, לנוע וגם לנשום, הן תכונות שכל אחת מהן נקבעת על ידי גנים רבים.

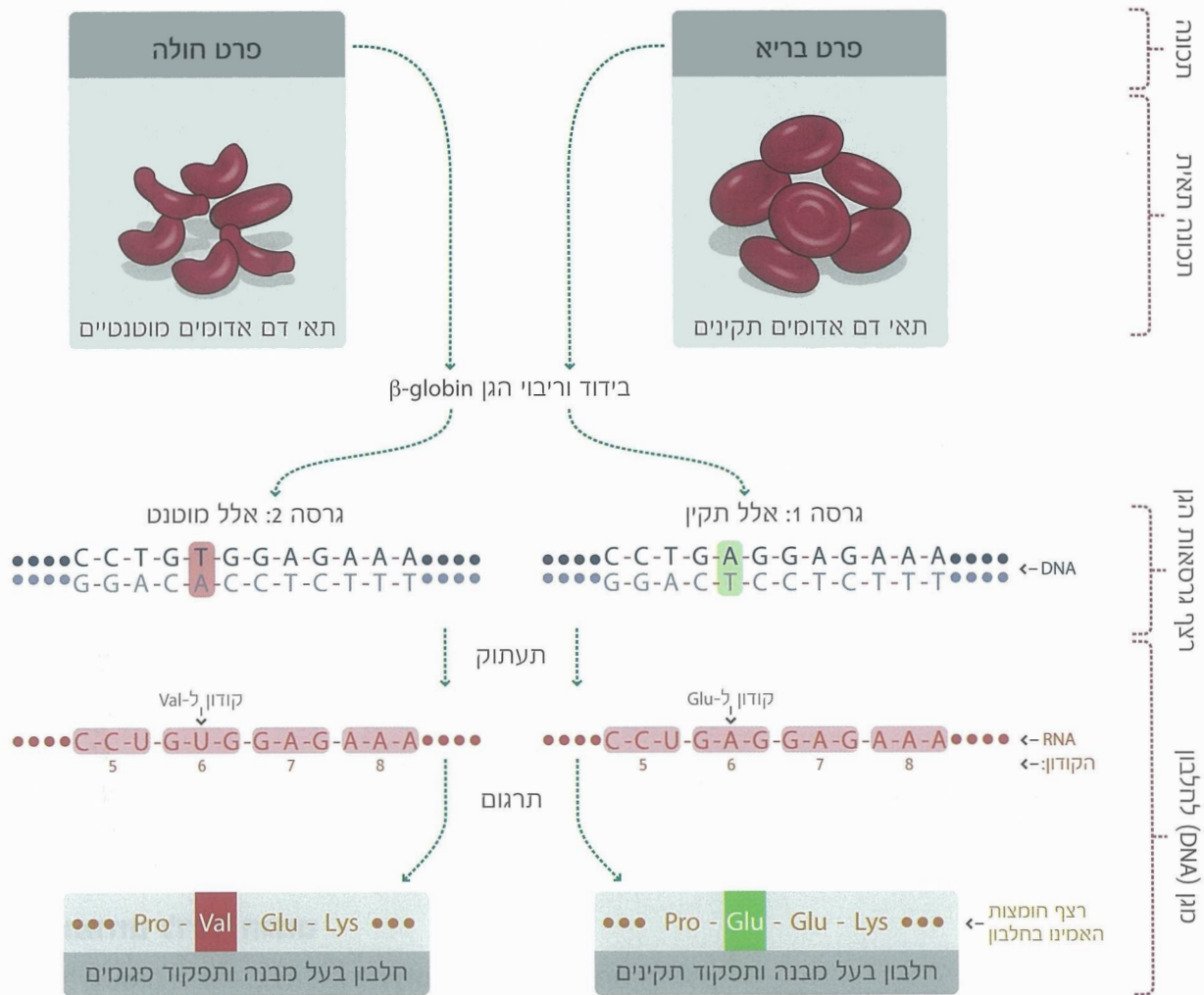
גן הוא בראש וראשונה מקטע DNA מוגדר. לכל גן רצף בסיסים ייחודי. חלק מרצף הבסיסים שבגן עובר תעתוק על ידי האנזים RNA פולימראז, ומתקבלת מולקולת RNA בעלת רצף המשלים לרצף של אחד מוגדילי ה-DNA (גדיל "התבנית"). מכאן שהתוצר הראשוני של גן הוא RNA בעל רצף בסיסים ייחודי. לכן **גן מקודד ל-RNA**, שכן המידע אודות רצף הבסיסים ב-DNA מועבר כקוד אל ה-RNA.

גנים רבים, מתוך כ-20,000 גנים באדם, עוברים תעתוק ליצירת RNA שנקרא RNA שליח (mRNA). בכל RNA שליח ישנו רצף ייחודי של קודונים המתורגם לרצף חומצות האמינו בחלבון. החלבון נחשב לתוצר השניוני של הגן, ולכן אומרים לעתים כי **גן מקודד לחלבון**. עם זאת ישנם גנים שאינם מקודדים לחלבון אלא רק ל-RNA. דוגמה לגנים שכאלה הם הגנים המקודדים ל-RNA מעביר (tRNA) ול-RNA ריבוזומלי (rRNA). מולקולות RNA אלה אינן מתורגמות, ותפקידן הוא מביני/או אנזימטי.

לסיים, ניתן להגדיר גן בקצרה כך: **"גן הוא מקטע DNA שממנו נוצר RNA"**. כדי שמקטע DNA כזה ייחשב לגן, על תוצריו שהם RNA או RNA וחלבון להשתתף בקביעת תכונה או תכונות.

ישנן תכונות שניתן להסבירן ברמת האורגניזם, ברמת התא וברמת הגן, כמו בדוגמה של מחלת האנמיה החרמשית. לחולים במחלה זו כדוריות דם אדומות שצורתן החרמשית אינה תקינה (איור 1.9). התברר כי בחולים גרסת החלבון גלובין  $\beta$  היא בעלת מבנה ותפקוד שאינם תקינים (תכונה מולקולרית). מכיוון שהתכונה הלא תקינה עוברת בתורשה, היא מכונה תכונה מוטנטית.

כדי לבדוק אם הפגם בחלבון גלובין  $\beta$  נובע מפגם בגן  $\beta$ -globin, יש לבדוד ולהרבות מקטע DNA שבו שוכן גן זה. כך בודדו החוקרים מקטע DNA ובו הגן  $\beta$ -globin שנלקח מפרט בריא וגם מפרט חולה באנמיה חרמשית. ההשערה שקדמה לבידוד הייתה שלגן שתי גרסאות: הגרסה התקינה, שאותה אפשר למצוא אצל בריאים, וגרסה מוטנטית, שאותה אפשר למצוא אצל חולים. כאמור, כל גרסה של גן נקראת **אלל** (Allele).



**איור 1.9: מתכונה לגן ולגרסאותיו: האנמיה החרמשית היא תכונה המוסברת על ידי מוטציה נקודתית בגן אחד.**

לחולים באנמיה חרמשית כדוריות דם אדומות פגומות שצורתן כשל חרמש. מכיוון שהתכונה עוברת בתורשה, הכדוריות החרמשיות הן מוטנטיות. חלבון ההמוגלובין בכדוריות מוטנטיות הוא בעל מבנה ותפקוד שאינם תקינים. כיצד נוצר החלבון המוטנט? הגן  $\beta$ -globin מקודד לשרשרת חלבנית המרכיבה את ההמוגלובין. באיור זה מוצגים רצפי הבסיסים של גרסת הגן המצויה בפרט בריא (האלל התקין) וגרסת הגן המצויה בפרט חולה (אלל מוטנט). נמצא כי בקודון 6 של הגן שמקורו בחולה ישנה מוטציה. טיבה של המוטציה הוא החלפה של A בגדיל אחד אצל הבריא (מסומן בירוק) בבסיס T המצוי בגרסה שמקורה בחולה (מסומן באדום). החלפה נקודתית כזו נקראת מוטציה נקודתית. המוטציה ב-DNA אחראית לקודון מוטנטי ב-RNA. ה-RNA המוטנטי מקודד לחלבון מוטנטי שבו החומצה האמינית שמספרה 6 היא Val במקום Glu המצויה בחלבון הנורמלי. שינוי של בסיס אחד (מוטציה נקודתית) בקודון אחד של גן אחד מספיק כדי לפגוע במבנה חלבון ההמוגלובין ובתפקודו ולהתבטא במחלה קשה.

כדי להבין את התכונה המולקולרית המוטנטית האמורה יש קודם להכיר בעובדה שהמידע לייצור החלבון גלובין  $\beta$  מצוי במקטע DNA. מקטע ה-DNA הנחוץ ליצירת החלבון גלובין  $\beta$  נקרא הגן  $\beta$ -globin. למושג **גן** (Gene) ראו תיבה 1.1. בקצרה, גן הוא מקטע DNA שממנו נוצר RNA. מן ה-RNA עשוי להיווצר חלבון שמשותף בקביעת תכונה או תכונות. ישנם גנים שה-RNA שלהם אינו מתורגם לחלבון, ו-RNA זה משותף אף הוא בקביעת תכונות.

אכן, לאחר שבודד הגן  $\beta$ -globin מכרט חולה ונקבע רצף הבסיסים שלו (בשיטות המתוארות בפרקים 3-5), נמצא כי חל בו שינוי בהשוואה לגן  $\beta$ -globin שמקורו בפרט בריא (איור 1.9). למעשה, נמצא כי בפרט החולה ובפרט הבריא קיימות גרסאות שונות, אללים שונים, של הגן. בין הגרסאות של הגן היה הבדל נקודתי בזוג בסיסים אחד. ההבדל הסתכם בהחלפה של הבסיס A המצוי בגדיל מסוים, ובעמדה מסוימת באלל התקין בבסיס T המצוי באלל המוטנטי שבודד מהחולה. שינוי של בסיס אחד, אם הוא אחראי לתכונה השונה מהתכונה הנפוצה, נקרא **מוטציה נקודתית**.

□ הגנים של פרט מסוים – למעט מקצת הגנים על כרומוזום Y – מיוצגים על-ידי שני אללים (מקורו של האחד באב ושל האחר באם). אין הכרח כי שני האללים של גן מסוים בפרט מסוים יהיו שונים זה מזה.

□ **מוטציה ב-DNA** היא שינוי ברצף הנוקלאוטידים האחראי לתכונה מוגדרת, שינוי העובר בתורשה. שינוי ברצף שאינו אחראי לתכונה חדשה או שאחראי לשינוי מזערי בתכונה קיימת, נקרא רב-צורתיות של DNA (DNA polymorphism).

המוטציה הנקודתית בגן  $\beta$ -globin שנמצאה אצל חולי אנמיה חרמשית מסבירה את השינוי המולקולרי בהמוגלובין, שינוי מבני שאחראי בסופו של דבר לתפקוד לקוי ולעיוות מבנה כדורית הדם האדומה. כמותאר באיור 1.9, לאחר התעתוק ולאחר תרגומו של RNA זה, מתקבל חלבון מוטנטי. לחלבון המוטנטי חומצה אמינית ואלין (Valine, Val) בעמדה 6 במקום החומצה האמינית גלוטמאט (Glutamic acid, Glu). כך, יש ביכולתו של שינוי בבסיס אחד לגרום לשינוי בחומצה אמינית אחת בחלבון אחד. שינוי כה זעיר (בבסיס אחד מתוך שלושה מיליארד שבגנום האדם!), יש בו כדי לגרום לשינוי עוצמתי המתבטא במחלה קשה הגורמת לעתים למוות מוקדם.

□ המוטציה הממוקדת היא זו שאפשרה להוכיח כי שניים מתפקידיו של הגן  $\beta$ -globin הם הולכת חמצן תקינה ושמירה על מבנה תקין של כדורית הדם. אולם לשני תפקידים אלה, למעשה השתי תכונות אלה, אחראיים גם גנים נוספים. גן נוסף הוא כמובן הגן המקודד לתת-היחידה השנייה של ההמוגלובין, שרשרת  $\alpha$ -globin.

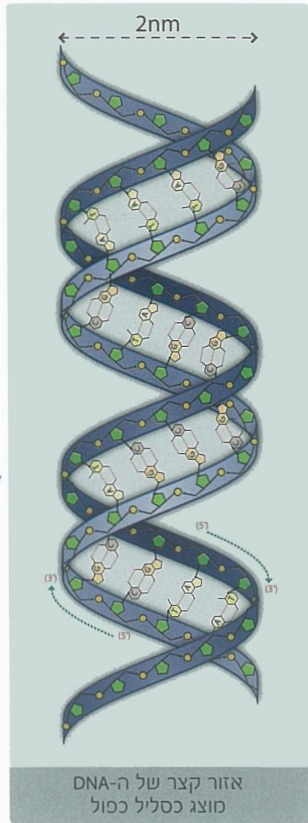
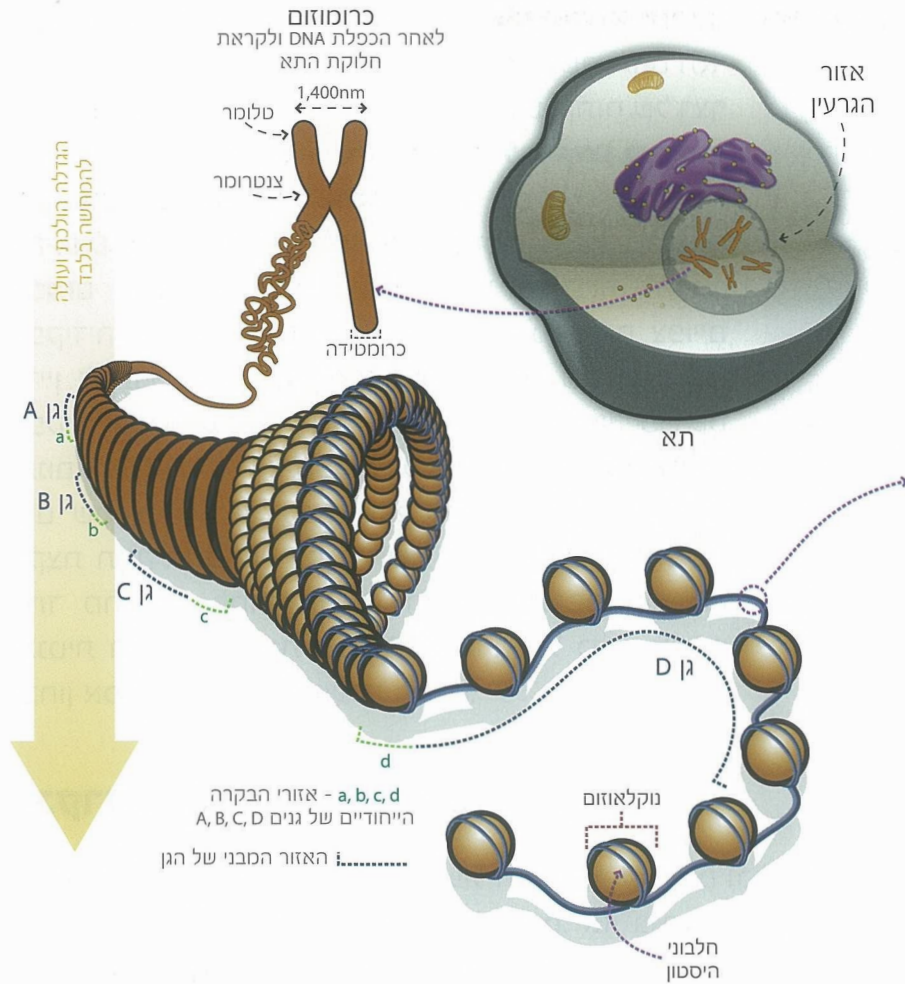
לסיום, אנמיה חרמשית היא מחלה תורשתית שנגרמת כתוצאה ממוטציה נקודתית בגן אחד, ולכן היא נקראת "מחלה חד-גנית". את הגן והמוטציה שאחראיים ל"מחלה חד-גנית" קל יחסית לאתר. אך ישנן מחלות רבות, וביניהן סוכרת, שניתן להסביר רק על-ידי שינויים בגנים רבים.

## מכרומוזום לרצף הגנום

□ בתא אדם שאינו תא מין ישנם 22 זוגות כרומוזומים ושני כרומוזומי מין (XX בנקבה או XY בזכר) ובסך הכול 46 כרומוזומים. כל כרומוזום מוכפל עם שכפול ה-DNA. עותק אחד של כרומוזום שעבר הכפלה נודד לאחד מקצות התא, והעותק האחר נודד לקצה השני וכל זאת לקראת חלוקת התא. כך מובטחת הורשה תקינה של סט של 46 כרומוזומים לכל אחד משני התאים שנוצרו לאחר החלוקה.

כלל ה-DNA המצוי בתא נקרא **גנום** (Genome). הגנום מחולק בין כרומוזומים. בתאים אאוקריוטים **הכרומוזום** (Chromosome) הוא גופיף בגרעין התא שבו מצוי חלק מהגנום, ולכן כרומוזום הוא בראש וראשונה מולקולת DNA גדולה. מלבד ה-DNA נמצאים בכרומוזום חלבונים קושרי DNA. הנפוצים בחלבוני הכרומוזום הם ההיסטונים (Histones) שתורמים לארגונו ולדחיסתו של ה-DNA לנפח הנדרש. המבנה המאורגן והדחוס של הכרומוזומים כפי שניתן לזיהוי לאחר הכפלת ה-DNA וממש לפני חלוקת התא מוצג באיור 1.10. מיד לאחר חלוקת התא נעלם המראה המאורגן של הכרומוזומים, וניתן למצוא אותם פחות דחוסים כשהם "מתפתלים" בגרעין בערבוביה כאילו היו "ספגטי".

לאחר שבודד הגן  $\beta$ -globin הן מפרט בריא והן מפרט חולה, התברר כי גרסת הגן (האלל) שנמצאה בפרט החולה הכילה שינוי בבסיס אחד במיקום מוגדר (איור 1.9). שינוי של בסיס אחד, אם הוא אחראי לתכונה השונה מהתכונה הנפוצה, נקרא **מוטציה נקודתית**. המוטציה אצל החולים מכתובה בחלבון בעל רצף חומצות אמינו שאינו תקין. החלבון המוטנטי אחראי לעיוות המולקולרי והתאי, והוא מסביר את מופע המחלה ברמת האורגניזם.



<b>בחיידק</b>	G-G-T-T- -G-C-A- A-C-G- C-A-C-G- C-G-T-C- T-A-C-C- T-A-C-C-	<b>בגנום תא אדם:</b> 46 כרומוזומים כ-3 מיליארד זוגות בסיסים (ב-24 כרומוזומים ייחודיים) כ-20,000 גנים <b>מה הם תפקידיו של כל גן וגן?</b>
<b>בצמח</b>	C-G-T-C- T-A-C-C- T-A-C-C-	

**איור 1.10: מגנום לכרומוזום ולגנים.**

כלל ה-DNA המצוי בתא נקרא גנום, והוא מתחלק בין גופיפים הנקראים כרומוזומים. ה-DNA שבכרומוזומים אינו "חופשי" והוא ארוז על ידי חלבונים קושרי-DNA. היחידה הבסיסית שבה DNA מלוכף סביב חלבוני היסטון נקראת נוקלאוזום. באיור ניתן לראות כיצד נראים הכרומוזומים לאחר שכפול ה-DNA ולפני חלוקת התא. בגרעין תא אדם שאינו תא מין ישנם 22 זוגות כרומוזומים ושני כרומוזומי מין (XX בנקבה ו-XY בזכר). 23 כרומוזומים מקורם באב וכמספר הזה מקורם באם. באדם קיימים 24 כרומוזומים ייחודיים שבהם כ-3,000,000,000 זוגות בסיסים. בגנום האדם קיימים כ-20,000 גנים. **לכל גן רצף בסיסים ייחודי.** שיוך תפקידים לגנים שרצף הבסיסים שלהם ידוע, הוא אחד האתגרים החשובים בביולוגיה.

כלל ה-DNA המצוי בתא נקרא **גנום** (Genome). הגנום מחולק בין כרומוזומים. כמתואר באיור 1.10, הכרומוזום בתאים אוקריוטים הוא גופיף בגרעין התא שבו מצוי חלק מהגנום. ה-DNA מצוי בכרומוזום ומאורגן בנוקלאוזומים. בגנום תא אדם ישנם 46 זוגות כרומוזומים, ו-24 הכרומוזומים הייחודיים שבאדם ישנם כ-3 מיליארדים של זוגות בסיסים. מספרם של הגנים בגנום האדם נאמד בכ-20,000. הגנים מפורדים על פני הכרומוזומים השונים.

במסגרת "פרויקט הגנום האנושי" נקבעו בדיוק רב יחסית מספר הבסיסים ורצף הבסיסים של גנום אנושי. נמצא כי ב-24 הכרומוזומים הייחודיים אשר בגנום תאי אדם ישנם כ- $3 \times 10^9$  (3 מיליארד) זוגות בסיסים. ניתוח של רצף הבסיסים אפשר לקבוע כי **רק חלק מכלל ה-DNA שבגרעין (רק חלק מהגנום) מכיל גנים**. כמו כן נקבע כי רק כ-3% מה-DNA שבגנום מקודד לחלבונים. בנוסף, כ-20% מה-DNA שבגנום מקודד למולקולות RNA שאינן מקודדות לחלבון. תפקידיהן של מולקולות RNA רבות שאינן מקודדות צפויים עדיין להתברר. ליתר חלקי ה-DNA שבגנום עשויים להיות תפקידי בקרה שונים. אולם הממצא החשוב של פרויקט הגנום האנושי הוא ללא ספק זה שלפיו בגנום ישנם כ-20,000 גנים שמשתרעים על פני כ-25% מהגנום. כיום ידועים רק מקצת תפקידיהם של הגנים השונים. כפי שיובהר בהמשך, אחד מהיעדים המרכזיים של המחקר מבוסס ההנדסה הגנטית הוא למצוא את תפקידי השונים של כל גן וגן כדי לבחון אפשרויות לנצלו לתועלת האדם.

□ אם "נפרום" את ה-DNA החדש בכרומוזומים של תא אדם, נמצא כי אורכו של ה-DNA הנקי מחלבונים והמצוי בתא אחד יגיע ל-2 מטרים. אם נעשה זאת לכל התאים בגוף של פרט מסוים, אורך ה-DNA הכולל של הפרט הוא כמרחק שבין כדור הארץ לירח ובחזרה!

□ קביעת רצף ה-DNA בגנום מאפשרת לדעת את סדר הנוקלאוטידים בגנום. קובעים את הרצף כדי לדעת איזה מארבעת הנוקלאוטידים המרכיבים את ה-DNA מצוי אחרי נוקלאוטיד מסוים ואיזה מהארבעה מצוי אחריו וכך הלאה. ידיעת הרצף מאפשרת, בין היתר, לאתר את מקטעי ה-DNA המקודדים לחלבון.

## הבקרה על ביטוי גנים ותוצריהם

למרות השוני בתכונות ובתפקידים של תאים אאוקריוטים (כדוגמת אלה שבאיור 1.11), יש דבר אחד המשותף לכולם: אם מקורם מאותו אורגניזם, אזי בגרעין התא שלהם נמצא אותו הרצף של DNA, ובכלל זה אותם הגנים. מכיוון שגנים משתתפים בקביעת תכונות, נשאלת השאלה כיצד מתקיים מצב שבו תאים שונים נושאים גנים זהים אולם לתאים תכונות שונות? כלומר, כמה נובעת השונות בתכונות התאים כדוגמת אלה המוצגים באיור 1.11?

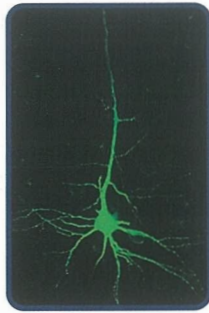
כדי להבין את מקורות השונות בין תאים, יש בראש ובראשונה להכיר בחשיבותו של תהליך התעתוק. **תעתוק** הוא תהליך מבוקר שבו נוצר RNA בעל רצף משלים לגדיל התבנית של הגן. האנזים האחראי לתהליך התעתוק נקרא **RNA פולימראז** (RNA polymerase). כשמדובר בגן מסוים, האנזים RNA פולימראז נכנס לפעולה רק בתאים מסוימים ובעיתוי המתבקש. לכן בתא נתון, במצב נתון ובזמן נתון לא נוצר RNA מכל הגנים שבתא. גנים שעוברים תעתוק על ידי ה-RNA פולימראז, ובכלל זה גנים שה-RNA שלהם יתורגם לחלבון, נקראים "גנים מתבטאים" (Expressed genes). יתרה מכך, לא רק שלא כל הגנים מתבטאים בתא נתון, אלא שבכל אחד מסוגי התאים השונים של האורגניזם מתקיים **דגם ביטוי גנים**

□ **גן מתבטא** הוא גן שעובר תעתוק, כלומר, גן שנוצר ממנו RNA. כשה-RNA מתורגם לחלבון, פירושו של דבר שגן מסוים מתבטא ברמת ה-RNA וברמת החלבון.

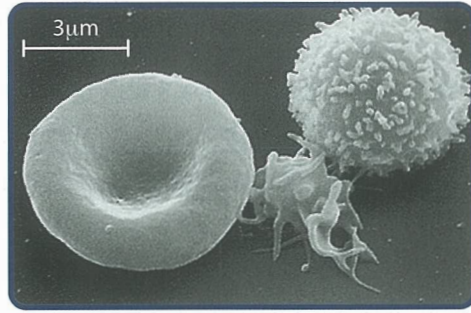
**ייחודי** (Unique gene expression pattern) לכל תא. מכאן משתמעות המסקנות האלה:

1. **בתא מסוים עשויים להתבטא גנים מסוימים שאינם מתבטאים בסוג תא אחר**. עם זאת, ישנם גנים רבים המתבטאים ביותר מסוג תא אחד, וגנים מסוימים שמתבטאים ברוב סוגי התאים.

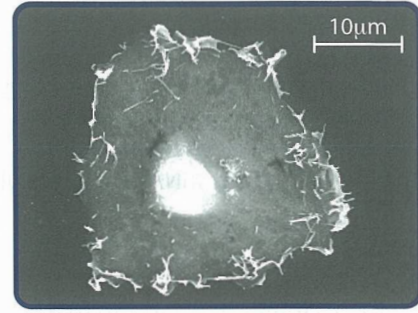
רק כ-25% מכלל ה-DNA שבגרעין (הגנום) מכיל גנים. רק כ-3% מהגנום מקודד לחלבונים. כיום ידועים רק מקצת מתפקידיהם של הגנים השונים. אחד מיעדי המרכזיים של המחקר מבוסס ההנדסה הגנטית הוא למצוא את תפקידי השונים של כל גן וגן, כדי לבדוק אם אפשר לנצלו לתועלת האדם. כמודגם באיור 1.11, לתאים שונים מפרט מסוים יש מראה שונה המשקף תכונות שונות, וזאת למרות שבכולם קיים אותו DNA.



תא עצב



תאי דם  
מימין תא דם לבן ומשמאל תא דם אדום. במרכז  
טסית דם (שאינה תא).



תא רקמת חיפוי פנימית (אנדותרל)

### איור 1.11: לתאים שונים בגוף האדם מראה שונה ותכונות שונות הודות לביטויים של חלבונים ייחודיים בכל סוג תא.

תא רקמת חיפוי פנימית (תא אנדותרל) המרפד את כלי הדם, תאי דם ותא עצב הם בעלי מראה שונה והם בעלי תכונות ותפקידים שונים בגוף. תכונות מוכתבות על ידי ה-DNA אך נקבעות בפועל בעיקר על ידי החלבונים. העובדה שלכל תא חלבונים ייחודיים רק לו מסבירה את התכונות הייחודיות של התאים. מובן שלתאים השונים גם חלבונים משותפים. קנה המידה בצילומים השונים אינו אחיד. לתא העצב הוחדר חלבון הזוהר בירוק.

2. **גנים מסוימים עשויים להתבטא ב"עוצמה רבה" בסוג תא אחד, בעוד שבסוג תא אחר אותם גנים עשויים להתבטא ב"עוצמה הלשה".** הווה אומר, "יתכן כי כגן אחד ובתא אחד תיווצרנה הרבה מולקולות RNA, בעוד שבתא אחר תיווצרנה מעט מולקולות RNA מאותו הגן.

היות שהביטוי של גנים ייחודי לסוג תא מסוים, כל תא "מצויד" בסט חלבונים ייחודי המאפשר לו למלא את תפקידו הייחודיים. הסטים הייחודיים של החלבונים המתבטאים בכל תא יכולים להסביר את התכונות השונות של התאים.

תופעת הביטוי הייחודי של גנים מסוימים מעלה את השאלה: כיצד נעשית **הבקרה על ביטוי גן?** במילים אחרות, כיצד נקבע אם יתקיימו בתא RNA וחלבון שמקורם בגן מסוים ומה תהיה כמותם של תוצרי גן אלה?

### הבקרה על ביטוי גנים מתרחשת בשלוש הרמות האלה:

1. **ברמת ה-DNA** מתקיימים תהליכי **שינוי ובקרה** הקובעים את עיתוי התעתוק של גן ואת עוצמתו.
2. **ברמת ה-RNA** מתקיימים תהליכי **שינוי ובקרה** האחראיים ל"עיבוד" ה-RNA מיד לאחר שנוצר. תהליכים אחרים קובעים לכמה זמן ישרוד ה-RNA ומה יהיה קצב תרגומו לחלבון.
3. **ברמת החלבון** מתקיימים תהליכי **שינוי ובקרה** האחראיים להוספת שיירים ייחודיים לחלבון לאחר תרגומו. שיירים אלה משנים את מבנה החלבון ואת תפקידיו. לשיירים מסוימים תפקיד בקביעת עיתוי וקצב הפירוק של החלבון.

## בקרת ביטוי ברמת ה-DNA

בקרת הביטוי ברמת ה-DNA לצורך תעתוק RNA נעשית בעיקר באמצעות גורמי תעתוק. **גורם תעתוק** (Transcription factor) הוא חלבון הנקשר ל-DNA ב"אזור הבקרה" של גן (איור 1.12). אזור הבקרה מצוי בסמיכות לאזור אחר בגן הנקרא "האזור המבני" שהוא האזור שמתועתק ל-RNA. גורם תעתוק טיפוסית נקשר לרצף מוגדר וייחודי של כ-6-20 בסיסים ב-DNA הנקרא **אתר הקישור** (Binding site). לגורם התעתוק שני חלקים חלבוניים עיקריים. החלק בגורם התעתוק הנקשר לאתר הקישור נקרא "חלק קושר DNA" (DNA binding domain). החלק המרכזי האחר של גורם התעתוק מתפקד ישירות ב"הפעלת ה-RNA פולימראז" (איור 1.12). גורם תעתוק מסוים נקשר לרצף ה-DNA המהווה את אתר הקישור שלו, ואתר הקישור המסוים עשוי להופיע באזור הבקרה של קבוצה מצומצמת של גנים (ראו גם שאלה 7.7).

גורם תעתוק טיפוסית מפעיל את ה-RNA פולימראז מכיוון שהוא מאפשר ל-RNA פולימראז לדייק בהגעה למקום התחלת התעתוק ומקל על התחלת פעולתו כמתעתק (איור 1.13). גורם התעתוק עושה זאת באמצעות שינוי המבנה והתפקוד של חלבונים באזור התחלת התעתוק. במהלך התעתוק ה-RNA פולימראז מזהה את רצף הנוקלאוטידים ב-DNA ומול כל נוקלאוטיד ב-DNA יציב נוקלאוטיד משלים בעל הסוכר ריבוז ("נוקלאוטיד של RNA") (איור 1.13). כך לדוגמה, מול אדינין (A) ב-DNA יעמיד הפולימראז (ריבו) אורציל (U) משלים וכן מול C ב-DNA יעמיד (ריבו) G וכך הלאה. את הריבו-נוקלאוטידים המשלימים קושר ה-RNA פולימראז זה לזה בקשרים פוספודיאסטריים. כך מתקבל פולימר של ריבו-נוקלאוטידים (RNA) בעל רצף משלים לרצף הנוקלאוטידים בגן.

גורם תעתוק פעיל הקשור לאתר הקישור שלו באזור בקרה של גן יכול לאפשר ל-RNA פולימראז להיכנס לפעולה פעם אחר פעם לצורך תעתוק חוזר ונשנה של הגן. בעקבות תרומתו זו של גורם תעתוק טיפוסית, מתקבלים עותקים רבים של RNA שהוא תוצר הגן.

בתא ניתן למצוא גנים שאינם מתבטאים. מה ההסבר האפשרי לעובדה זו? ייתכן לדוגמה כי גורם תעתוק מסוים נעדר מהתא המסוים, ולכן הגנים עם אתר קישור לגורם תעתוק זה לא יתבטאו. ייתכן גם כי גורם התעתוק מתבטא בתא אך הוא אינו נמצא במצב פעיל מכיוון שלא עבר "שינוי" ובעקבותיו **שינוי מבני** המאפשר לו להיקשר לאתר הקישור ולהפעיל את ה-RNA פולימראז. לעתים הגורם להתרחשותו של השינוי הזה הוא שינוי בסביבת התא. כך בעקבות שינוי בסביבת התא יהפוך גורם תעתוק לא פעיל לגורם פעיל, ויתרחש תעתוק של גנים שקודם לשינוי היו "מושקעים". תוצרי גנים אלו "יעזרו" לתא להתמודד עם השינוי בסביבת התא.

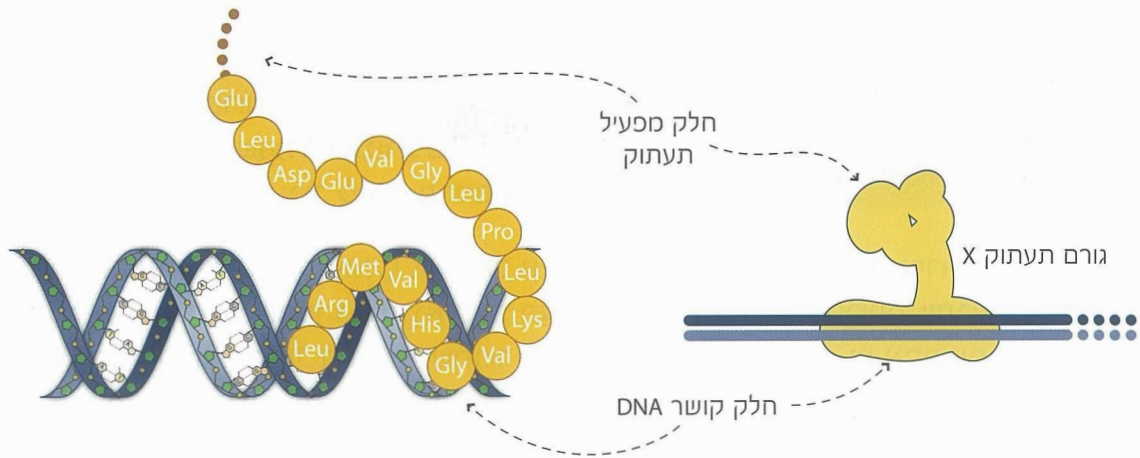
## תהליכי שינוי ובקרה ברמת ה-RNA

□ RNA היוצא אל הציטופלסמה לצורך תרגומו לחלבון נקרא RNA שליח והוא RNA הנעדר אינטרונים. יחד עם זאת גם ב-RNA השליח שלאחר שהבור יש רצפים שאינם מקודדים לחלבון. רצפים אלה ממוקמים בקצוות ה-RNA, ויש להם תפקידי בקרה שונים הקובעים את קצב התרגום ואת קצב הפירוק של ה-RNA בהיותו בציטופלסמה.

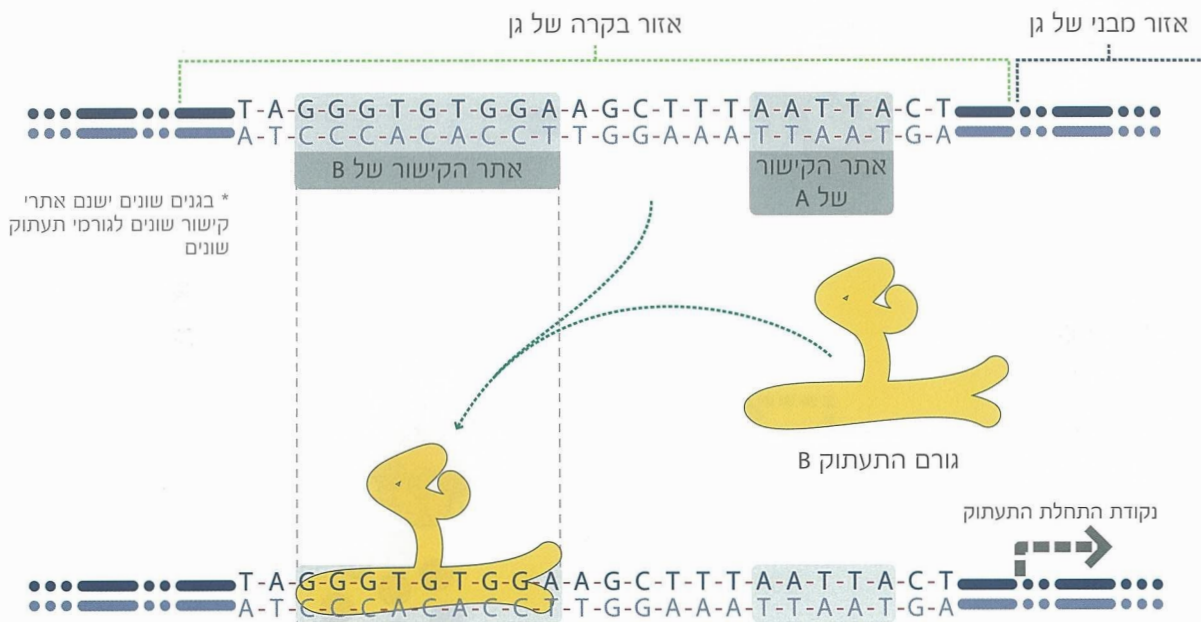
בתאים אאוקריוטים, מולקולות RNA המקודדות לחלבון נוצרות בגרעין בתהליך התעתוק. מולקולת RNA טיפוסית המקודדת לחלבון שזה עתה נוצרה מורכבת מרצפי בסיסים הנקראים "אקסונים" (Exons) ורצפי בסיסים הנקראים "אינטרונים" (Introns). כמוכדגם באיור 1.14, כל שני אקסונים מופרדים על ידי אינטרון ולהיפך. האינטרונים הם רצפי RNA שאינם משתתפים בקידוד לחלבון.



א. מבנה גורם תעתוק וצורות שונות לציין את קישורו ל-DNA



ב. גורם תעתוק ייחודי נקשר לרצף DNA ייחודי באזור הבקרה הנקרא אתר הקישור



**איור 1.12: מבנה גורם תעתוק טיפוסי והצגת הקישור שלו לאתר קישור המצוי באזור הבקרה של גן.**

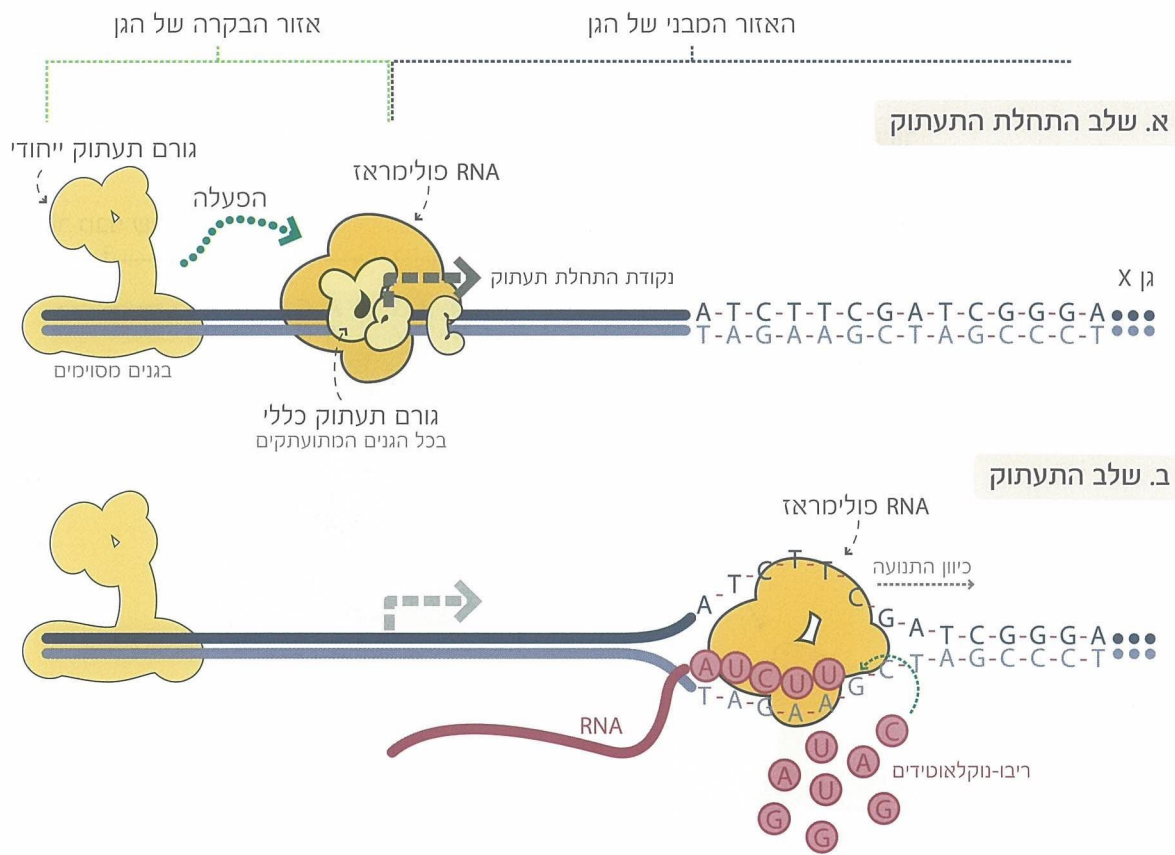
לגורם תעתוק טיפוסי שני חלקים עיקריים: החלק הקושר DNA והחלק המפעיל את התעתוק. הקישור של גורם התעתוק ל-DNA נעשה ברצף DNA ייחודי הנקרא אתר הקישור. אתר הקישור לגורם תעתוק מצוי באזור הבקרה של הגן. גורמי תעתוק שונים נקשרים לאתרי קישור בעלי רצפים שונים. לאזור בקרה של גן יש סקבץ אתרי קישור שונים לגורמי תעתוק שונים.

משנכנס ה-RNA פולימראז לפעולה, הוא מתחיל בתעתוק. במהלך התעתוק הפולימראז מזהה את רצף הנוקלאוטידים באחד מגדילי ה-DNA של הגן ומול כל נוקלאוטיד ב-DNA הוא מציב נוקלאוטיד משלים שיש לו סוכר מטיפוס ריבוז. את הריבו-נוקלאוטידים המשלימים הללו הוא קושר באמצעות קשרים פוספודיאסטריים, וכך נוצרת מולקולת ה-RNA. אם גן מסוים אינו מתבטא בתא, ייתכן כי גורם התעתוק שיכול להיקשר לאזור הבקרה של הגן נעדר מהתא.

האינטרונים הם רצפים שאינם כלולים במולקולת ה-RNA היוצאת אל הציטופלסמה מכיוון שהם מסולקים בתהליך הנקרא **שחבור** (Splicing). בתהליך זה האקסונים עוברים חיבור זה לזה. מכיוון שהמידע שיתורגם לחלבון עשוי להיות מפוזר על פני אקסונים שונים, הרי שלאחר סילוק האינטרונים, כל הקודונים שוכנים זה אחר זה במקבץ אחד. רק RNA שנעדר אינטרונים מלכתחילה או כזה שממנו סולקו האינטרונים יכול לעבור תרגום תקני.

□ כדי להפנים את המושגים "אינטרון" ו"אקסון", היעזרו במשמעות התפקודית של האזורים השונים ב-RNA. כך Intron נשאר בתוך (Intra) הגרעין לאחר השחבור (וספו להתפרק). לעומת זאת ה-Exon יוצא החוצה (Exit) אל הציטופלסמה לצורכי תרגומו.

השחבור אינו תהליך אחיד. עותקי RNA של גן מסוים עשויים לעבור מספר אירועי שחבור ייחודיים. במקביל ל"שחבור רגיל" שבמהלכו מוצאים כל האינטרונים ואך ורק האינטרונים, ייתכן מצב שבו עותקי ה-RNA יעברו "שחבור חלופי". באירועי "שחבור חלופי" מסולקים גם אקסון או אקסונים מסוימים בנוסף לאינטרונים (איור 11.14ב').



**איור 11.13: גורם תעתוק מפעיל את ה-RNA פולימראז לצורך תעתוק שבמהלכו נוצר RNA.**

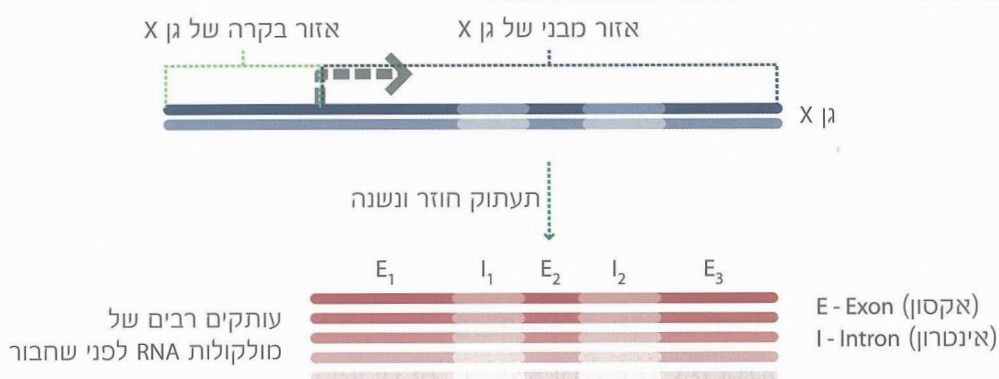
- א. גורם תעתוק טיפוסי מפעיל את ה-RNA פולימראז מכיוון שהוא מאפשר לו לדייק בהגעה לנקודת התחלת התעתוק והוא מקל על פעולתו.
- ב. ה-RNA פולימראז הוא המוציא לפועל של פעולת התעתוק. הוא מייצר RNA, שהוא מטבעו חד גדילי, על פי המידע באחד מגדילי ה-DNA של גן. רצף הבסיסים בגדיל ה-RNA משלים לרצף הבסיסים בגדיל ה-DNA המשמש כתבנית.

מולקולת RNA שליה טיפוסית המקודדת לחלבון ושזה עתה נוצרה מורכבת מרצפי בסיסים הנקראים **אקסונים** ורצפי בסיסים הנקראים **אינטרונים**. איור 11.14א' ממחיש כי כל שני אקסונים מופרדים על ידי אינטרון ולהיפך. האינטרונים אינם כלולים במולקולת ה-RNA היוצאת לציטופלסמה מכיוון שהם מסולקים בתהליך הנקרא **שחבור** (Splicing). בתהליך השחבור האקסונים עוברים חיבור זה לזה. מכאן שהרצף המקודד לחלבון מצוי באקסונים ולא באינטרונים.

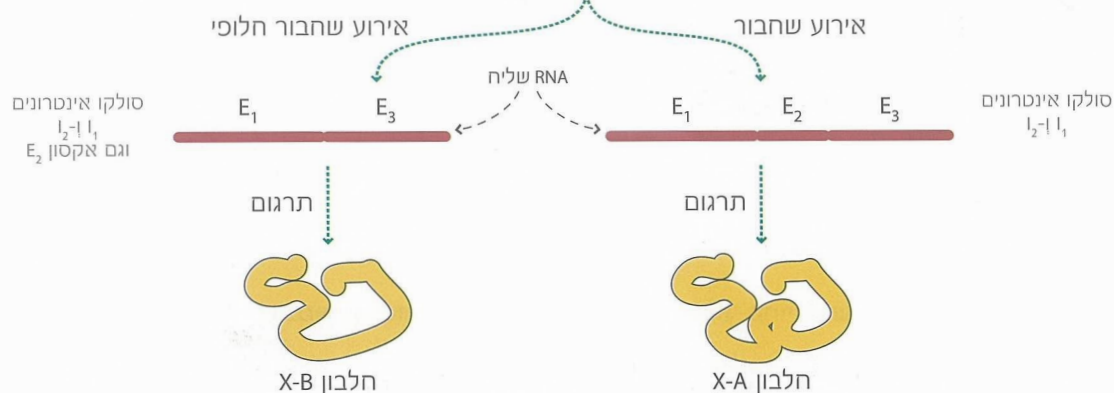
**שחבור חלופי** (Alternative splicing) כווגדר כתהליך שבו נוצרים מספר סוגי RNA שליח מאותו הגן. הדבר מתאפשר שכן מעותק אחד של מולקולת RNA מסולקים מקטעים מסוימים שאינם מסולקים מעותק אחר של מולקולת RNA שאף היא נוצרה מאותו הגן. במקרה טיפוסי של שחבור חלופי מתקבלות מולקולות RNA שונות (בדרך כלל בעלות אורך שונה) ובהן מידע המתורגם לחלבונים בעלי רצף שונה. תפקידיהם של החלבונים, תוצרי אותו גן עשויים להיות שונים, ולעתים אף מנוגדים. המצב, שלפיו גן מסוים (בעקבות תעתוק ושחבור חלופי), מקודד לחלבונים שונים, הוא נפוץ מאוד.

קיומם של תהליכי שחבור חלופי מרמזים כי תהליכי השחבור אינם סרבל מיותר. תהליכים אלה תורמים לשונות בין מולקולות RNA של אותו גן וכך מתאפשר ליצר מגן אחד, מגוון תוצרים חלבוניים בעלי חשיבות.

### א. הגן X מתועתק ונוצר RNA שבו אקסונים ואינטרונים



### ב. סילוק אזורים נבחרים של RNA בתהליך השחבור



### איור 1.14: שחבור, שחבור חלופי ותוצריהם.

לא כל האזור המבני של הגן מיוצג ב-RNA השליח מכיוון ש-RNA שנוצר מסולקים אינטרונים במהלך השחבור. תהליכי שחבור חלופי מביאים להיווצרותם של מספר סוגי RNA שליח מאותו גן, וכל סוג RNA יתורגם לחלבון ייחודי. חלבונים שונים תוצרי אותו הגן עשויים להיות בעלי תפקידים שונים.

השחבור אינו תהליך אחיד. כך לצד השחבור "הרגיל" מתקיימים גם אירועי "שחבור חלופי". כמתואר באיור 1.14, **שחבור חלופי** הוא תהליך שבו מסולקים מקטעים מסוימים, ובכללם אקסונים, מעותק אחד של מולקולת RNA אך מעותק אחר של מולקולת RNA, שאף הוא נוצר מאותו הגן, יתכן ויסולקו מקטעים אחרים. RNA שהוא תוצר של שחבור חלופי עשוי לקודד לחלבון בעל רצף שונה ואף בעל תפקיד שונה בהשוואה לחלבון שנוצר מ-RNA שהוא תוצר של שחבור "רגיל".

## תהליכי שינוי ובקרה מ-RNA לחלבון

רק מקצת הגנים בתא מסוים (אלפים בודדים בתא אנושי) מתבטאים במצב נתון. עם זאת, לאחר שהתקבל RNA ממקצת הגנים שבגנום, עשוי מספר החלבונים השונים בתא להגיע לכפי אלף ממספר הגנים המתבטאים. כל זאת הודות למספר תהליכי שינוי ובקרה ברמת ה-RNA וברמת החלבון. כמוצג באיור 1.15, מן אחד ובעקבות שחבור חלופי, ייתכנו בממוצע כ-10 סוגי מולקולות RNA שליח שונות. על פי רוב מכל מולקולת RNA ייחודית באדם נוצר חלבון אחד, ולכן בעקבות אירועי שחבור חלופי עולה מספרם של החלבונים השונים פי 10. אך אין זה סוף פסוק. החלבונים השונים עשויים להשתנות על ידי "חלבוני שינוי" שונים. השם הכללי "חלבוני שינוי" מתייחס למגוון חלבונים האחראיים להוספת אטומי זרחה, שיירים סוכריים, מולקולות חלבוניות קטנות דוגמת האזוביקוויטין ועוד, וזאת כמעט לכל חלבון שבתא. בשל השינוי, עותקים של חלבון שהם תוצרי מולקולת RNA אחת, יכולים להתקיים במגוון צורות. על פי האומדן, ממולקולת RNA אחת, יתקבלו בגמר התרגום ותהליכי השינוי ברמה החלבונית כ-100 חלבונים שונים זה מזה, ולכל אחד מהם פעילות ייחודית. כך כ-6000 גנים שמתבטאים בתא אנושי טיפוסים הם נקודת המוצא לכ-6 מיליון חלבונים בעלי פעילויות מוגדרות (איור 1.15ב').

בעוד שתהליכי השחבור החלופי ברמת ה-RNA ותהליכי השינוי ברמה החלבונית תורמים למגוון העצום של החלבונים, ישנם תהליכי בקרה שמווסתים את עיתוי הביטוי ועוצמתו. כך כשה-RNA נוצר ועבר שחבור חלופי, נתון RNA שליח זה "לחסדיהן" של מולקולות RNA אחרות המסוגלות לעכב את תרגומו או אף לגרום לפירוקו (פרק 8). RNA שליח נתון גם "לחסדי" אנזימים אחרים האחראיים לפירוקו (RNases). RNA ששרד את הגורמים המבקרים האלה כשיר לעבור תרגום. גם עיתוי התרגום של מולקולות RNA מסוימות וקצבו עשויים להיות מבוקרים על ידי RNA וחלבונים. רק בגמר "מירוץ מכשולים" זה מתקבל חלבון. ולבסוף, אין חלבון שמתקיים לנצח: יש חלבונים שתפקידם לפרק חלבונים. פירוק מתוזמן של חלבונים מבטיח, בין היתר, שכמותם של חלבונים ייחודיים תהיה במינון הנחוץ לתא. כל סטייה מהמינון הנדרש של חלבון מסוים עלולה להפריע לתפקודו של התא.

(-: המדען גנצ'ון היה ממייסדי מבון המחקר גנטובון. הוא ביצע מחקר חלוצי בחיידקים בתקופה שעוד לא היו ידועים תפקידיו של ה-DNA בקביעת תכונות.

גנצ'ון ידע שחיידקים מסוגלים לשחות והוא החליט לבדוק את חשיבות ה-DNA לתפקודו של החיידק.

כאשר הוא הוציא רבע מכמות ה-DNA של החיידק ופקד עליו לשחות- החיידק שחה.

כאשר הוא הוציא רבע נוסף מכמות ה-DNA הוא ציווה על החיידק: שחה! והחיידק שחה.

כאשר הוא הוציא את כל ה-DNA של החיידק הוא שוב ציווה על החיידק: שחה!

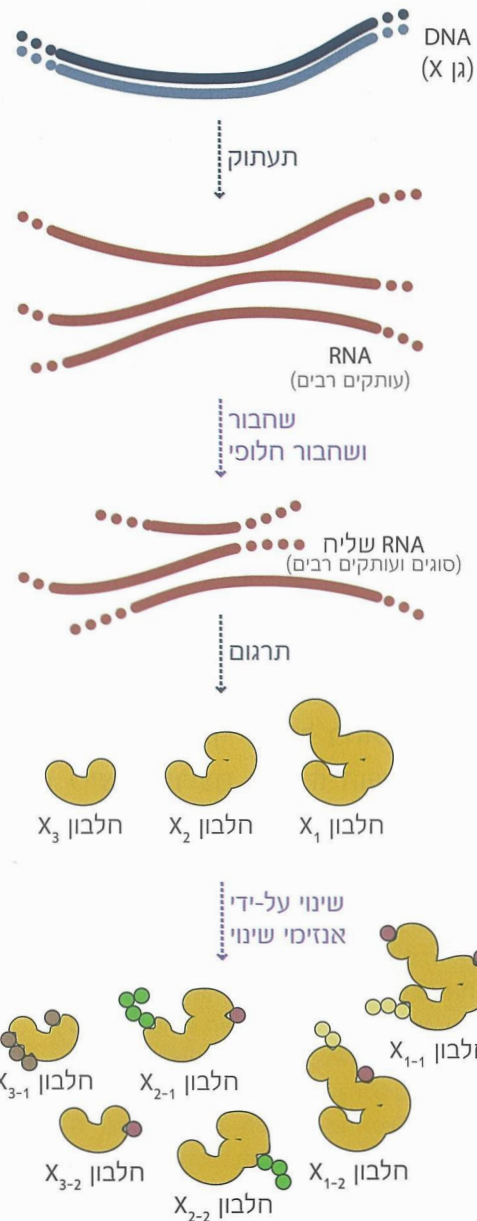
הפעם החיידק לא שחה.

"אאוריקה!" צעק גנצ'ון, "חיידק בלי DNA לא שומע!" והוא מיהר לרשום זאת במחברת התוצאות שלו....

רק מקצת הגנים בתא מסוים מתבטאים במצב נתון. עוד יש לדעת כי מספר החלבונים הייחודיים ונגזרותיהם בתא גדול בכפי 1000 ממספר הגנים המתבטאים. את מספרם הגדול של החלבונים ביחס למספר הגנים המתבטאים ניתן להסביר באמצעות קיומם של תהליכי שינוי ובקרה ברמת ה-RNA וברמת החלבון. תהליכים אלו הם תהליכי השחבור החלופי ותהליכי השינוי ברמת החלבון, כפי שמוסבר באיור 1.15.

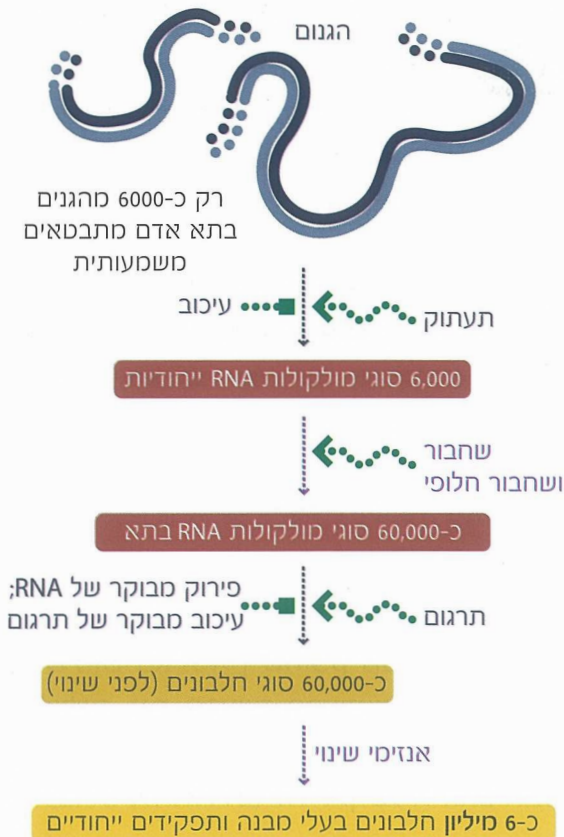
**א. גן אחד חלבונים רבים לו:**

מנגנוני ייצור ומנגנוני שינוי



**ב. מגוון לפרוטאום:**

תרומתם של תהליכי ייצור, שינוי ובקרה למגוון העצום של החלבונים בתא



פירוק מבוקר של חלבונים

הפעלה (זירוז) / עיכוב / פירוק

שיירים כימיים המאפשרים שינויים מבניים ותפקודיים בחלבון

**איור 1.15: אירועים מולקולריים מגן ל-RNA ולחלבון בתא אנושי.**

שני תהליכי ייצור עיקריים מתקיימים לאורך הציור מ-DNA לחלבון: תעתוק ותרגום. שני תהליכי שינוי מעצבים את ה-RNA והחלבונים: שחבור והוספת שיירים כימיים על ידי אנזימי שינוי. תהליכי הייצור והשינוי מבטיחים מגוון עצום של חלבונים בתא, מגוון הנאמד בכפי 10000 ממגוון הגנים המתבטאים. עיתוי תהליכי הייצור ועוצמתם וכן תהליכי השינוי מבוקרים בקרה חיובית ובקרה שלילית. חץ ירוק באיור מצוין זירוז (הפעלה) וחץ אדום חסום מצוין עיכוב של תהליכי ייצור או שינוי. לזירוז ועיכוב של תהליכי ייצור ושינוי אחראיים חלבונים ו-RNA בעלי תפקידים אנזימטיים מוגדרים.

בתהליכי שינוי ברמת החלבון נוספים לחלבונים (על ידי אנזימי שינוי שונים) שיירים כימיים המאפשרים שינויים מבניים ותפקודיים בחלבונים. שינויים אלה תורמים לעלייה ניכרת במגוון חלבונים בתא. בתא גם תהליכי בקרה שנועדו לפרק בעייתי המתאים ובקצב המתאים מולקולות מסוימות של RNA ושל חלבון. למעשה, התא מתאים את כמות ה-RNA ואת כמות החלבון הרלוונטיים לתנאים השוררים בו ובסביבתו, לשם הבטחת תפקודו האופטימלי בתנאי סביבה משתנים.

## מביוטכנולוגיה מסורתית לביוטכנולוגיה מודרנית המבוססת על הנדסה גנטית

בספר בראשית נאמר על נוח המקראי שהיה "איש האדמה" וכי נטע כרם לאחר המבול "וישת מן היין וישכר". סיפור מקראי זה הוא ללא ספק אחת העדויות הראשונות לעיסוק בביוטכנולוגיה מסורתית. כל זאת, עוד בטרם נודע כיצד סוכר הענבים הופך לאלכוהול בעזרת מיקרואורגניזמים דוגמת חיידקים ושמרים. העיסוק בביוטכנולוגיה מסורתית במשך אלפי שנים כולל, בין היתר, ייצור גבינות, בירה וכמובן גם בצק שמרים ללחם ועוגות.

□ אורגניזם יכול להיות לא רק בעל-חיים אלא גם צמח, פטרייה ואפילו חיידק. מקור השם הוא במילה היוונית organon שפירושה כלי או מכשיר. בביוטכנולוגיה אורגניזם פירושו מקבץ מולקולות המשפיעות זו על זו והמתקבצות למכשיר שלם שיש לו תכונות של חיים.

**ביוטכנולוגיה מוגדרת כמגוון התהליכים הכימיים, הביוטכניים, הגנטיים וההנדסיים המאפשרים ניצול אורגניזמים ומרכיביהם לתועלת האדם.** גם על אורגניזמים שנוצרו בעקבות השבחה גנטית בהתערבות האדם אומרים שהם תוצרים ביוטכנולוגיים. בנוסף, הביוטכנולוגיה המסורתית מאפשרת שימוש באורגניזמים לייצור תרופות. ואכן, אחד משיאייה של הביוטכנולוגיה המסורתית הוא הפקתו של אינסולין מלבלב של בעלי-חיים (לדוגמה, פרה וחזיר) לצורך טיפול בחולי סוכרת (תיבה 1.2).

לשימוש באינסולין שהופק מבעלי-חיים לצורך טיפול בסוכרת (איור 1.16א') התלוו בעיות רפואיות וכלכליות. את הבעיות הרפואיות ניתן לפתור אם מפיקים אינסולין אנושי כדי לטפל בחולי הסוכרת. בשנת 1978 הופק לראשונה אינסולין אנושי מחיידקים שאולצו לייצור. פריצת דרך זו הושגה הודות להעברתו (להחדרתו) לחיידק של ה-DNA האנושי המקודד לאינסולין (איור 1.16ב').

□ ההנדסה הגנטית מאפשרת לייצר צירופים חדשים של DNA. לצורך קבלת צירופים חדשים יש קודם לחתוך DNA ממקורות שונים. אחר כך מאפשרים קשירה של DNA ממקור אחד (לדוגמה, מאורגניזם אחד) ל-DNA ממקור אחר (לדוגמה, מאורגניזם אחר). טכנולוגיה בסיסית זו של ההנדסה הגנטית מתאפשרת בשל האוניברסליות של ההרכב והמבנה של ה-DNA אצל כל היצורים החיים ואפילו אצל וירוסים מסוימים. טכנולוגיה זו נקראת טכנולוגיית **DNA רקומביננטי** (Recombinant DNA). פירוש שם זה הוא צירוף (קומבינציה) מחדש (רה) של DNA ממקורות שונים.

אינסולין אנושי המיוצר בחיידקים או בשמרים או בתאי מחרסמים ואפילו בצמחים, הוא ללא ספק אחד הסמלים של הביוטכנולוגיה המודרנית. ביוטכנולוגיה מודרנית מנצלת טכנולוגיות של הנדסה גנטית כדי להעביר DNA (ובכלל זה גנים) מאורגניזם אחד לצורך ביטוי שלו באורגניזם אחר (ראו דוגמה באיור 1.16ב'). כדי ש-DNA מהאורגניזם ה"תורם" יתבטא באורגניזם אחר מייצרים צירוף חדש של DNA. כך קושרים DNA המקודד לחלבון הרצוי (המשתתף בקביעת תכונה רצויה) שמקורו ב"אורגניזם התורם", ל-DNA שבו אזור בקרה המתאים לביטוי "באורגניזם המקבל". את תוצר הקשירה הרקומביננטי מחדירים לאורגניזם המקבל שמיועד לבטא את ה-DNA.

**ביוטכנולוגיה** מוגדרת כמגוון התהליכים הכימיים, הביוטכניים, הגנטיים וההנדסיים המאפשרים ניצול אורגניזמים ומרכיביהם לתועלת האדם. הביוטכנולוגיה מאפשרת גם לנצל אורגניזמים לייצור תרופות כמו במקרה של הפקת אינסולין מלבלבים של בעלי חיים לצורך טיפול בחולי סוכרת (תיבה 1.2 ואיור 1.16א'). הביוטכנולוגיה המודרנית המבוססת על הנדסה גנטית מאפשרת להפיק חלבון תרופתי אנושי ממגוון אורגניזמים.

## □ תיבה 1.2: על סוכרת ועל אינסולין.

לחולים בסוכרת רמה גבוהה של גלוקוז בדם, דבר המזיק מאוד לבריאותם. סוכרת היא מחלה משמעותית ששיעור התחלואה והתמותה ממנה נמצאים בעלייה. בארצות הברית של המאה ה-21 הסוכרת מהווה מגפה של ממש: 25 מיליון אנשים (כ-10 אחוז מאוכלוסיית ארצות הברית) חולים בסוכרת (נתוני 2007). כל שנה מתים שם כרבע מיליון אנשים ממחלה זו. את הנתונים המבהילים האלה מייחסים בעיקר לעלייה בתזונה לא נכונה ובפעילות גופנית בלתי מספקת.

כאשר אנו אוכלים עולה רמת הגלוקוז בדם. תאי  $\beta$  של הבלב (Pancreas) "חשים" בשינוי ברמת הגלוקוז בדם ומפרישים לזרם הדם את ההורמון אינסולין. כאשר אינסולין מגיע לכבד הוא מדכא שם את ייצור הגלוקוז. לעומת זאת, כאשר אינסולין מגיע לרקמות שריר ושומן, הוא עוזר לתאים ברקמות אלה לקלוט לתוכם את הגלוקוז שבדם. הגלוקוז בתאים אלה נחוץ ליצירת אנרגיה וגם לבניית פחממות, שומנים וחלבונים.

ישנם שני סוגי סוכרת. בסוכרת מטיפוס 1 חולים כ-5% מכלל חולי הסוכרת. הבלב של חולים אלה אינו מסוגל לייצר די אינסולין. אם יש מחסור באינסולין בדם, ומכיוון שהאינסולין נחוץ להכנסת הגלוקוז לתאים, תעלה רמתו של הגלוקוז בדם. אצל חולים אלה התאים "ירעבו" לגלוקוז מכיוון שאין הוא יכול להיכנס לתא. לעומתם, החולים בסוכרת מטיפוס 2, המהווים 95% מכלל החולים בסוכרת, מייצרים די והותר אינסולין. אולם כלל תאי הגוף אינם מסוגלים לנצל באופן תקין את האינסולין לצורך תפקודם. כלומר, גופם של החולים בסוכרת מטיפוס 2 עמיד יחסית לאינסולין.



הילד לאחר שקיבל אינסולין



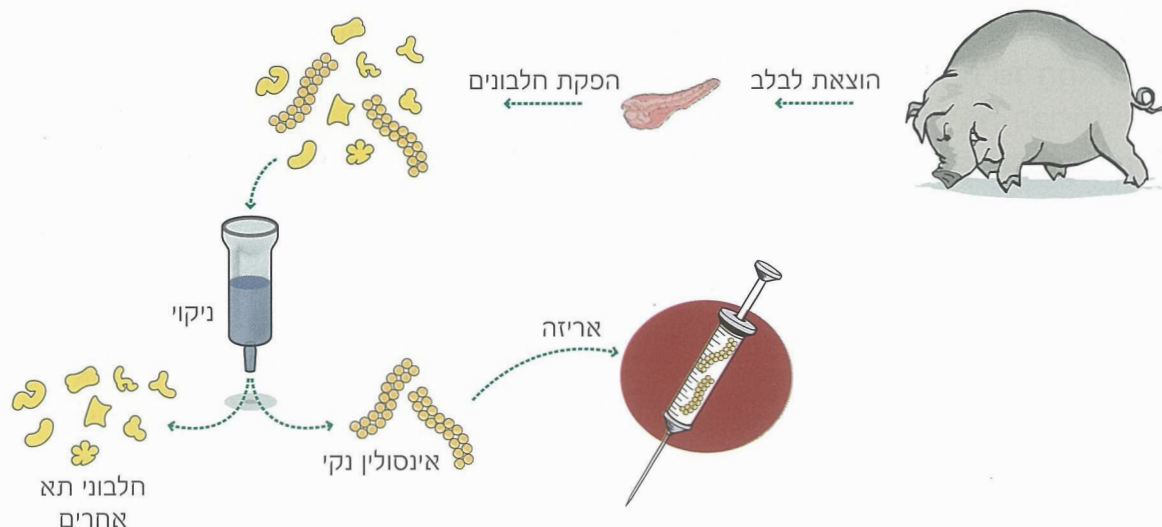
טיפול באינסולין  
על-ידי הרופא  
R.H. Major, ארצות הברית.



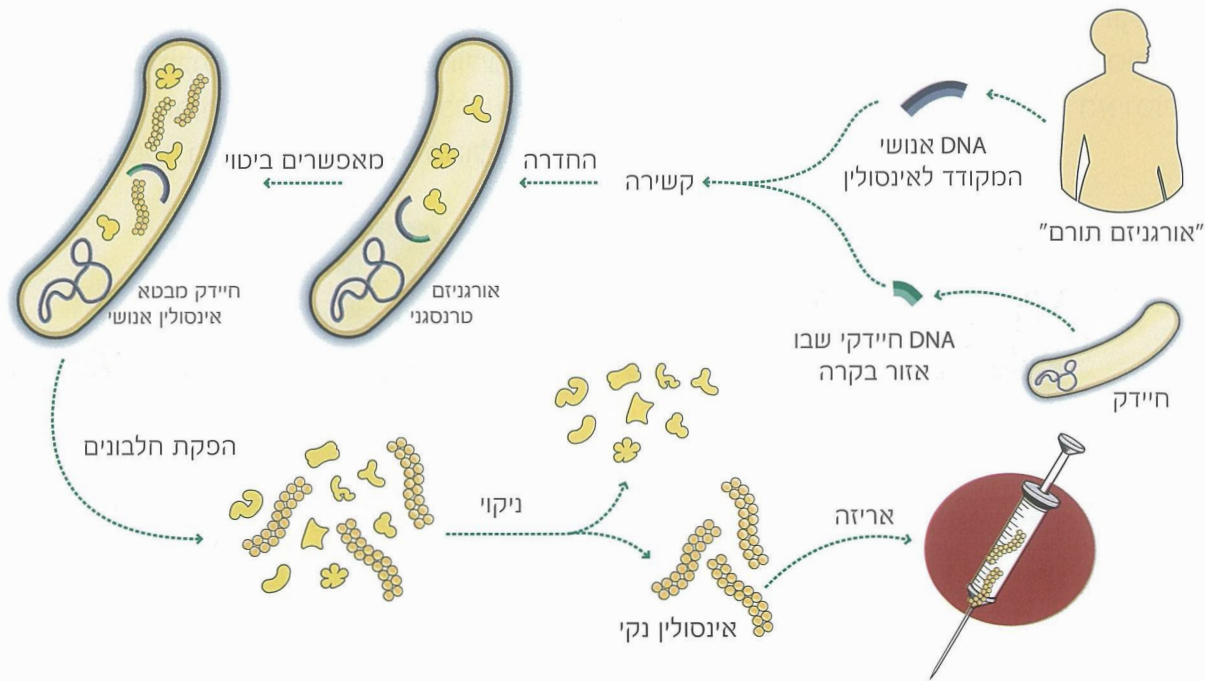
ילד חולה סוכרת בזרועות אימו

עד שנות ה-20 של המאה ה-20, דינם של החולים בסוכרת מטיפוס 1, בדרך כלל ילדים, היה מוות. אולם בתחילת המאה ה-20 הצליח פרדריק בנטינג (Frederick Banting) להציל את חייהם של כלבים חולי סוכרת באמצעות הזרקת מיצוי חלבוני שמקורו בבלבים. בתוך זמן קצר שימשו מיצויים מבלבים של חזירים ופרות להפקה של אינסולין נקי לטיפול בבני אדם. האינסולין משמש להציל את חייהם של חולי סוכרת מטיפוס 1. כאשר מחמירה מחלתם של חולי הסוכרת מטיפוס 2, נהרסים תאי הבלב שלהם ונוצר מחסור באינסולין בגופם ולכן גם הם נזקקים לטיפול באינסולין.

א. ביוטכנולוגיה מסורתית: הפקת אינסולין מבעלי-חיים



ב. ביוטכנולוגיה המבוססת על הנדסה גנטית: ייצור אינסולין אנושי בחיידק והפקתו



**איור 1.16: הפקה וניקוי של אינסולין בתהליכים ביוטכנולוגיים.**

א. הפקת אינסולין מלבלבים של בעלי-חיים בשנים 1922-1980 הייתה אחד מהישגיה הבולטים של הביוטכנולוגיה המסורתית.

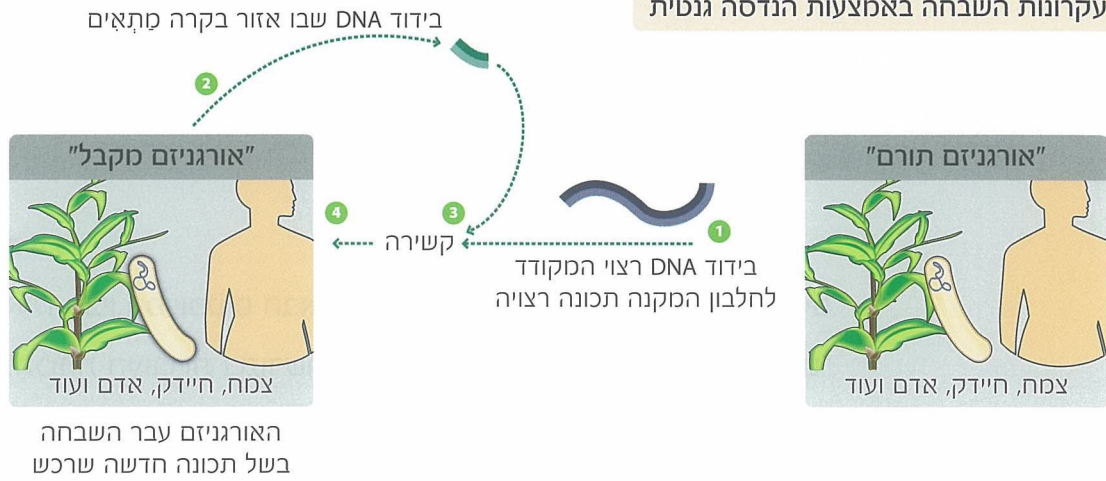
ב. טכנולוגיית ה-DNA הרקומביננטי מאפשרת לייצר צירופי DNA חדשים לצורך ביטוי DNA מאורגניזם אחד באורגניזם אחר. אם רוצים לבטא חלבון מסוים של אדם בחיידק, קושרים את ה-DNA האנושי המקודד לחלבון הרצוי לאזור בקרה של חיידק. לאחר החדרת הצירוף החדש של ה-DNA (אדם-חיידק) לחיידק, יאפשרו גורמי התעתוק שבחיידק ביטוי של ה-DNA האנושי וייוצר חלבון אנושי. לבסוף, מפיקים מחיידקים חלבונים ומנקים את החלבון שיוצר בטכנולוגיית DNA רקומביננטי.

כדי לממש יישום ביוטכנולוגי דוגמת ייצור אינסולין אנושי בחיידקים (איור 1.16), וגם כדי לממש יישומים נוספים כגון השבחת אורגניזמים (איור 1.17), נהוג להעביר DNA מאורגניזם "תורם" לאורגניזם "מקבל". העברת ה-DNA לצורך יישום ביוטכנולוגי כרוכה בייצור צירופים חדשים של DNA שאינם קיימים באופן טבעי בטבע.

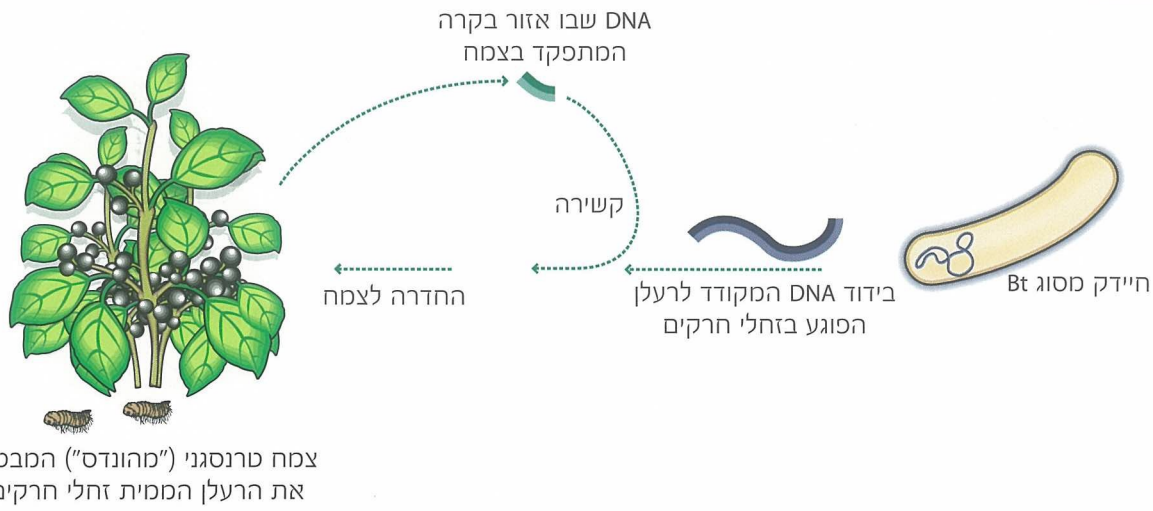


כאמור, צירופי DNA חדשים המקודדים לחלבונים שהם תרופות, מועברים לאורגניזם רצוי המשמש כ"בית חרושת לייצור חלבונים". דבר זה מאפשר לקבל מגוון חלבונים אנושיים באיכות מעולה. אולם פוטנציאל ההנדסה הגנטית מאפשר גם לנצל צירופי DNA חדשים כדי להקנות לאורגניזם רצוי תכונות חדשות שמשביחות אותו (איור 1.17). האורגניזם שמקבל ומבטא גן מאורגניזם תורם, נקרא **אורגניזם טרנסגני** (Transgenic organism). לעתים מכנים אורגניזם שכזה בשם החיבה "אורגניזם מהונדס". הגן שהוחדר לאורגניזם הטרנסגני ושמתבטא בו נקרא **טרנסגן**.

**א. עקרונות השבחה באמצעות הנדסה גנטית**



**ב. דוגמה להשבחה בצמחים: יצירת צמחים עמידים לחרקים באמצעות גן שמקורו בחיידק**



**איור 1.17: תהליכים להשבחת אורגניזמים בעזרת ההנדסה הגנטית.**

להשבחה מודרנית של אורגניזם ניתן לנצל את טכנולוגיית ה-DNA הרקומביננטי, הטכנולוגיה המרכזית של ההנדסה הגנטית. ראשית מאתרים ב"אורגניזם תורם" DNA המקודד לחלבון המקנה תכונה רצויה. קושרים DNA זה ל-DNA אחר שבו אזור בקרה שיכול לתפקד ב"אורגניזם המקבל". מחדירים צירוף DNA חדש זה (ה-DNA הרקומביננטי) ל"אורגניזם המקבל". אורגניזם זה מבטא את ה-DNA שהוחדר אליו. החלבון שנוצר מקנה תכונה מושפרת או תכונה חדשה בעלת ערך ביוטכנולוגי. עד כה יוצרו צמחים טרנסגניים רבים שבהם מתבטאים גנים של חיידקים, של צמחים אחרים ואפילו של אדם.

יצירת צירופי DNA חדשים היא הטכנולוגיה הבסיסית של ההנדסה הגנטית והיא נקראת גם טכנולוגיית "DNA רקומביננטי". פירושו של שם זה הוא צירוף (קומבינציה) מחדש (נה) של DNA ממקורות שונים. האורגניזם שמקבל גן מאורגניזם תורם נקרא לעתים "אורגניזם טרנסגני". הגן שהוחדר לאורגניזם הטרנסגני ושמתבטא בו נקרא "טרנסגן".

נראה כי הניצול עד כה של מגוון אורגניזמים שיוצרו בשיטות של הנדסה גנטית לצרכים חקלאיים ורפואיים, הוא ביטוי לפוטנציאל העצום בתחום זה. השאיפה למצוא מרפא למחלות ולייצר צמחים טרנסגניים המסוגלים להעניק מזון איכותי יותר לאוכלוסיית העולם, מעודדת מחקר במגוון נושאים. אחד מענפי המחקר והיישום העיקריים המצריך הנדסה גנטית עוסק במציאת תפקידיהם של הגנים ואיתור הגנים שהם בעלי חשיבות ביולוגית, חקלאית, רפואית וכלכלית. רק משנמצאו תפקידיו של גן, אפשר לעתים לנצל כדי לייצר תרופות ולהשביח אורגניזמים. אנו עדיין בתחילתו של המסע להגדרת תפקידיהם של הגנים, ועוד ארוכה הדרך למציאת יישומים ביוטכנולוגיים חדשים.

מה צריך לעשות כדי למצוא את תפקידיו של גן ולהגשים יישום ביוטכנולוגי? על כך ביתר פרקי הספר.

## שאלה 1.4

- צינו אילו מבין המשפטים הבאים נכונים. תקנו את המשפטים הלא נכונים.
1. לתכונות העוברות בתורשה אחראיות יחידות בדידות הנקראות "גנים".
2. גן הוא בראש וראשונה מקטע חלבון אוצר מידע.
3. לכל גן של פרט מסוים יש שתי גרסאות.
4. גרסאות של גן נבדלות זו מזו בזכות ההבדלים ברצף חומצות האמינו של הגן.
5. "גרסה של גן" ו"אלל" הם שמות נרדפים.
6. ברוב המקרים כל תא באורגניזם מכיל רק חלק מהגנים של האורגניזם.
7. הגנים עוברים בתורשה מזור לדור באמצעות תאי המין: כל תא מין מעביר שני אללים של כל גן.
8. ניתן למצוא חלבונים בציטופלסמה אך גם בגרעין, מקום היווצרותם.
9. אברי ועמיתיו הוכיחו כי החלבונים אינם אחראים לתכונות.
10. וטסון וקריק הוכיחו כי ה-DNA הוא החומר התורשתי.
11. דאוקסי אדנוזין תלת-פוספאט (dATP) הוא טיפוס של נוקלאוטיד המשובץ ב-DNA.
12. יש בתא 4 נוקלאוטידים המיועדים לשיבוץ ב-RNA.
13. הנוקלאוטידים ב-DNA וגם ב-RNA קשורים ביניהם באמצעות קשרים פפטידיים.
14. בקצה 3' של גדיל DNA או RNA מצוי סוכר שבו קבוצת הדרוקסיל (OH) בעמדה 3' של הסוכר.
15. קצה 5' של אוליגו-נוקלאוטיד המתפקד כתחל משמש להתחלת סינתזה של גדיל DNA משלים.
16. בשכפול DNA יש סינתזה של שני גדילי DNA חדשים הנצמדים זה לזה ליצירת מולקולת DNA חדשה.
17. DNA כולימראז הוא אנזים המשמש ליצירת RNA מ-DNA.

כדי למצוא יישומים ביוטכנולוגיים מודרניים נוספים, כמו צמחים עמידים למחלות וחלבוני תרופה חדשים, יש לחקור בראש ובראשונה את תפקידיהם של גנים רבים ככל האפשר. פרקי הספר הבאים עוסקים, בין השאר, בדרכים שבאמצעותן מאפשרת ההנדסה הגנטית לחקור את תפקידיהם של הגנים השונים באורגניזמים השונים.

18. RNA פולימראז המצוי בציטופלסמה של תאים אאוקריוטים משמש ליצירת RNA מ-RNA.
19. האנזים האחראי לתעתוק הוא ה-DNA פולימראז.
20. כאשר מוצאים בתא מסוים חלבון X שנוצר מהגן X, פירושו של דבר כי הגן X מתורגם בתא.
21. גן מסוים עשוי להתבטא רק בסוג תא אחד.
22. מוטציה תמיד גורמת להפחתה בפעילות של החלבון.
23. ביטוי גבוה של גן עשוי להתאפיין בקצב תעתוק גבוה של הגן.
24. כאשר הועלתה הטמפרטורה בחצי מעלה התברר כי ביטוי הגן H70 בתאי אדם עלה. מכאן אפשר להסיק כי בתא שנחשף לטמפרטורה גבוהה היה פחות RNA של H70 בהשוואה למצב בתאים ששהו בתנאי ביקורת.
25. כאשר עלתה הטמפרטורה בסביבת התא, חלבון H99 עבר שינוי מבני שכתוצאה ממנו עלתה פעילותו. מכאן שקצב תעתוק הגן H99 עלה והוא אחראי לעלייה בפעילות.

## שאלה 1.5

כאשר עולה הטמפרטורה בסביבת התא במעלה אחת, עולה ביטויים של כ-20 גנים שנכנה אותם בקצרה H70-H89 (H-Heat). מכאן עולה הסברה כי גנים אלה נחוצים להגנה על התא מפני חום. לכך, ניתן לשער כי גנים אלה אחראים לתכונה המקנה לתאים עמידות בפני חום.

קבעו איזה מבין המשפטים הבאים מתאר תרחיש אפשרי ותקנו את המשפטים שאינם נכונים.

1. כשהטמפרטורה בסביבת התא עולה, מתגלה כי גורם התעתוק  $\gamma$  נקשר לאזור הבקרה של הגן H77.
2. כשהטמפרטורה בסביבת התא שבה ויורדת לטמפרטורה האופטימלית, כמות ה-RNA פולימראז המצוי בגן H70 שבה ועולה.
3. כשהטמפרטורה בסביבת התא עולה, עולה גם קצב תרגום ה-RNA של הגן H82.
4. הגן H79 מקודד לחלבון שנקשר לחלבונים שעברו דנטורציה בעקבות חום ומזרז את פירוקם.
5. אם מונעים באופן ממוקד את ביטוי הגנים H72 ו-H82, עולה עמידותם של התאים לטמפרטורה גבוהה.
6. הגן H80 מקודד לחלבון שתפקידו לשתק סינתזה של חלבונים בעלי רגישות מיוחדת לחום ו"לחסוך צרות" עד שהטמפרטורה תשוב ותהיה אופטימלית.
7. הגן H80 נחוץ להקניית תכונת העמידות היחסית לשינוי בטמפרטורה, אך אין די בגן זה לבדו כדי להקנות (או כדי להבטיח) תכונה זו.
8. השתקה ממוקדת של ביטוי הגן  $\gamma$  מסעיף 1 מגבירה את עמידותם של התאים בפני עלייה בטמפרטורת הסביבה.

9. אדם עם מוטציה בגן H77 ההופכת את תוצרו החלבוני ללא פעיל, יתקשה להתמודד עם חום בזמן שפעת.
10. קיים דמיון בין רצף חומצות האמינו של החלבון המקודד על-ידי הגן H77 לבין זה המקודד על-ידי H88.

## שאלה 1.6

לקראת חלוקת התא, שלא כמו בשלבים אחרים של מחזור חי התא, נמצא כי ביטוי של הגן  $w$  חלש ואילו ביטוי של הגן  $s$  חזק. זאת כתוצאה מהימצאות כמות RNA גדולה יחסית שנוצרה מהגן  $s$  לעומת כמות RNA קטנה יחסית של הגן  $w$ .

איזה מבין ההיגדים הבאים מתקבל על הדעת ואיזה לא? נמקו את תשובותיכם ובמידת האפשר תקנו את ההיגדים.

1. לגן  $s$  תפקיד בהכנת תאים לחלוקה, ואילו לגן  $w$  אין תפקיד כזה.
2. סמוך לחלוקת התא רמת הפעילות של גורמי תעתוק הקשורים לאזור הבקרה של הגן  $s$  גבוהה במיוחד בהשוואה לזו של גורמי התעתוק הקשורים לאזור הבקרה של הגן  $w$ .
3. תדירות ההתחלה החוזרת ונשנית של התעתוק על-ידי ה-DNA פולימראז גבוהה בגן  $s$  בהשוואה לזו שבגן  $w$ .
4. כאשר תאים עומדים להתחלק, עולה קצב התעתוק של גן  $z$  המקודד לאנזים המשנה את המבנה של גורם תעתוק מסוים ובשל כך גורם התעתוק נקשר לאזור הבקרה של הגן  $s$ .
5. קודם לחלוקת התא נקשר לגן  $s$  חלבון שמעכב תעתוק.
6. לקראת חלוקת התא עולה פעילותו של גורם שמפרק באופן סלקטיבי את ה-RNA של  $w$ .



- מונחים ומושגים**
- תכונה העוברת בתורשה
  - גֵן (Gene)
  - אלל (גרסה של גן) (Allele)
  - חומר תורשתי (Genetic material)
  - גנוטיפ
  - פנוטיפ
  - מוטציה, מוטציה נקודתית (Mutation)
  - חלבונים וחומצות אמינו כאבני הבניין
  - התא ובו הגרעין, אברונים, ציטופלסמה וקרומית
  - חומצות גרעין: DNA, RNA
  - בסיסים חנקניים: אדנין (A), גואנין (G), ציטוזין (C), תימין (T), אורציל (U)
  - נוקלאוטיד של DNA: קב' זרחה, דאוקסי-ריבוז, בסיסים חנקניים (A, G, T, C)
  - נוקלאוטיד של RNA: קב' זרחה, ריבוז, בסיסים חנקניים (A, G, U, C)
  - קשר פוספו-דיאסטרי
  - גדיל DNA, שני גדילים משלימים
  - בסיסים משלימים: C-G A-T/U
  - קשרי מימן
  - הסליל הכפול
  - שכפול DNA: סינתזת שני גדילים
  - תחל (Primer) ברבים: תחלים
  - "הדוגמה המרכזית" (The central dogma)
  - גדיל תבנית
  - הקוד הגנטי (Genetic code)
  - קודון וסוגי קודונים (Codon)
  - אנטי קודון
  - ריבוזום (Ribosome)
  - תכונה ברמת האורגניזם
  - תכונה ברמת התא
  - תכונה מולקולרית
  - גֵנום (Genome)
  - כרומוזום
  - נוקלאוזום
  - ביטוי גן (Gene expression)
  - RNA מקודד ו-RNA שאינו מקודד
  - RNA שליח (mRNA)
  - RNA ריבוזומלי, RNA מעביד, RNA קטן מפריע (פרק 8)
  - גורם תעתוק (Transcription factor)
  - אזור בקרה (Promoter)
  - אתר קישור לגורם תעתוק
  - אינטרון (Intron)
  - אקסון (Exon)
  - ביוטכנולוגיה
  - DNA רקומביננטי
  - טרנסגן (Transgene)
  - אורגניזם טרנסגני



## גישות מחקר

- תרומתו של מישר
- הניסוי של אברי ועמיתיו
- תרומתם של ווטסון וקריק
- תרומתו של ארתור קורנברג
- החדרת DNA רקומביננטי לתא
- מה הם תפקידיו של כל גן וגן?

## סוגי חלבונים

- DNA פולימראז
- RNA פולימראז
- חלבונים בריבזום, בגרעין, בציטופלסמה, בקרומית התא
- חלבוני ההמוגלובין
- חלבון המוגלובין  $\beta$
- גורם תעתוק כלשהו
- אנזים RNase
- אינסולין
- היסטונים
- חלבונים מפרקי חלבונים

## עקרונות ותהליכים

- DNA כחומר התורשתי
- שכפול DNA: סינתזת שני גדילי DNA
- תעתוק (Transcription)
- תרגום (Translation)
- לרצף ייחודי של חומצות אמינו נטייה ליצור מבנה חלבון ייחודי. לחלבון בעל מבנה ייחודי יש תפקיד ייחודי
- DNA ותוצריו כאחראיים לתכונות
- גן משתתף בקביעת תכונה
- גן מקודד ל-RNA
- גן מקודד לחלבון
- DNA שבו שוכנים גנים
- DNA שאין בו גנים
- DNA מקודד
- DNA שאינו מקודד
- ביטוי סלקטיבי של גנים
- בקרה על תעתוק
- בקרה ושינוי של RNA
- בקרה ושינוי של חלבונים
- שחבור (Splicing)
- שחבור חלופי (Alternative Splicing)
- פירוק RNA
- פירוק חלבון
- אורגניזם "תורם" DNA
- אורגניזם "מקבל" DNA

# חיתוך DNA על-ידי אנזימי הגבלה ואפיונו

# 02

בשנות ה-50 של המאה ה-20 הופק DNA מתוך תאים ללא קושי מיוחד, וניתן היה לקבל DNA בכמויות גדולות כשהוא נקי מחלבונים וממולקולות אחרות. בזכות DNA נקי יכלו ווטסון וקריק לקבוע את המבנה התלת-ממדי של ה-DNA (פרק 1), אולם חסרו להם אמצעים לקבוע מהו המידע המוצפן ב-DNA. למעשה, חסרו אמצעים לבידוד גנים וקביעת רצף הבסיסים שלהם. במיוחד חסרו אמצעים לטיפול ראשוני ב-DNA תאי שהוא מטבעו ארוך. הראשונה בסדרת פריצות דרך בתחום הושגה הודות לגילוי קבוצת אנזימים בעלי יכולת לחתוך באופן מבוקר את ה-DNA למקטעי DNA קצרים. כיום ידועים כמה מאות אנזימים כאלה הנקראים בשם **אנזימי הגבלה** (Restriction enzymes) ולעתים הם נקראים אנזימי חיתוך. אנזימים אלה נמצאים בשימוש נרחב, והם חיוניים לעוסקים בביוכימיה ולמולקולרית ולנזקקים לשיטות של הנדסה גנטית.

כיצד התגלו אנזימי החיתוך הנקראים אנזימי הגבלה ומהו מקור שמם? מה מייחד את אנזימי הגבלה ומהו אופן פעולתם? כיצד ניתן להשתמש בהם לאפיון ראשוני של מקטעי DNA?

## ”סיפור מלחמה”: גילוי אנזימי הגבלה

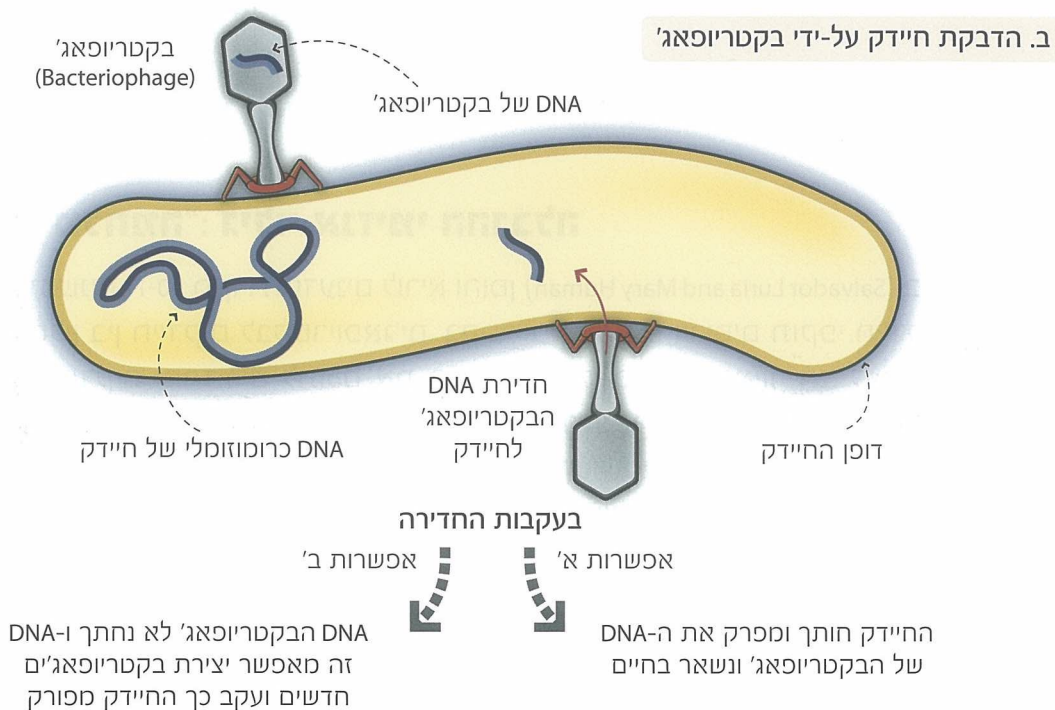
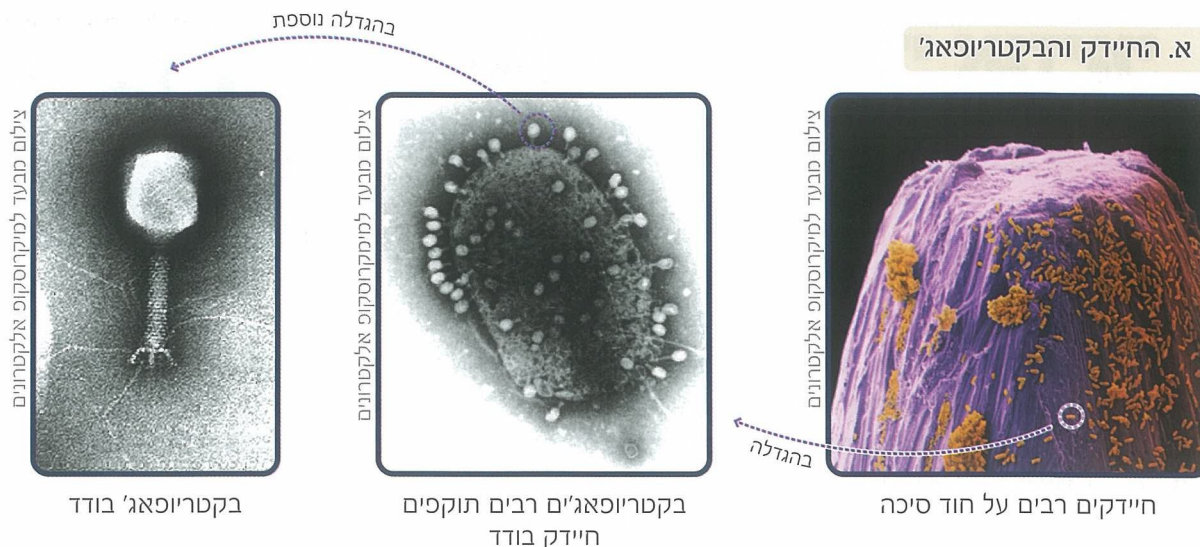
בתחילת שנות ה-50 חקרו המדענים לוריא והוכן (Salvador Luria and Mary Human) בארצות הברית את יחסי הגומלין בין חיידקים לבקטריופאג'ים. בקטריופאג'ים הם וירוסים תוקפי חיידקים. בקטריופאג'ים נצמדים לחיידקים ומחדירים לתוכם את ה-DNA שלהם, כמודגם באיור 2.1. לעתים, בעקבות חדירת ה-DNA של הבאקטריופאג' לחיידק, מתרבה הבאקטריופאג' בחיידק וגורם לפירוקו. החיידקים מצדמ משיבים מלחמה: יש להם אמצעי התגוננות מכני בקטריופאג'ים. מאפייני ההתגוננות אינם פשוטים: התברר כי חיידק מסוגל להתגונן מכני זנים מסוימים של בקטריופאג'ים אך לא מכני זנים אחרים. לוריא הגדיר כי חיידקים מסוגלים להגביל ריבוי של בקטריופאג'ים מסוימים בלבד. תופעה זו זכתה לכינוי **תופעת הגבלה**.

לוריא לא זכה לגלות את המנגנון המולקולרי של התופעה והסתפק בחיזוי ותיאור התרחישים האפשריים. לוריא הציע כי DNA של זן חיידק ספציפי עובר ”שינוי” באופן ייחודי ו-DNA של בקטריופאג' כלשהו גם הוא עובר ”שינוי” באותו אופן או ”שינוי” אחר. הוא הציע שכאשר ”השינוי” על ה-DNA של

(-): תלמיד המחקר החדש בקבוצת המחקר של ד"ר גנטית ניסה לגדל חיידקים. בימים הראשונים זה לא כל כך הצליח לו מכיוון שהחיידקים התרבו בקושי. מישהו במעבדה סמוכה אמר לו שכנראה החיידקים מזוהמים בבקטריופאג'ים, שהם וירוסים בעלי יכולת לתקוף ולחסל חיידקים. זה מיד הזכיר לו כמה אמירות על חיידקים.

■ חיידק לחיידק חבר: אתה נראה רע... חיידק חבר: יש לי וירוס...

■ מה אמרה החיידקית לחיידק? מי צריך ביוכימיה כשיש בינינו כימיה?



**איור 2.1: חיידקים, בקטריופאג'ים ויחסי הגומלין שביניהם.**

- א. תמונות של חיידקים ובקטריופאג'ים הממחישות את סדרי הגודל היחסיים של החיידקים והבקטריופאג'ים.
- ב. במהלך הדבקה של חיידק נצמד הבקטריופאג' לחיידק ומחדיר את ה-DNA שלו לתוכו. האיור מתאר גם את ההשלכות האפשריות לאירוע הדבקה זה. לתכונות ה-DNA של החיידק ולתכונות ה-DNA של הבקטריופאג' תפקיד מכריע בקביעה אם המתקפה תיהדף או לא.

ה-DNA של חיידק מסוים הוא בעל "שינוי" שנגרם על ידי "אנזים שינוי" מסוג מתילאזה המוסיפה קבוצת מתיל ב-A או ב-C (איור 2.2) באתר מסוים הנקרא **אתר הגבלה**. בחיידקים ניתן למצוא גם **אנזים הגבלה** מסוים החותך באותו אתר הגבלה מסוים רק אם **אין** בו מתיל.



הבקטריופאג' **שונה** מ"השינוי" על ה-DNA של החיידק, **יתגבר** החיידק על הבקטריופאג' ויוכל למנוע את התרבות הבקטריופאג' ואת פירוקו שלו עצמו. לעומת זאת, כש"השינוי" על ה-DNA של הבקטריופאג' **זנה** ל"שינוי" על ה-DNA של, **לא** יוכל החיידק להתגונן מפני הבקטריופאג', הבקטריופאג' יתרבה בתוך החיידק, והחיידק יפורק וימות.

"השינוי" ואתו המנגנון המולקולרי לתופעת ההגבלה נשארו בלתי ידועים במשך 10 שנים לאחר שהסתיימה עבודתו של לוריא. רק בשנת 1962 התקבל המידע המולקולרי הראשוני הנוגע למנגנון ההגבלה על-ידי הביוכימאי השוויצרי ארבר (Werner Arber). יחד עם עמיתו הוא זיהה את "השינוי" ב-DNA שאותו חזה לוריא. השינוי שהתגלה הוא קבוצת **מתיל** ( $\text{CH}_3$ ) שאותה מוסיפים אנזימי שינוי מסוימים הנקראים מתילאזות לבסיס אדנין (A) או לבסיס ציטוזין (C) (ראו איור 22.2). אנזימי שינוי אלה מוסיפים את קבוצת המתיל באתרים בני 4-8 בסיסים הנקראים **אתרי הגבלה** (Restriction Sites) (על שם תופעת ההגבלה). לאתרי הגבלה "יחודיים" רצף DNA ייחודי. אתרי הגבלה ניתן למצוא ב-DNA מכל מקור, ובכלל זה ב-DNA של חיידקים וב-DNA של בקטריופאג'ים. קבוצת המתיל שבאתרי הגבלה מסוימים עשויה להגן מפני אנזימים אחרים הנקראים אנזימי הגבלה. **אנזימי ההגבלה** מזהים את הרצף באתר ההגבלה וחותכים בו רק אם **אין** בו מתיל. החוקר הראשון שבודד אנזים הגבלה החותך באתר הגבלה "יחודי", היה המילטון סמית' (Hamilton Smith).

בידודם ואפיונם של מתילאזות ושל אנזימי הגבלה אפשר להסביר את תופעת ההגבלה במונחים מולקולריים. הסתבר כי חיידק נתון יכול לבטא מתילאזה "יחודית" ה"משנה" את ה-DNA ומוסיפה לו מתיל באתר הגבלה **מסוים**. בו בזמן החיידק מבטא (מייצר) גם אנזים הגבלה "יחודי" המסוגל לחתוך באותו אתר הגבלה רק אם אין עליו קבוצת מתיל. בדרך זו ה-DNA של החיידק מוגן באמצעות קבוצת המתיל מפני אנזים ההגבלה שלו עצמו. אך אנזים ההגבלה אינו "מיותר": אנזים ההגבלה של החיידק הוא ה"נשק" שבידי החיידק המשמש לחיתוך ה-DNA של בקטריופאג'ים. חיתוך זה יתאפשר במקרה שבו ל-DNA של הבקטריופאג' אין מתיל באתר ההגבלה המזוהה על-ידי אנזים ההגבלה של החיידק. במקרה כזה לא יוכל הבקטריופאג' להתרבות בחיידק ולפרוק. התופעה זכתה לכינוי "הגבלה ושינוי" ("Restriction and Modification") (ראו דוגמה באיור 22.2). החוקרים ארבר וסמית' זכו בשנת 1978 בפרס נובל על פינוח מנגנון ההגבלה והזיהוי של אנזימי ההגבלה. לוריא, "חוזה אנזימי ההגבלה", זכה בפרס נובל עוד בשנת 1969 על עבודתו בתחום המבנה והריבוי של וירוסים. אנזימי ההגבלה הם כלי הכרחי בהנדסה גנטית. מה הם מאפייניהם הבולטים?

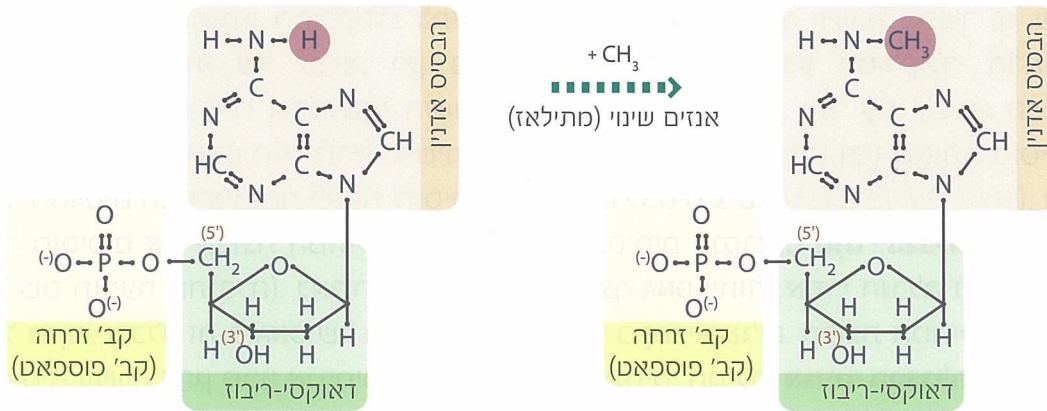
## העוצמה היא במגוון: סוגים שונים של אנזימי הגבלה וסוגים שונים של חיתוך

**אנזימי הגבלה** מקורם בחיידקים, והם חותכים DNA ברצפי בסיסים מסוימים הקרויים **אתרי הגבלה**. תכליתם של אנזימי ההגבלה כשהם בחיידקים היא לחתוך DNA של וירוסים (בקטריופאג'ים) מסוימים התוקפים אותם ובכך להגביל את התרבותם בחיידקים (איורים 22.1 ו-22.2). העוסקים בהנדסה גנטית משתמשים באנזימי ההגבלה כדי לחתוך במבחנה DNA לצורך קבלת מקטעי DNA קצרים המסייעים

□ שלמות ה-DNA של הבקטריופאג' הכרחית לשם התרבות הבקטריופאג' בחיידק, והתרבות זו מביאה לפירוק החיידק.

בביצוע מספר תהליכי יסוד בהנדסה גנטית. כל אנזים הגבלה ייחודי מזהה אתר הגבלה בעל רצף בסיסים מסוים שאורכו לרוב 4, 6 או 8 בסיסים. אנזים ההגבלה נקשר לאתר ההגבלה המסוים שאותו הוא מזהה וחותר את ה-DNA בתוך רצף אתר ההגבלה (ראו איור 2.3). החיתוך מתבצע על-ידי פירוק קשר פוספודיאסטרי בין שני נוקלאוטידים בכל אחד משני גדילי ה-DNA.

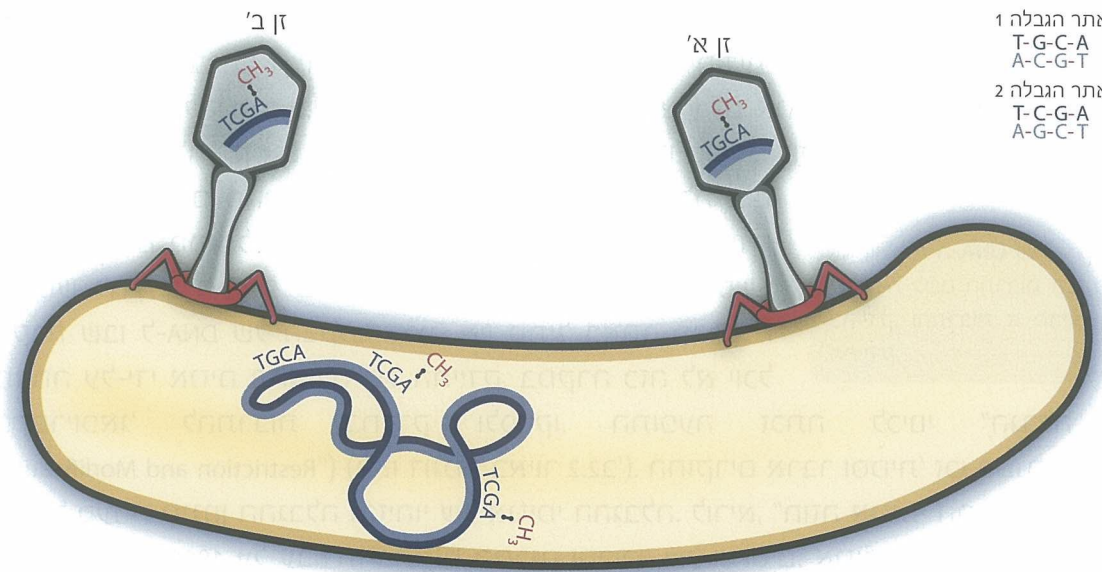
א.



נוקלאוטיד עם הבסיס החנקני אדנין

נוקלאוטיד שבו הבסיס החנקני אדנין מכיל מתיל

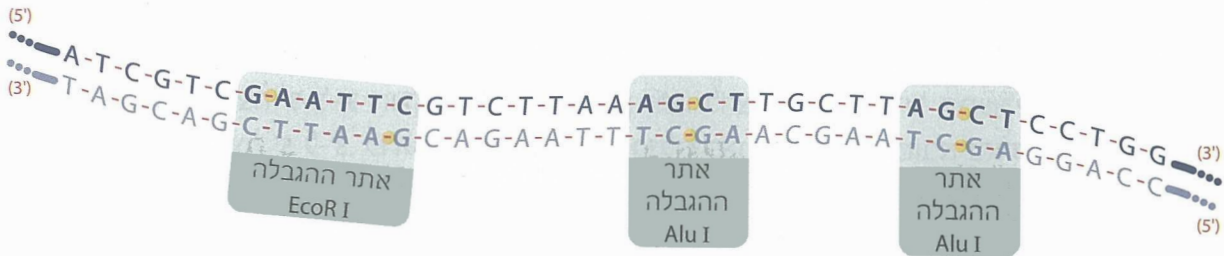
ב.



**איור 2.2: שינוי בסיסים על-ידי קבוצת מתיל (CH<sub>3</sub>), וההשלכות של מיקום השינוי ב-DNA על יחסי הגומלין בין בקטריופאג'ים ובין חיידקים.**

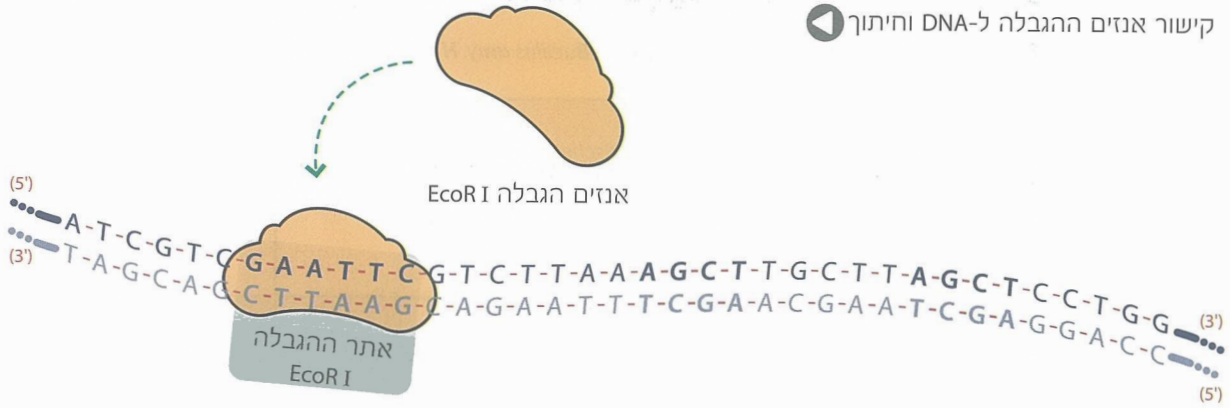
- א. מראה אדנין ואדנין שהוספה לו קבוצת מתיל.
- ב. דוגמה לתופעת ההגבלה: מתילאז מסוים קבוצת מתיל לאחד משני בסיסים - לאדנין או ציטוזין - באתר הגבלה מסוים בלבד. באיור זה קיים פירוט אודות שני אתרי הגבלה הקיימים בחיידק ובכל אחד מהבקטריופאג'ים. כמו כן מצוין באיור כי המתילאז של החיידק מוסיף קבוצת מתיל לאדנין ברצף TCGA. לבקטריופאג' אין מתילאז, והוא עובר מתילאציה בחיידק שבו הוא נוצר. על פי איור זה, זן א' של הבקטריופאג' לא יוכל להתרבות בחיידק, ואילו זן ב' יוכל. כל זאת בשל העובדה כי בניגוד לזן א', לזן ב' ולחיידק יש מתיל באותו אתר הגבלה (אתר הגבלה מספר 2). בנוסף, אנזים ההגבלה של החיידק יכול לחתוך באתר זה רק אם אין בו מתיל כמו בבקטריופאג' מזן א'. לכן בקטריופאג' מזן א' לא יוכל להתרבות.

◀ מקטע DNA מיועד לחיתוך



אתר הקשר הפוספודיאסטרי המיועד לחיתוך על-ידי אנזים ההגבלה

◀ קישור אנזים ההגבלה ל-DNA וחיתוך



◀ היפרדות קצוות ה-DNA לאחר החיתוך



◀ סוגים שונים של חיתוך



**איור 2.3: חיתוך DNA על-ידי אנזימי הגבלה.**

החיתוך באמצעות אנזים ההגבלה EcoRI (אי-קו-וואן) הוא חיתוך המותיר קצוות עם זנב DNA חד-גדילי, ובשל מראה הקצוות הוא נקרא "חיתוך מדורג". לעומת זאת החיתוך ב-Alu I מביא ליצירת קצוות בעלי מראה חלק.

אנזים ההגבלה חותך קשר פוספודיאסטרי בין שני נוקלאוטידים בכל אחד משני גדילי ה-DNA (איור 2.3).

רצף הבסיסים באתר ההגבלה הוא רצף מסוג פלינדרום. **פלינדרום** הוא רצף הנקרא בצורה זהה מימין לשמאל ומשמאל לימין. לדוגמה, המילים שמש, אבא, אמא, המשפט "ילד כותב בתוך דלי" והמספר 12321 הם פלינדרומיים. אתר פלינדרומי ב-DNA כולל את שני הגדילים. זהו אתר שבו הרצף בגדיל המקודד מקצה 5' ל-3' הנקרא משמאל לימין זהה לרצף המצוי בגדיל המשלים והנקרא מימין לשמאל, גם כן מקצה 5' ל-3'. לדוגמה, לגבי אתר ההגבלה לאנזים EcoR I המובא באיור 2.3, רצף הגדיל האחד הנקרא משמאל לימין (GAATTC) זהה לרצף הגדיל האחר הנקרא מימין לשמאל (CTTAAG). בטבלה 2.1 מצוי פירוט לגבי אנזימי הגבלה מקובלים בשימוש ומידע לגבי מיקום החיתוך שלהם בתוך אתר ההגבלה. עד כה בודדו כמה מאות אנזימי הגבלה העומדים לרשותו של הביולוג המולקולרי.

שם האנזים	שם החיידק שממנו בודד האנזים	אתר החיתוך ואופן החיתוך
BamH I	<i>Bacillus amy. H</i>	5' G GATCC 3' 3' CCTAG G 5'
EcoR I	<i>Escherichia coli RY13</i>	5' G AATTC 3' 3' CTTAAG G 5'
Hae II	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5' PuGCGC Py 3' 3' Py CGCGPu 5'
Hae III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5' GG CC 3' 3' CC GG 5'
Hha I	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	5' GCG C 3' 3' C GCG 5'
Hind III	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	5' A AGCTT 3' 3' TTCGA A 5'
Hpa I	<i>Haemophilus paraifluenzae</i>	5' GTT AAC 3' 3' CAA TTG 5'
Not I	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	5' GC GGCCGC 3' 3' CGCCGG CG 5'
Pst I	<i>Providencia stuartii 164</i>	5' CTGCA G 3' 3' G ACGTC 5'
Sal I	<i>Streptomyces albus G</i>	5' G TCGAC 3' 3' CAGCT G 5'

### טבלה 2.1: אנזימי הגבלה, שם החיידק שממנו בודדו ואתרי ההגבלה שלהם.

- Pu - פורין: אדנין (A) או גואנין (G)
- Py - פירימידין: ציטוזין (C) או תימין (T)
- | - מיקום החיתוך של גדיל ה-DNA (מקום פירוק הקשר הפוספודיאסטר).

כמתואר בטבלה 2.1 ובאיור 2.3, אנזים הגבלה יכול לחתוך באחד משני אופנים עיקריים. כאשר החיתוך נעשה מימין ומשמאל למרכז אתר ההגבלה הפלינדרומי, כמודגם באיור 2.3 לגבי האנזים EcoR I, מראה הקצוות של ה-DNA לאחר היפרדם הוא כשל מדרגה, ולכן חיתוך זה נקרא **"חיתוך מדורג"**. בחיתוך מדורג מתקבל בכל אחד מקצוות ה-DNA "זנב" של DNA חד-גדילי. לחד-גדיל שנוצר יש נטייה להיצמד ("להידבק") לחד-גדיל בעל רצף משלים. לפיכך, קצוות של חיתוך מדורג נקראים גם **"קצוות דביקים"**. לעומת זאת, בעקבות חיתוך על-ידי האנזים Alu I הנעשה באמצע אתר ההגבלה, מתקבלים לאחר החיתוך קצוות DNA בעלי מראה חלק (כמודגם באיור 2.3), ולכן החיתוך נקרא **"חיתוך חלק"**.

שמותיהם של אנזימי ההגבלה השונים נגזרים בדרך כלל מהאות הראשונה של סוג החיידק ומשתי האותיות הראשונות של סין החיידק. כך, לדוגמה, האנזים Sal I הוא אנזים הגבלה שבודד מהחיידק *Streptomyces albus*, והספירה הרומית אחת (I) מציינת את העובדה כי זהו האנזים הראשון שבודד מחיידק זה.

## שאלה 2.1

- אילו אנזימים המופיעים בטבלה 2.1 מייצרים קצוות חלקים ואילו מייצרים קצוות מדורגים?
- התבוננות מקרוב מגלה כי מתקבלים שני סוגי חיתוך מדורג על-פי סוג הקצוות הדביקים הנוצרים. ישנם אנזימים המייצרים חד-גדיל שקצהו 3' ואנזימים המייצרים חד-גדיל שקצהו 5'. אתרו את האנזימים בטבלה 2.1 המשתייכים לכל אחד מהסוגים. רמז: התבוננו שוב בחד-גדיל שבאיור 2.3.

## שאלה 2.2

נניח שחשפתם מקטע DNA מסוים ל-7 אנזימי הגבלה שונים. באיור **ש'-2.2** מוצגים סכמטית מקטעי ה-DNA שהתקבלו בעקבות החיתוך. המספר של המקטעים אינו מייצג את הסדר שלהם במקטע ה-DNA המקורי.

א. סדרו מחדש את המקטעים שבאיור **ש'-2.2** על פי מיקומם במקטע המקורי.  
**רמז:** ודאו שלאחר "הסידור" התקבלו אתרי הגבלה פלינדרומיים.

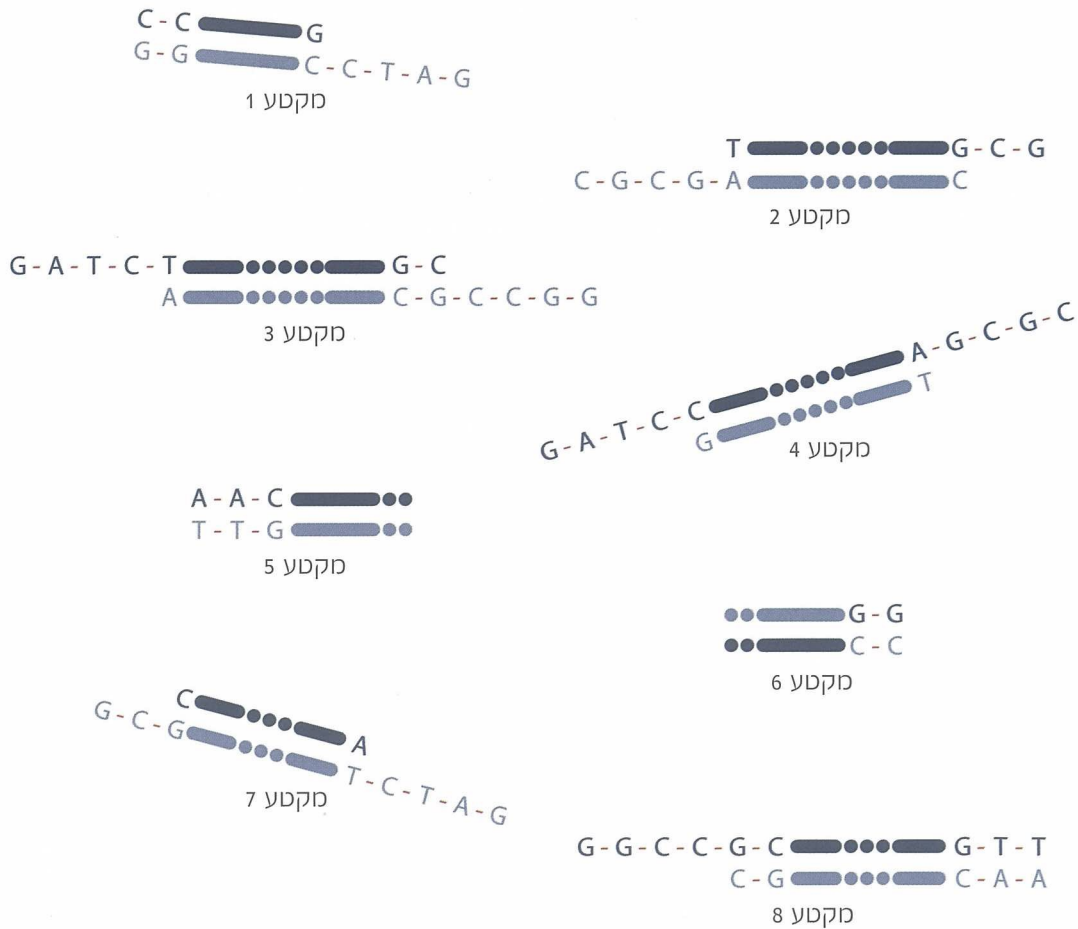
- אתרו את זוגות המקטעים שההפרדה ביניהם נוצרה על-ידי אנזים הגבלה ייחודי ששמו מופיע בטבלה 2.1.
- ישנם תוצרי חיתוך מבין אלה שבאיור **ש'-2.2** שיש להם נטייה "להתחבר" זה לזה למרות שביצירתם היו מעורבים אנזימי הגבלה שונים – מי הם?

## שאלה 2.3

אתרי הגבלה ממוקמים ב-DNA באופן אקראי, והסיכוי למצוא אתרי הגבלה מסוימים במקטע מסוים נגזר מחוקי הסתברות פשוטים. בידיכם מקטע DNA, שגודלו לדוגמה 30,000 זוגות בסיסים (30 קילו בסיסים, 30kb). איזה מבין האנזימים הבאים אמור על פי חוקי ההסתברות לחתוך מספר רב יותר של פעמים:

א. Hae III      ב. EcoR I      ג. Not I

רמז: התבוננו בטבלה 2.1 ובררו מכמה בסיסים מורכב אתר ההגבלה של כל אחד מהאנזימים.



**איור ש'-2.2: מקטעי DNA קצרים, תוצרי חיתוך מקטע DNA באמצעות 7 אנזימי הגבלה שונים.**  
 מה הסדר המקורי של המקטעים שבאיור?

## אפיון ראשוני של מולקולת DNA: חיתוך, הפרדת מקטעי DNA בג'ל ומפות הגבלה

□ מקובל לאזכר "מקטע DNA" או "מולקולת DNA", בשפת יחיד, אך כמעט תמיד מתכוונים להרבה עותקים זהים של אותה מולקולת DNA/מקטע DNA. בהנדסה גנטית עובדים תמיד עם מספר רב של עותקים של מולקולת DNA נחקרת, שכן מולקולת DNA אחת ויחידה תאבד במהלך העבודה. בנוסף, כדי לזהות ולאפיין את האמצעים מקובלים, דרוש מספר רב של עותקים מכל מולקולה.

תת-הפרק הקודם עסק ביכולתם של אנזימי הגבלה מקובלים בשימוש לחתוך את DNA באתר הגבלה ייחודי ובאופי תוצרי החיתוך. אחד השימושים של אנזימי הגבלה הוא אפיון ראשוני של מולקולת DNA מסוימת (מקטע DNA מסוים). האפיון הראשוני של מקטע DNA כולל קביעת מיקומם של אתרי הגבלה שונים במקטע, ומידע זה מאפשר להכין **מפת הגבלה**. לצורך הכנת מפת הגבלה של מקטע מסוים באמצעות אנזימי הגבלה, יש לחשוף את מקטע ה-DNA למספר אנזימי הגבלה מקובלים בשימוש.

כמו כן יש לשאול לגבי כל אנזים את השאלות הבאות:

1. האם מקטע ה-DNA נחתך?
2. כמה מקטעי DNA נוצרו לאחר החיתוך?
3. מה גודלם של מקטעי ה-DNA שהתקבלו?

כיצד מכינים מפת הגבלה?

באיור 2.4 מתוארים שלבים ראשוניים לקראת הכנת מפת הגבלה של מקטע DNA מסוים שגודלו 6,000 בסיסים (6Kb). בשלב הראשון מדגירים במקביל "מנות" של מקטע ה-DNA עם אנזימי הגבלה שונים (ב-37°C ובנוכחות בופר מתאים). אם רצף ה-DNA של המקטע המיועד לאפיון מכיל אתר הגבלה אחד או יותר המזוהה על-ידי האנזים הנבדק, תתקבל במבחנה תערובת מקטעים קטנים מ-6Kb. כדי לאפיין את מספרם וגודלם של המקטעים שהתקבלו לאחר החיתוך, מפרידים אותם בג'ל באמצעות שדה חשמלי. הסבר מפורט אודות הפרדת מקטעי DNA בג'לים באמצעות שדה חשמלי (**אלקטרופורזה בג'ל**) מצוי בתיבה 2.1. בקצרה, השדה החשמלי שבו נתונים הג'ל ומקטעי ה-DNA, מאפשר למקטעים לנוע על פי גודלם: ככל שהמקטע גדול יותר, מרחק הנדידה שלו בזמן נתון קטן יותר, ולעומתו ינוע מקטע קטן למרחק רב יחסית. באיור 2.4 מתואר סכמטית ג'ל ובו מקטעי ה-DNA שעברו הפרדה זה מזה.

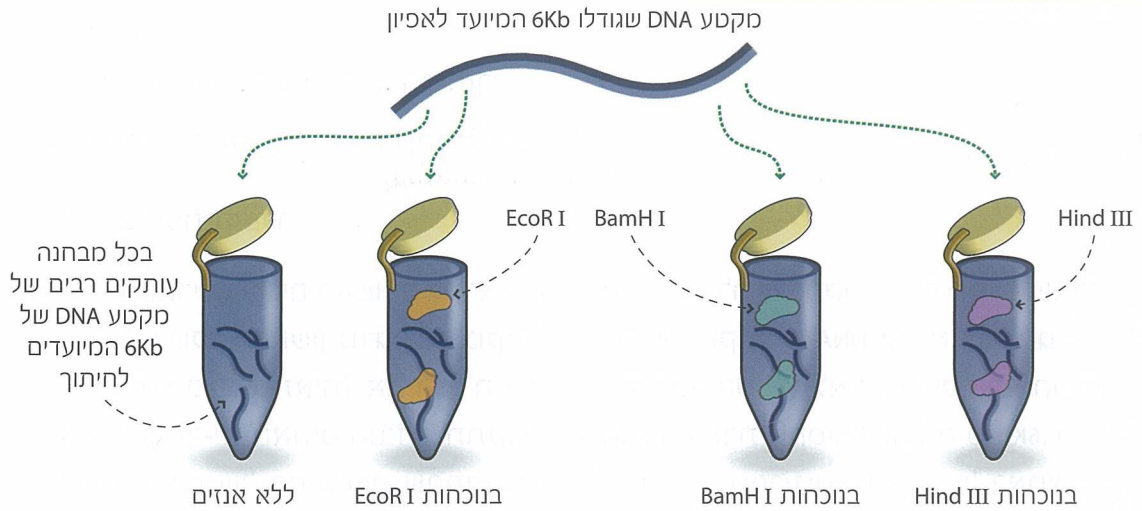
תוצאות הניסוי המודגם באיור 2.4 מלמדות כי ככל הנראה מקטע ה-DNA איננו מכיל אתר הגבלה המזוהה על-ידי האנזים Hind III. לעומת זאת, החיתוך באמצעות כל אחד מהאנזימים EcoR I ו-BamH I הביא ליצירת 2 מקטעי DNA, ולכן ניתן להסיק כי ל-EcoR I ול-BamH I יש אתר חיתוך אחד ודאי במקטע זה. ניתן להעריך את גודלם של מקטעי ה-DNA שהתקבלו לאחר החיתוך באמצעות השוואה בין מרחק הנדידה של המקטעים השונים בג'ל למרחק הנדידה של מקטעי ה-DNA שהגדלים שלהם ידועים מראש ("סולם DNA" באיור 2.4). המידע על מספרם וגודלם של מקטעי ה-DNA שהתקבלו לאחר החיתוך באנזימי ההגבלה, מאפשר לנו ליצור "מפת הגבלה" של מקטע ה-DNA המקורי. **מפת הגבלה** של מולקולת DNA מסוימת מתארת את מיקומם של אתרי ההגבלה השונים במולקולת ה-DNA והמרחק ביניהם.

□ נוהגים ליצור מפת הגבלה בשלב מוקדם יחסית של המחקר, שכן המפה מאפשרת לתכנן באילו אנזימים אפשר לחתוך את מקטע ה-DNA הנחקר, כדי "לחלץ" מתוכו תתי-מקטע שאותם מעוניינים לחקור בנפרד (פרק 3).

המשך הליך הכנת מפת ההגבלה של מקטע ה-6Kb מתואר באיור 2.5. באיור 2.5 מתוארות שתי מפות הגבלה אפשריות למקטע ה-6Kb שהתקבלו מעיבוד המידע שהוצג באיור 2.4. כדי לקבוע את מיקומם של אתרי ההגבלה ל-EcoR I ול-BamH I זה ביחס לזה, יש לחתוך את מקטע ה-DNA באמצעות שני האנזימים BamH I ו-EcoR I כשהם באותה מבחנה ("חיתוך כפול"). תוצאות החיתוך הכפול מתוארות באיור 2.5. עיבוד מידע נוסף זה ביחס

לאפשרויות שהובאו בחלק א' של האיור, מאפשר לקבוע את מפת ההגבלה למקטע הנבחן שבה יופיעו אתרי ההגבלה של שני האנזימים שנבחנו (איור 2.5ג). ניתן לבצע חיתוך באמצעות אנזימים נוספים, כדי לקבל מפת הגבלה מפורטת יותר. שימושים למפות הגבלה מתוארים בפרק 3.

א. חיתוך מקטע DNA על-ידי אנזימי הגבלה



טפטוף דגימה מכל מבחנה לבור בג'ל

ב. הפרדת מקטעי DNA על פי גודלם בג'ל אגרוז



**איור 2.4: איתור אתרי הגבלה במקטע DNA – חיתוך DNA באמצעות אנזימי הגבלה והפרדת מקטעי DNA באמצעות אלקטרופורזה בג'ל אגרוז.**

- א. מדגירים DNA עם אנזימי הגבלה ומעבירים מעט מה-DNA ששהה עם אנזימי הגבלה לתוך בור בג'ל.
- ב. מעבירים זרם חשמלי דרך הג'ל והנוזל שבו הוא נמצא. ככל שהמקטע קטן יותר, כך הוא נע למרחק רב יותר מהבור.

לקראת מפת הגבלה: לאחר חיתוך מקטע ה-DNA על ידי אנזימי ההגבלה, מאפיינים את מקטעי ה-DNA שהתקבלו. משתמשים לצורך כך בעיקרון של הפרדת מקטעי DNA על פי גודל. הפרדה זו של מקטעי ה-DNA נעשית באמצעות שיטת השדה החשמלי בג'ל (אלקטרופורזה בג'ל) (איור 2.4 ותיבה 2.1).



**א. לקראת הכנת מפת הגבלה של מקטע ה-DNA שאורכו 6Kb בהתבסס על התוצאות באיור 2.4**

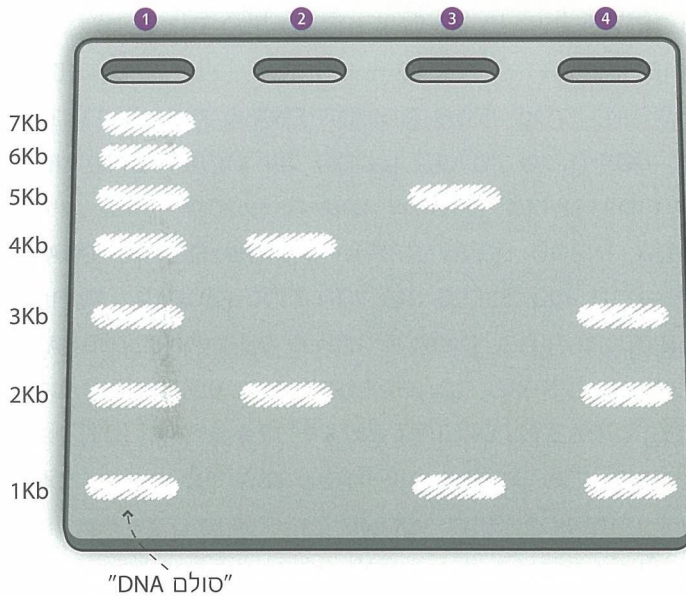
1. על פי המידע מהג'ל (איור 2.4 ב') ניתן למקם במפה את אתר ההגבלה של האנזים EcoRI



2. היכן נמצא אתר החיתוך של האנזים BamHI?



**ב. להשלמת המפה יש צורך ב"חיתוך כפול" של מקטע ה-DNA של ה-6Kb**



- 1 מקטעי DNA בגדלים ידועים מראש
- 2 תוצאת חיתוך מקטע ה-DNA על-ידי EcoRI
- 3 תוצאת חיתוך מקטע ה-DNA על-ידי BamHI
- 4 תוצאת חיתוך מקטע ה-DNA על-ידי EcoRI ו-BamHI ("חיתוך כפול")

**ג. מפת ההגבלה למקטע ה-DNA של ה-6Kb**



**איור 2.5: הכנת מפת הגבלה של מקטע DNA מסוים (מקטע של 6Kb המתואר באיור 2.4).**

מכינים את המפה על סרך אפיון תוצרי החיתוך בג'ל. המספרים מציינים את מספר הבסיסים ב-DNA.

## תיבה 2.1 : אלקטרופורזה בג'ל לצורך הפרדת מקטעי DNA על פי גודלם

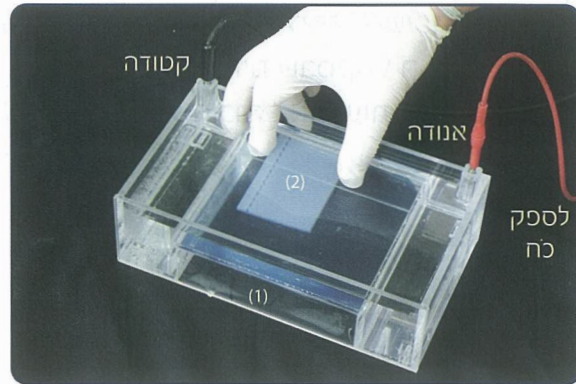
כדי לאפיין את גודלם של מקטעי DNA וכדי לבדוד מקטעי DNA מסוימים, משתמשים בעיקרון של הפרדת מקטעי DNA על פי גודלם. השיטה המקובלת להפרדת מקטעי DNA על פי גודלם, המאפשרת גם "לראותם", היא שיטה הקרויה **אלקטרופורזה בג'ל** (Gel Electrophoresis). ג'ל טיפוסי מורכב מאגרוז ובמרקמו הוא מזכיר ג'לי למאכל. אלקטרופורזה פירושה הפרדה בשדה חשמלי. באיור 2.6 תוכלו לראות ג'ל העשוי מאגרוז בזמן הכנסתו למתקן המכיל תמיסה מימית עם מלחים ב-pH קבוע (בופר) המעבירה זרם חשמלי. ג'ל אגרוז מכינים על-ידי הרתחת אבקת אגרוז בבופר מתאים וציון תמיסת האגרוז בתבנית הקובעת את ממדי הג'ל לאחר ההיקרשות. לפני שהאגרוז נקשר מכניסים לתוכו "מסרק עם שיניים רחבות יחסית" המאפשר יצירת בארות בחלקו העליון של הג'ל (דמיינו שלגון, "ארטיק", שהוצא ממנו המקל: שם נוצרת "באר" אחת). בעת הכנת הג'ל מוסיפים לאגרוז חומר זוהר בעל יכולת להיקשר ל-DNA, כדוגמת אתידיום ברומיד.

כיצד מפרידים בג'ל מקטעי DNA על פי גודלם? לתוך הבארות שבג'ל מכניסים בזהירות דגימות DNA (איור 2.6א). מעבירים זרם חשמלי דרך המתקן שבו נתונים הבופר והג'ל. הזרם החשמלי גורם למולקולות ה-DNA הטעונות מטען שלילי לנוע לעבר האנודה, שהיא האלקטרודה הטעונה מטען חיובי (מקורו של המטען השלילי של ה-DNA הוא בקבוצות הזרחה שבו). כפי שמודגם באיור 2.6ב, מקטעי ה-DNA הקטנים נודדים למרחק רב יותר מהבאר בהשוואה למקטעי ה-DNA הגדולים שמרחק הנדידה שלהם מהבאר קטן יחסית. מדוע מקטעי DNA קטנים נעים למרחק רב יחסית בג'ל? הג'ל הוא פולימר בעל מבנה נקבובי, שניתן לדמותו לספוג. ככל שמקטע ה-DNA קטן יותר, קל לו יותר "לחמוק" בתוך "הנקבים" באגרוז, ולכן הוא נודד למרחק רב יותר בהשוואה למקטע גדול. לאחר זמן מה מוציאים את הג'ל מהמתקן ומאירים אותו באור אולטרה סגול (UV) (איורים 2.6ב ו-2.6ג). ניתן להבחין בפסים בצבע זוהר במקומות שבהם נמצאים מקטעי DNA. הסיבה לכך היא שבזמן שה-DNA נע בג'ל, נקשר אליו האתידיום ברומיד. האור האולטרה-סגול שמאירים בו את הג'ל מאפשר לנו להבחין בזהירה של האתידיום ברומיד שריכוזו ב-DNA גבוה מזה שבג'ל, וכך אנו יכולים לראות את המיקום שאלינו נדדו מולקולות ה-DNA. כל פס כתום זוהר בג'ל (שמופיע בלבן בתצלום שחור-לבן) מכיל מולקולות DNA בגודל מסוים. בג'ל המוצג בחלק ג' של איור 2.6 ניתן לראות פסים זהירים עבים ולידם פסים דקים שעוצמת הזהירה שלהם נמוכה יחסית. ככלל, ככל שהפס עבה וזוהר יותר, יש בו יותר DNA.

שימו לב: האתידיום ברומיד הוא חומר רעיל ועלול לסרטן, ולכן אסור לגעת בו בידיים חשופות.

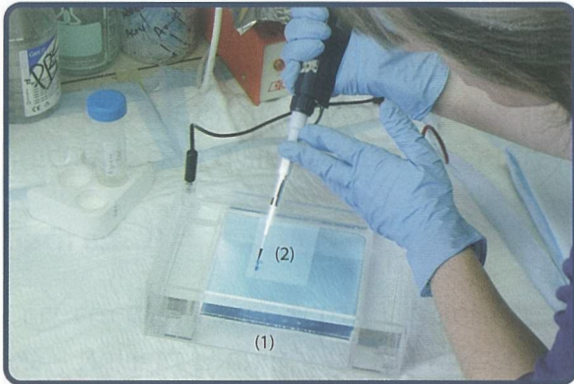
היום אין אפשרות לדעת האם שיטת הפרדה זו תהיה בשימוש גם בעתיד הרחוק, או שתימצאנה שיטות נוחות וזולות יותר.

**א.1. מוקמים ג'ל במתקן הפרדה המאפשר העברת זרם (מתקן אלקטרופורזה)**



(1) מתקן ובו בופר (2) הג'ל ובו 12 בארות

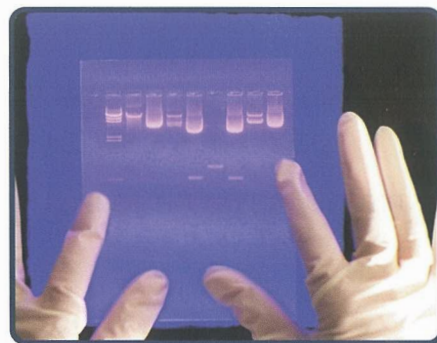
**א.2. הטענת דוגמה ובה DNA לתוך באר בג'ל**



**ב. נדידה של מקטעי DNA בג'ל**



**ג. ג'ל המכיל DNA על שולחן אור UV**



**איור 2.6: הפרדה של מקטעי DNA על פי גודלם באמצעות אלקטרופורזה בג'ל אגרוז.**

- א. הכנסת ג'ל אגרוז לתוך מתקן אלקטרופורזה והטענת DNA בבארות שבג'ל.
- ב. תיאור סכמטי של הפרדת מקטעי DNA בבאר אחת בג'ל המכחיש את העיקרון של תנועת מקטעים על פי גודלם. ככל שהמקטע קטן יותר, הוא נודד למרחק רב יותר.
- ג. ג'ל אמיתי ובו מקטעי DNA שונים כשהוא מואר באור UV. פסים זוהרים שונים מייצגים מקטעי DNA שונים בגדלים שונים. מה המשמעות של ההבדלים בעובי הפסים ובעוצמות הזהירה? התשובה בתיבה 2.1.

ג'ל האגרוז שנועד לאפשר הפרדה של מקטעי DNA שונים מכיל חומר הזוהר כשהוא מואר באור UV והיכול להיקשר ל-DNA. עקב כך מתקבל ריכוז גבוה יחסית של החומר הזוהר ב-DNA המאפשר - עם הארה ב-UV - לראות את המיקום שאליו נדדו מקטעי ה-DNA השונים (איור 2.6).

## שאלה 2.4

כשמכינים מפת הגבלה יש להביא בחשבון שזו מפה משוערת. לדוגמה, אם לאחר השיפה של מקטע DNA מסוים לאנזים מסוים אין רואים שינוי בגודל מקטע ה-DNA בג'ל, מניחים שבמקטע הנבחן אין אתר חיתוך לאנזים הזה. מה הן הסיבות האפשריות לכך שמפת הגבלה שהוכנה באמצעות שימוש באנזימי הגבלה היא מפה משוערת בלבד? מנו לפחות שתי סיבות.

## שאלה 2.5

כדי לתרגל את אופן הכנתה של מפת הגבלה, הניחו כי במולקולת DNA אחרת שאורכה אף הוא 6Kb – אפשרות ב' באיור 2.5א' היא האפשרות הנכונה.

א. כמה פסים של DNA יתקבלו בג'ל לאחר חיתוך כפול של מולקולת ה-DNA האחרת ב-BamH I-I EcoR I-I?

ב. מה יהיה גודלם של מקטעי ה-DNA בפסים אלה?

ג. מה מייחד מיתר הפסים את הפס המייצג את ה-DNA בעל המשקל המולקולרי הנמוך (הפס במרחק הרב ביותר מהבאר)?

## שאלה 2.6

אפיין מקטע DNA שאורכו 6.6Kb על-ידי אנזימי ההגבלה Sma I-I Hind III הביא לתוצאות הבאות:

1. לאחר חיתוך ב-Hind III התקבלו מקטעים בגודל 0.4Kb-I 4.2Kb, 2Kb.
2. לאחר חיתוך ב-Sma I-I התקבלו מקטעים בגודל 0.3Kb-I 3.6Kb.
3. לאחר חיתוך כפול באנזימים Sma I-I Hind III התקבלו מקטעים בגדלים של 0.4Kb-I 3.2Kb, 2Kb, 1Kb.

א. שרטטו ג'ל ובו תוצאות החיתוכים הנ"ל לצד מקטע DNA לא חתוך ולצד טור ובו מולקולות DNA בגדלים ידועים מראש ושמשמשות כסמנים בגדלים של 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 Kb.

ב. הרכיבו מפת הגבלה למקטע DNA זה שאורכו 6.6Kb וציינו בה את המיקום שבו חותכים האנזימים Sma I-I Hind III.

## שאלה 2.7

ג'ל אגרוז מצוי בסביבה נוזלית. לג'ל מבנה נקבובי. מקטעים גדולים מתקשים לנוע בו, בעוד שמקטעים קטנים יותר נעים למרחק רב יחסית בזמן נתון. נזקקתם להפרדה של מקטעים קטנים מאוד ובמיוחד להפרדה בין מקטעים שגודלם 200 ו-300 בסיסים. עושים זאת בג'ל טיפוסי שבו ריכוז האגרוז הוא 1%. הפרדה בין מקטעים קטנים שכאלה התבררה כקשה, ושני המקטעים הופיעו כפס אחד. מה ניתן לעשות כדי לאפשר בכל זאת את ההפרדה והזיהוי של המקטעים הללו?

באיור ש'-2.8 מתואר רצף נוקלאוטידים ב-DNA (פרק 5 עוסק בדרך קביעתו של רצף DNA). מקורם של רצפי ה-DNA המתוארים הוא באזור נתון ב-DNA של שני פרטים שונים של אותו מין, לדוגמה, של עכבר.



### איור ש'-2.8: שונות ברצף DNA בין שני פרטים של אותו אורגניזם.

האם יש דרך מהירה לאפיין שונות זו בפרטים אחרים?

- א. אתרו את ההבדלים בין הרצפים של שני הפרטים. בכל הנוגע לרצף הנדון, הניחו כי בפרטים אחרים באוכלוסייה תיתכן רק אחת משתי הגרסאות המתוארות באיור.
- ב. לו רציתם לאפיין את הרצף באותו אזור אצל פרט שלישי (האם הרצף זהה לזה של פרט א' או של פרט ב'), באילו מבין הכלים שאתם מכירים עד כה הייתם משתמשים? ציינו את שם הכלי שבו עליכם להשתמש.
- ג. האם לדעתכם ההבדלים ברצף בין הפרטים מעידים בהכרח על מוטציה?



## עיקרי הפרק

## כלים ב"ארגז הכלים"

- חיידקים (Bacteria)
- בקטריופאגים
- אנזימי הגבלה (Restriction enzymes)
- ג'ל אגרוז
- מתקן אלקטרופורזה

## חומרים

- אגרוז
- אתידיום ברומיד

## אתרי אינטרנט

New England החברה - אתר [www.neb.com](http://www.neb.com)  
 Biolabs המספקת בין היתר אנזימי הגבלה;  
 ראו בעיקר קטלוג אנזימי הגבלה והמידע  
 הטכני שבו. השתמשו ב-Enzyme finder.

## עקרונות

- אפיון מקטע DNA באמצעות חיתוכו  
 ואפיון תוצרי החיתוך
- הפרדת מקטעי DNA לפי גודל

## מושגים

- תופעת ההגבלה
- אתר הגבלה (Restriction site)
- חיתוך מדורג
- חיתוך חלק
- קצוות דביקים
- פלינדרום

## שיטות

- חיתוך באמצעות אנזימי הגבלה
- אלקטרופורזה בג'ל

## יישומים

- מפת הגבלה (Restriction map)

# שיבוט DNA באמצעות נשאים

# 03



כהן ובויר היו ל"מהנדסים הגנטיים" הראשונים, אך את מרבית העוסקים בהנדסה גנטית כיום אין סכנים "מהנדסים גנטיים" אלא ביולוגים מולקולריים. הסיבה לכך היא כי ההנדסה הגנטית משמשת כיום בעיקר כלי הפניע תחומי מחקר ויישום. מונונים, ומהמשתמש בהנדסה גנטית נדרש למעשה ידע רב בתחומים נוספים. זה מעולם לא קרה: כהן ובויר מעולם לא עסקו במסחר קמעונאי...

אפיון וחקר ה-DNA הגנומי חייב את חלוצי חקר הגנום להשתמש באנזימי הגבלה. חיתוך ה-DNA הגנומי באנזימי הגבלה מייצר תערובת מקטעים קצרים, ולהמשך עבודת החקר והיישום יש צורך להרבות אותם זה בנפרד מזה. ככלל, רק מקטע DNA מבודד, שאינו ארוך מדי והמצוי בכמות גדולה יכול לשמש למחקר וליישומים אחרים. עד 1972 לא הייתה ידועה דרך לממש בידוד וריבוי של מקטעי DNA קצרים. אולם בשנה זו חל מפנה לאחר שנפגשו הרופא האמריקני סטנלי כהן (Stanley N. Cohen) והמדען האמריקני הרברט בויר (Herbert Boyer), שלימים כונו המהנדסים הגנטיים הראשונים. השניים הגו גישה ניסיונית שאפשרה בידוד וריבוי של מקטע DNA קצר בחיידקים. **בידוד מקטע DNA וריבוי** שלו באורגניזם דוגמת החיידק נקרא **שיבוט** (DNA Cloning). בשיבוט שבו

מעורבים תאים נוצר שבת (Clone) חדש של תאים רבים זהים גנטית, שבכולם כמות ניכרת של מקטע DNA מבודד. הניסיון החלוצי שהגו כהן ובויר שינה את פני הביולוגיה כולה עד לבלי הכר. באילו כלים השתמשו כהן ובויר כדי להשיג שיבוט של מקטע DNA וכיצד השתכללו שיטות השיבוט מאז? על כך ועוד, בפרק זה.

(-): דר' גנטי שסיים את עבודתו במעבדה בשעת ערב מאוחרת, יצא לאכול בחומוסייה מקומית. החומוס שקיבל לא היה טעים והוא קרא מיד למלצר...

"רציית שתדע", אמר גנטי בכעס, "שהחומוס ממש זוועה, הוא מקולקל, וזה אומר שהוא מלא בחיידקים, ותדע לך שבמקצוע שלי החברה היו כבר מזמן מעיפים לך את הצלחת וגם אומרים לך שבחיידקים יש בטח טונה של פלסמידים..."

"וואלה?" אמר המלצר... "קצת התבלבלתי... באמת, אתה הראשון שאומר פלסמידים... חוץ מזה תגיד, פלסמידים היה בתפריט?"

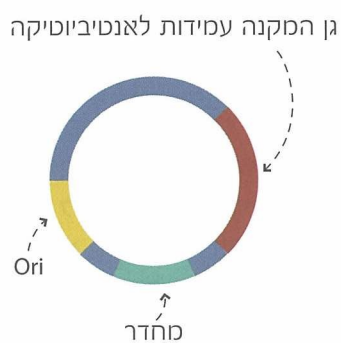
"מה פתאום!" צרח גנטי.

"טוב, אז אני לא מבין מה הבעיה", אמר המלצר, "על פלסמידים לא תשלם..."

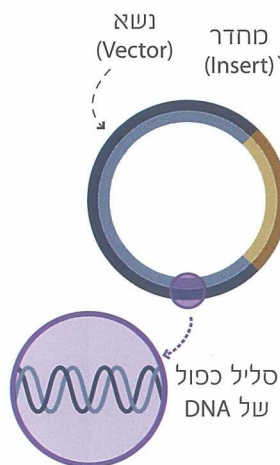
## פלסמידים כנשאים בשיבוט

ה-DNA הגנומי של חיידקים נמצא בכרומוזום אחד מעגלי הבנוי מכמה מיליוני בסיסים. חיידקים עשויים לעתים להכיל מולקולת DNA מעגלית נוספת שאינה חלק מהכרומוזום. מולקולה מעגלית זו בנויה מכמה אלפי בסיסים והיא קרויה **פלסמיד** (איור 3.1). בחיידקים שונים יש לעתים פלסמידים שונים הנבדלים בגודל וברצף ה-DNA שלהם. לכל פלסמיד ייחודי מפת הגבלה ייחודית (איור 3.2).

ג. צורה סכמטית שנייה להצגת פלסמיד



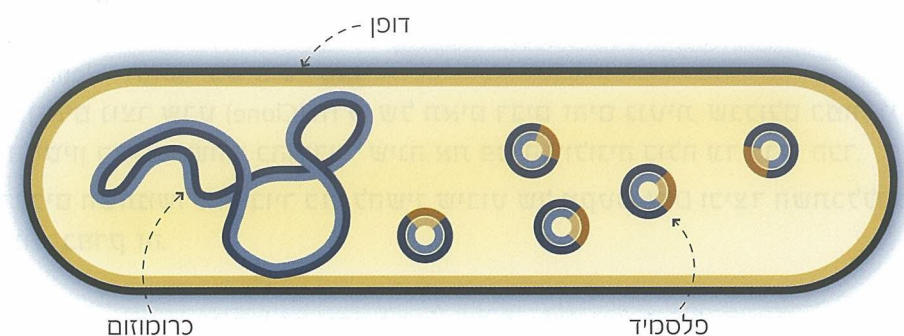
ב. צורה סכמטית אחת להצגת פלסמיד



א. תצלום של פלסמיד



ד. פלסמידים בחיידק; כל פלסמיד קטן בערך פי 1000 מהכרומוזום.

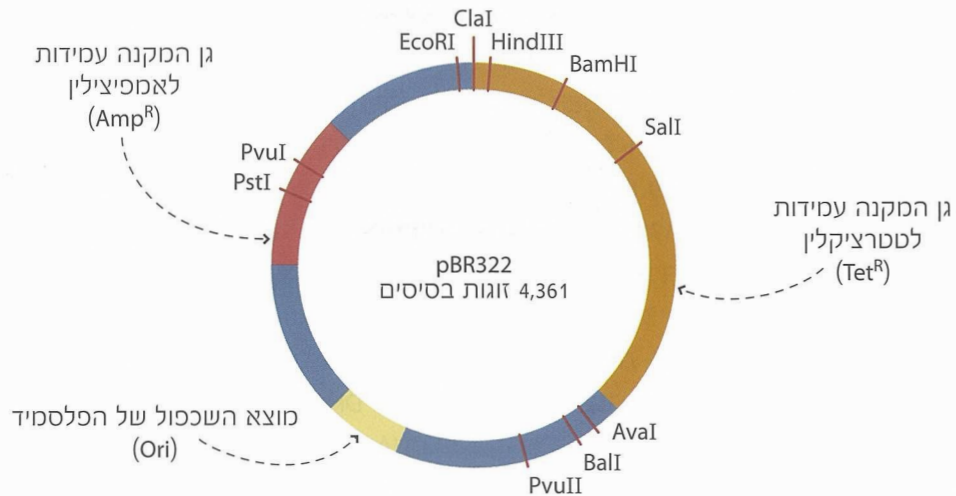


### איור 3.1: דרכים שונות להציג פלסמיד.

למרות הפשטות של כמה מצורות ההצגה של הפלסמיד, אין לטעות באשר לאופי הפלסמיד: הפלסמיד, כמו ה-DNA שבכרומוזום, הוא בעל מבנה של סליל כפול כמוודגם בחלק ב' של האיור.

**פלסמיד** הוא מולקולת DNA מעגלית חוץ-כרומוזומלית קטנה שנעשרות עותקים שלה קיימים בחיידק (איור 3.1). ניתן להוציא את הפלסמיד מהחיידק וניתן בתנאים ניסיוניים מתאימים להעביר פלסמיד לתוך החיידק. הפלסמיד שבחיידק הוא בעל יכולת ריבוי עצמאית.





### איור 3.2: מפת הגבלה של הפלסמיד pBR322.

במפת ההגבלה מצוינים מקצת אתרי ההגבלה השונים, מיקומו של מוצא השכפול והגנים המקנים עמידות לאנטיביוטיקה.

היו אלה רופאים שגילו את תפקידם של הפלסמידים בחיידקים. בשנת 1959 טיפלו רופאים יפניים בחולים במחלת הדיזנטריה, שהיא מחלת מעיים הנגרמת על ידי חיידקים. הרופאים טיפלו בחולים באמצעות אנטיביוטיקה ואכן הצליחו לרפא חולים רבים מכיוון שאנטיביוטיקה מביאה למותם של חיידקים. למרות ההצלחה בריפוי חולים רבים היו הרופאים עדים לכך שהאנטיביוטיקה לא שיפרה את מצבם של חולים אחרים. כלומר, בחולים מסוימים פיתחו החיידקים עמידות לאנטיביוטיקה. כאשר בודדו חיידקים אלה, נתגלה כי בחיידקים העמידים לאנטיביוטיקה נמצאים, בנוסף לכרומוזום החיידקי, גם פלסמידים. מכאן ומנסיונות נוספים ניתן היה להסיק שהפלסמידים הם שהקנו לחיידקים את העמידות לאנטיביוטיקה. כיום ברור כי הפלסמידים מקנים לחיידקים יכולת לשרוד "בסביבה עוינת", לדוגמה סביבה המכילה אנטיביוטיקה. כמו כן חיידקים שונים עשויים להכיל פלסמידים שונים, והפלסמידים השונים נושאים גנים שונים המקנים עמידות לסוגי אנטיביוטיקה שונים. כל גן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה מסוימת מקודד לחלבון ייחודי שמשתתף בפירוק או בנטרול של אותה אנטיביוטיקה.

פלסמידים שימשו נושא למחקר במשך שנים רבות, אך רק בשנת 1972 נמצא להם שימוש מעשי. בשנה זו נכשרו הרופא סטנלי כהן והמדען הרברט בויר בכינוס מדעי והחליטו על שיתוף פעולה ביניהם. כהן, שהתעניין בעמידות שמפתחים חיידקים לאנטיביוטיקה, התמקד בחקר פלסמידים, ואילו בויר התמקד בחקר אנזימי הגבלה. הם הגו את הרעיון לקחת משני חיידקים שונים שני פלסמידים הנבדלים בגודלם וברצף ה-DNA שלהם וליצור מהם פלסמיד שאינו קיים בטבע. הם תכננו לחתוך כל אחד משני הפלסמידים האלה ולערבב את תוצרי החיתוך כדי לאפשר למקטע DNA מפלסמיד אחד להיקשר אל מקטע DNA מהפלסמיד השני. את הפלסמיד החדש שיווצר תכננו לבודד ולהרבות (לשכפל) בחיידקים (שיבוט).

על פי הרעיון של כהן ובויר (כמתואר באיור 3.3), בשלב א' הופקו הפלסמידים השונים מהחיידקים. כל פלסמיד נשא גן שהקנה עמידות לאנטיביוטיקה אחרת. בשלב השני נחתכו שני הפלסמידים השונים באמצעות אותו אנזים הגבלה, והמקטעים שהתקבלו ושמוקרום בשני הפלסמידים השונים עורבבו. המקטעים השונים היו בעלי קצוות דביקים זהים מפני שהם היו תוצרים של חיתוך באמצעות אותו אנזים הגבלה. בעקבות אירוע ההיצמדות, אחד מתוך רבים, שבו שני הקצוות הדביקים של מקטע אחד נצמדו לשני הקצוות הדביקים של מקטע שני, התקבלה מולקולה מעגלית (שלב ב' באיור 3.3). כדי לאפשר **קשירה** קוולנטית בין הקצוות הדביקים של המקטעים וכדי ליצור פלסמיד יציב, הוסף האנזים DNA ליגאז. **DNA ליגאז** יוצר קשר פוספודיאסטרי בין נוקלאוטידים. כהן ובויר וממשיכי דרכם הוכיחו כי בשל האוניברסליות של מבנה ה-DNA, ניתן לאפשר לקצוות דביקים ואף לקצוות חלקים של DNA ממקור מסוים להיצמד לקצוות של DNA ממקור אחר. לתכונה זו של ה-DNA יש חשיבות מיוחדת שכן ההיצמדות מאפשרת קשירה של מקטעי DNA שמקורם באורגניזמים שונים! זהו אחד מעקרונות היסוד של ההנדסה הגנטית המאפשרת יצירת צירופי DNA חדשים הנקראים DNA רקומביננטי (**Recombinant DNA**).

תוצרי הקשירה בניסוי כהן-בויר, הפלסמידים הראשונים מעשה ידי אדם (!), הוחדרו לתוך חיידקים חסרי פלסמיד. החיידקים שקלטו פלסמיד זה או אחר עברו **טרנספורמציה** (Transformation) שמשמעותה שינוי בתכונות הגנטיות של החיידק שקלט את הפלסמיד. כהן ובויר הגשימו ניסוי שבו רק חיידק ובו פלסמיד המקנה עמידות לשני סוגי אנטיביוטיקה שרד (שלב ג' באיור 3.3). פלסמיד כזה יכול להתקבל רק אם הוא תוצר קשירה של מקטעים שמקורם בפלסמידים השונים, כשכל מקטע נושא את אחד הגנים המקנים עמידות לאנטיביוטיקה מסוימת. בחיידק ששרד בנוכחות שני סוגי האנטיביוטיקה, שוכפל הפלסמיד מספר פעמים. כמו כן החיידק התרבה וצאצאיו הכילו אף הם אותם פלסמידים, ולכן מקובל לומר שהפלסמיד עבר **ריבוי**. הפלסמיד שהתקבל בעקבות קשירה של שני המקטעים מהמקורות השונים, נקרא גם **פלסמיד רקומביננטי** (Recombinant plasmid). פלסמיד רקומביננטי הוא פלסמיד שנוצר על ידי צירוף חדש (רקומבינציה) של מקטעי DNA, ואין הוא קיים באופן טבעי בטבע. פלסמיד כזה מכונה לעתים "פלסמיד מהונדס", שכן הוא נוצר במבחנה בשיטות של הנדסה גנטית.

□ המילה **טרנספורמציה** מתארת שינוי בתכונות הגנטיות והביולוגיות של תא. שינוי זה נובע מביטוי של גנים מסוימים שלא היו קודם בתא והוחדרו אליו מבחוץ. במקרה של הפלסמידים, החדרתם לחיידק מאפשרת ביטוי של גנים הממוקמים בפלסמיד, כדוגמת אלה המקודדים לחלבונים המקנים עמידות לאנטיביוטיקה. כך בעקבות חדירת הפלסמיד, חיידק רגיש לאנטיביוטיקה יכול להפוך לעמיד לאנטיביוטיקה, ועל חיידק זה אומרים שעבר טרנספורמציה. חיידק שעבר טרנספורמציה נקרא גם טרנספורמנט, שכן הוא רכש לעצמו תכונה חדשה, במקרה זה עמידות לאנטיביוטיקה.

כפי שניתן להתרשם מהתוצאות המוצגות באיור 3.3, כהן ובויר הוכיחו מעל לכל ספק כי ניתן לקשור מקטע DNA, מפלסמיד אחד למקטע DNA מפלסמיד אחר. התוצר שהוא פלסמיד רקומביננטי, הוא בעל יכולת "לשאת" ולהעביר מקטע DNA רצוי אל תוך החיידק, ולכן הוא נקרא גם **נשא** (Vector).

מקטע DNA הנישא על פלסמיד המצוי בחיידק, מבודד למעשה מיתר המקטעים שנכחו בתערובת בזמן הקשירה. הפלסמיד, על המקטע הרצוי שמצוי בו, עובר ריבוי הן כתוצאה משכפול חוזר ונשנה של הפלסמיד בחיידק והן כתוצאה מהתרבות של החיידק עצמו. **בידוד** מקטע DNA **וריבוי** שלו באורגניזם דוגמת החיידק נקרא **שיבוט** (DNA Cloning).

כהן ובויר, חלוצי ההנדסה הגנטית, הגו ניסוי המתואר באיור 3.3. במהלך הניסוי עורבבו מקטעי DNA שמקורם בפלסמידים שונים לצורך **קשירה** קוולנטית של מקטעים מהמקורות השונים. את הקשירה מבצעים באמצעות האנזים **DNA ליגאז**. הפלסמידים החדשים שהתקבלו במבחנה נקראים **פלסמידים רקומביננטיים**, שכן הם תוצר של צירוף מחדש (recombination) של מקטעי DNA שונים.

המונח "שיבוט" בא לציין את העובדה כי במהלך הבידוד והריבוי, תא בודד יוצר שבט (clone) חדש של תאים רבים זהים גנטית, שבכולם קיים אותו מקטע DNA מבודד.

### להלן סיכום של מספר תכונות חשובות של הפלסמיד המאפשרות לו לתפקד כנשא יעיל בשיבוט DNA:

1. הפלסמיד קטן בהרבה מהכרומוזום של החיידק, ולכן במעבדה ניתן להפיק פלסמידים בקלות כשמסלקים את כרומוזום החיידק, את דופן החיידק, את החלבונים ואת ה-RNA.
2. לאחר ההפקה ניתן לערוך בפלסמיד שינויים: ניתן לקשור בינו לבין מקטעי DNA אחרים באמצעות השימוש באנזימי הגבלה ובאנזימי DNA ליגאז. במילים אחרות, ניתן להחדיר אל הפלסמיד מקטע DNA אחר וכך מתקבל פלסמיד רקומביננטי. המקטע שמוחדר לפלסמיד ושלא היה בו קודם לכן נקרא **מחדר** (Insert) (איור 3.1ב').
3. ניתן להחדיר פלסמיד אחד לחיידק אחד שאין בו פלסמיד. הפלסמיד שמקורו בתערובת פלסמידים ואשר חדר לחיידק עובר למעשה **בידוד** מיתר הפלסמידים השונים המצויים בתערובת.

□ שכפול חוזר ונשנה של הפלסמיד מתאפשר הודות לאזור בקרת שכפול עצמאי המצוי בפלסמיד והקרוי "**מוצא השכפול**" ("Origin of replication") ובקצרה מכנים אותו "**Ori**" (ראו איור 3.2). "מוצא השכפול" הוא רצף קצר של DNA על גבי הפלסמיד שאליו נקשרים חלבונים האחראיים להפרדת גדילי ה-DNA לצורך מתן גישה לאנזימי DNA פולימראז האחראי הראשי לשכפול ה-DNA.

4. פלסמידים עוברים **ריבוי** יעיל בתוך החיידקים. למעשה, הפלסמיד משוכפל מספר רב של פעמים בדור אחד של החיידק וזאת בניגוד לכרומוזום החיידק שמשוכפל רק פעם אחת בדור. שכפול חוזר ונשנה של הפלסמיד מביא לידי כך שמספר עותקי הפלסמיד בחיידק עשוי להגיע לכדי כמה עשרות ואף מאות וזאת לצד עותק אחד בלבד של הכרומוזום. תכונת ריבוי זו של הפלסמידים, בנוסף ליכולת הריבוי של החיידקים עצמם, מאפשרת לקבל כל מקטע שבודד בחיידקים בכמויות גדולות הנחוצות לעבודת ההנדסה הגנטית. בידוד וריבוי הם מהות ה**שיבוט**.

5. פלסמידים לצורכי שיבוט נושאים גן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה. אם גן זה חדר לתא, הוא מאפשר לתא לשרוד בתנאי גידול שבהם קיימת אנטיביוטיקה מתאימה. תנאי גידול אלה מונעים מחיידקים ללא פלסמיד להתרבות. כפי שיובהר בהמשך, סלקציה זו חיונית למימוש השיבוט.

הניסוי של כהן ובויר כלל קשירה של מקטע DNA מפלסמיד אחד למקטע DNA מפלסמיד שני וריבוי הפלסמיד הרקומביננטי בחיידקים. בניסוי חלוצי זה לא היה עניין מיוחד בבידוד וריבוי מקטע DNA מסוים: הניסוי היה כשוט, ותכליתו הייתה להוכיח את העיקרון שלפיו ניתן לייצר פלסמיד רקומביננטי באמצעות פלסמידים וחיידקים. מאז השתכללו השיטות, ובעבודת מעבדה שגרתית שבה מעורבים שני פלסמידים, שואפים בדרך כלל להתמקד בהעברת מקטע מוגדר מפלסמיד אחד לשני. באיור 3.4 מתואר כיצד נהוג כיום להעביר מקטע שזהותו מוגדרת מראש, מפלסמיד אחד לפלסמיד אחר. את המערך הניסויי המתואר באיור 3.4 מבצעים במטרה לחקור את תפקידו הביולוגי של מקטע מוגדר (מקטע 2 מפלסמיד B). הנחת העבודה היא כי ניתן לבצע חקר זה רק כאשר מקטע זה מצוי בפלסמיד A. לשם כך מתחילים בהפקת הפלסמידים השונים מחיידקים, ולאחריה מקיימים חיתוך באמצעות אנזימי הגבלה.

הפלסמיד יכול "לשאת" לתוך החיידק מקטע DNA שנקשר אליו, ולכן הפלסמיד נקרא גם "**נשא**". המקטע הנוסף שנקשר (חדר) לפלסמיד נקרא **מחדר**. הנשא והמחדר יוצרים פלסמיד רקומביננטי. כשמכניסים פלסמיד רקומביננטי לחיידק, הוא מבודד מיתר המקטעים ומיתר הפלסמידים ששימשו לטרנספורמציה. כמו כן הפלסמיד עובר ריבוי בחיידק, וגם החיידקים מתרבים. ה**בידוד** של מקטע DNA בתא דוגמת החיידק וה**ריבוי** שבעקבותיו נקראים **שיבוט**.

המונח "שיבוט" בא לציין את העובדה כי במהלך הבידוד והריבוי, תא בודד יוצר שבט (clone) חדש של תאים רבים זהים גנטית, שבכולם קיים אותו מקטע DNA מבודד.

### להלן סיכום של מספר תכונות חשובות של הפלסמיד המאפשרות לו לתפקד כנשא יעיל בשיבוט DNA:

1. הפלסמיד קטן בהרבה מהכרומוזום של החיידק, ולכן במעבדה ניתן להפיק פלסמידים בקלות כשמסלקים את כרומוזום החיידק, את דופן החיידק, את החלבונים ואת ה-RNA.

2. לאחר ההפקה ניתן לערוך בפלסמיד שינויים: ניתן לקשור בינו לבין מקטעי DNA אחרים באמצעות השימוש באנזימי הגבלה ובאנזימי DNA ליגאז. במילים אחרות, ניתן להחדיר אל הפלסמיד מקטע DNA אחר וכך מתקבל פלסמיד רקומביננטי. המקטע שמוחדר לפלסמיד ושלא היה בו קודם לכן נקרא **מחדר** (Insert) (איור 3.1ב').

3. ניתן להחדיר פלסמיד אחד לחיידק אחד שאין בו פלסמיד. הפלסמיד שמקורו בתערובת פלסמידים ואשר חדר לחיידק עובר למעשה **בידוד** מיתר הפלסמידים השונים המצויים בתערובת.

□ שכפול חוזר ונשנה של הפלסמיד מתאפשר הודות לאזור בקרת שכפול עצמאי המצוי בפלסמיד והקרוי "**מוצא השכפול**" ("Origin of replication") ובקצרה מכנים אותו "**Ori**" (ראו איור 3.2). "מוצא השכפול" הוא רצף קצר של DNA על גבי הפלסמיד שאילו נקשרים חלבונים האחראיים להפרדת גדילי ה-DNA לצורך מתן גישה לאנזימי DNA פולימראז האחראי הראשי לשכפול ה-DNA.

4. פלסמידים עוברים **ריבוי** יעיל בתוך החיידקים. למעשה, הפלסמיד משוכפל מספר רב של פעמים בדור אחד של החיידק וזאת בניגוד לכרומוזום החיידק שמשוכפל רק פעם אחת בדור. שכפול חוזר ונשנה של הפלסמיד מביא לידי כך שמספר עותקי הפלסמיד בחיידק עשוי להגיע לכדי כמה עשרות ואף מאות וזאת לצד עותק אחד בלבד של הכרומוזום. תכונת ריבוי זו של הפלסמידים, בנוסף ליכולת הריבוי של החיידקים עצמם, מאפשרת לקבל כל מקטע שבודד בחיידקים בכמויות גדולות הנחוצות לעבודת ההנדסה הגנטית. בידוד וריבוי הם מהות ה**שיבוט**.

5. פלסמידים לצורכי שיבוט נושאים גן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה. אם גן זה חדר לתא, הוא מאפשר לתא לשרוד בתנאי גידול שבהם קיימת אנטיביוטיקה מתאימה. תנאי גידול אלה מונעים מחיידקים ללא פלסמיד להתרבות. כפי שיובהר בהמשך, סלקציה זו חיונית למימוש השיבוט.

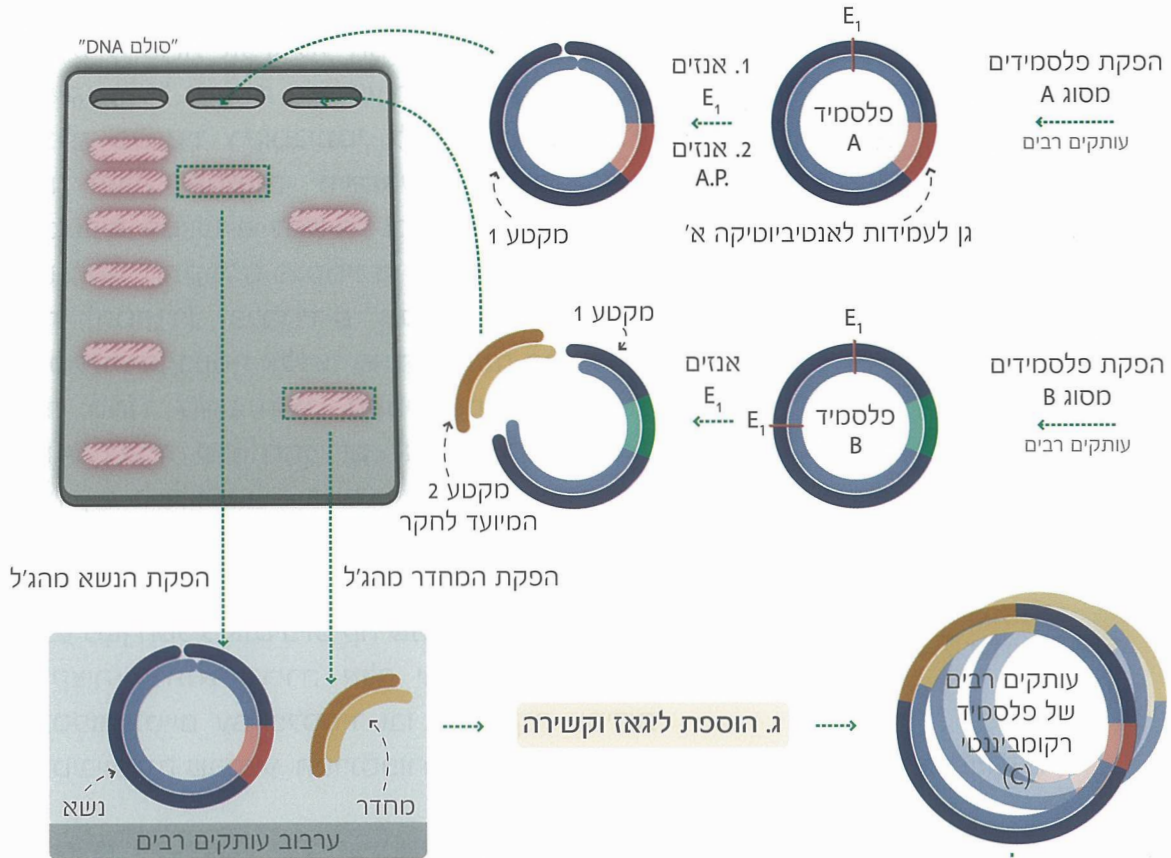
הניסוי של כהן ובויר כלל קשירה של מקטע DNA מפלסמיד אחד למקטע DNA מפלסמיד שני וריבוי הפלסמיד הרקומביננטי בחיידקים. בניסוי חלוצי זה לא היה עניין מיוחד בבידוד וריבוי מקטע DNA מסוים: הניסוי היה פשוט, ותכליתו הייתה להוכיח את העיקרון שלפיו ניתן לייצר פלסמיד רקומביננטי באמצעות פלסמידים וחיידקים. מאז השתכללו השיטות, ובעבודת מעבדה שגרתית שבה מעורבים שני פלסמידים, שואפים בדרך כלל להתמקד בהעברת מקטע מוגדר מפלסמיד אחד לשני. באיור 3.4 מתואר כיצד נהוג כיום להעביר מקטע שזהותו מוגדרת מראש, מפלסמיד אחד לפלסמיד אחר. את המערך הניסויי המתואר באיור 3.4 מבצעים במטרה לחקור את תפקידו הביולוגי של מקטע מוגדר (מקטע 2 מפלסמיד B). הנחת העבודה היא כי ניתן לבצע חקר זה רק כאשר מקטע זה מצוי בפלסמיד A. לשם כך מתחילים בהפקת הפלסמידים השונים מחיידקים, ולאחריה מקיימים חיתוך באמצעות אנזימי הגבלה.

הפלסמיד יכול "לשאת" לתוך החיידק מקטע DNA שנקשר אליו, ולכן הפלסמיד נקרא גם "**נשא**". המקטע הנוסף שנקשר (חדר) לפלסמיד נקרא **מחדר**. הנשא והמחדר יוצרים פלסמיד רקומביננטי. כשמכניסים פלסמיד רקומביננטי לחיידק, הוא מבודד מיתר המקטעים ומיתר הפלסמידים ששימשו לטרנספורמציה. כמו כן הפלסמיד עובר ריבוי בחיידק, וגם החיידקים מתרבים. ה**בידוד** של מקטע DNA בתא דוגמת החיידק וה**ריבוי** שבעקבותיו נקראים **שיבוט**.

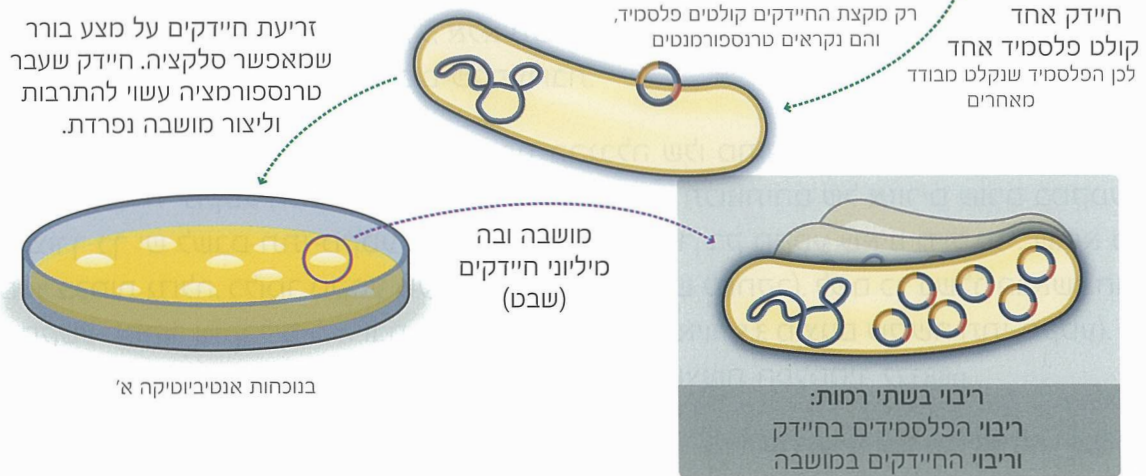
א. הפקת פלסמידים

ב-1. חיתוך הפלסמידים השונים

ב-2. הפרדת מקטעים באמצעות אלקטרופורוזה בג'ל והפקה שלהם מהג'ל



ד. החדרת פלסמידים לחיידקים (טרנספורמציה)



איור 3.4: העברת מקטע DNA מפלסמיד אחד לאחר ושיבוט הפלסמיד הרקומביננטי.

לאחר חיתוך הפלסמידים משתמשים בג'ל כדי להפיק את המקטעים שבקשירה שלהם מעוניינים. לאחר ערבוב המקטעים הרצויים מחדירים עוֹתְקִים של תוצר הקשירה, הפלסמיד הרקומביננטי, לחיידקים. הטרנספורמנטים מייצרים מושבות.

אם הפלסמיד שעתיד לשמש כנשא נחתך על ידי אנזים אחד בלבד, יש לטפל בו לאחר החיתוך באנזים נוסף הנקרא פוספאטאז בסיסי ובאנגלית Alkaline Phosphatase ובקיצור A.P. (ראו תיבה). לאחר מכן מפרידים בג'ל את המקטעים שהתקבלו מהפלסמידים השונים. הפעם ההפרדה בג'ל היא

□ אנזים ה-A.P. אינו אנזים הגבלה. ה-A.P. משמש כאן כדי להסיר קבוצות זרחה הממוקמות בקצה הקצוות הדביקים כך שהמקטע שטופל לא יוכל לשוב ולהסגר על עצמו בנוכחות האנזים DNA ליגאז באמצעות קשר פוספודיאסטרי קוולנטי. "באחריות" המקטע הנוסף (המחדר) לספק את קבוצות הזרחה הנחוצות ליצירת הקשרים הקוולנטיים. רק פלסמיד מעגלי שלם גורם לטרנספורמציה של החיידק. השימוש בפלסמיד חתוך שטופל באמצעות A.P. מבטיח כי מובין הפלסמידים המעגליים שיתקבלו לאחר ערבוב עם מקטעים אחרים וקשירה יהיה אחוז גבוה של פלסמידים שקשרו מקטע נוסף ולא כאלה "שנסגרו על עצמם".

□ כדי להפיק מקטע DNA מג'ל חותכים מתוך הג'ל את האזור בו מצוי המקטע וממיסים את האגרוז. אחר כך מדגירים את התמיסה בנוכחות חומר סופח DNA, מנקים אותו ולבסוף ממצים את ה-DNA הנקי.

לא רק למטרות אפיון של המקטעים, אלא גם כדי להפיק מהג'ל רק את המקטעים שקשירתם דרושה לקבלת פלסמיד רקומביננטי. לאחר ההפקה מג'ל (ראו תיבה תחתונה משמאל), מערבבים את המקטעים המיועדים לקשירה ומוסיפים את האנזים DNA ליגאז. מתקבלים פלסמידים שלתוכם חדר מקטע נוסף (המחדר). פלסמידים אלה הם פלסמידים רקומביננטיים. בנוסף אליהם מתקבלים גם פלסמידים חסרי מחדר שהם תוצרי מקטע שחמק מפעילות ה-A.P. לאחר מכן מחדירים את תוצרי הקשירה לחיידקים. בשל התנאים הניסיוניים המיוחדים, לחיידק אחד חודר רק פלסמיד אחד וכך מיושם השלב הראשון בבידוד. מעבירים את החיידקים הטרנספורמנטים למצע מזון המכיל אנטיביוטיקה שנועדה לאפשר ברה (סלקציה). בתנאי ברירה אלה יתרבו רק חיידקים טרנספורמנטים עם פלסמיד ובו גן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה שבמצע. הטרנספורמנט המתרבה יוצר מושבה מבודדת ("שבט חיידקים").

## שיבוט בו-זמני של מספר מקטעי DNA באמצעות פלסמיד

לעתים מעוניינים לשבט בו-זמנית יותר ממקטע אחד מתערובת ובה מספר גדול של מקטעים של DNA. במצבים מסוג זה אין נעזרים בג'ל, אלא משתמשים ביכולתם של הפלסמידים והחיידקים לאפשר בידוד מקטעי DNA מתוך מקטעים רבים שבתערובת.

לדוגמה, נניח כי לרשותנו מקטע DNA שמפת ההגבלה שלו מתוארת בצד העליון של איור 3.5. ניתן לכנות מקטע זה "מקטע המקור". נניח גם כי יש עניין בחקר תכונותיהם של אזורים שונים במקטע DNA זה. לצורך כך יש לשבט תתי-מקטע ממקטע המקור (כאמור, רק מקטע שאינו גדול מדי, שהוא מבודד והמצוי בכמות גדולה, כלומר מקטע שעבר שיבוט, יכול לשמש למחקר). לשם כך בשלב הראשון חותכים את מקטע המקור ומקבלים תערובת מקטעים (בדוגמה שבאיור 3.5 מוצגים שלושה תתי-מקטע). באיור 3.5 אפשר לראות את שלבי השיבוט של תתי-המקטע באמצעות הפלסמיד pBR322.

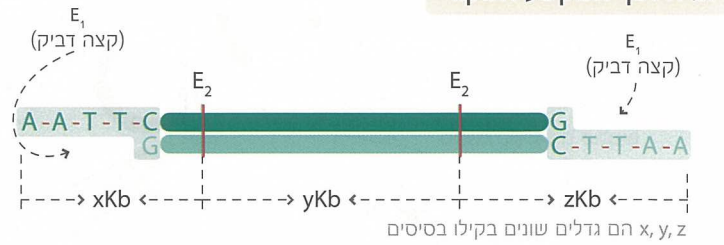
### ששת השלבים הבסיסיים (א' עד ו' כאן וגם א' עד ו' באיור 3.5) הדרושים לשיבוט בו-זמני של מספר מקטעי DNA באמצעות פלסמידים וחיידקים הם אלה:

א. **חיתוך ה-DNA שמקטעים ממנו מיועדים לשיבוט:** מקיימים חיתוך "ה-DNA המקור" באמצעות אנזים או אנזימי הגבלה כדי לקבל מקטעים של DNA בתערובת.

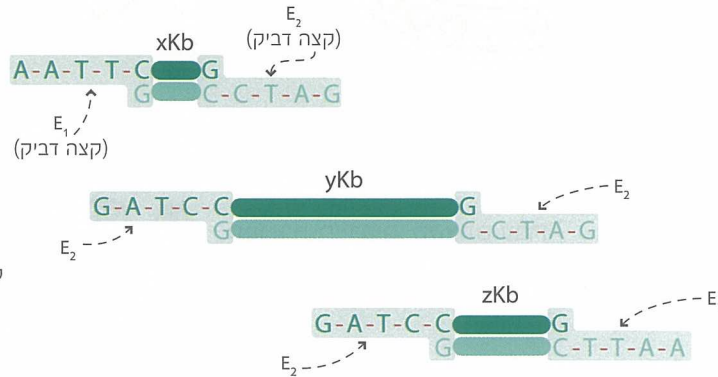
לעתים נדרש לבצע, בו-זמנית, שיבוט מקטעי DNA רבים. במקרה כזה אין זה מעשי להפיק מג'ל את כל המקטעים שבשיבוטם מעוניינים. לפלסמידים ולחיידקים תכונות המאפשרות שיבוט יעיל ובו זמני של מספר רב של מקטעים. שלבי השיבוט הבו-זמני של מקטעי DNA רבים במערכת פלסמידים-חיידקים מתוארים באיור 3.5.



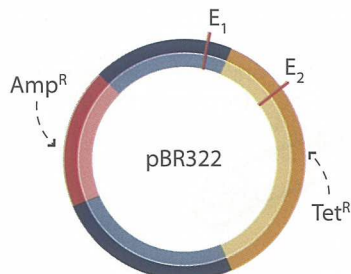
א. חיתוך המקטע המקורי



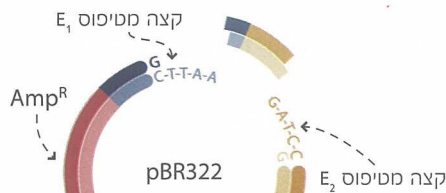
חיתוך עם E<sub>2</sub>  
מתקבלים תתי-מקטע



ב. חיתוך הנשא



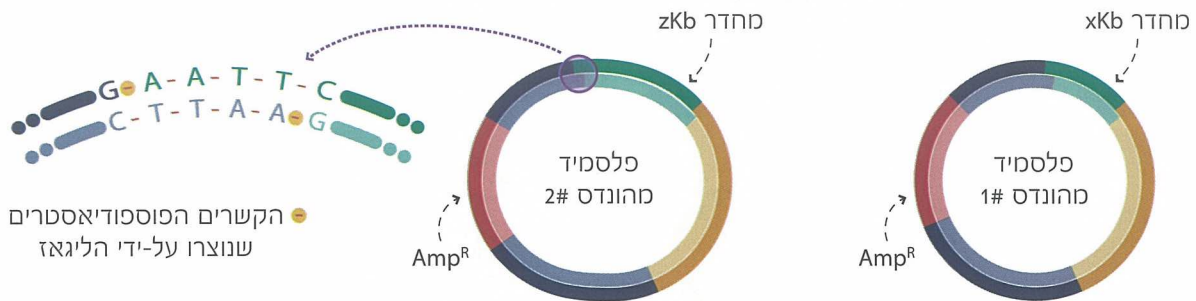
חיתוך באמצעות E<sub>1</sub>+E<sub>2</sub>



מיצוי המקטע הגדול מג'ל

ג-1. מערבבים ומאפשרים קשירה

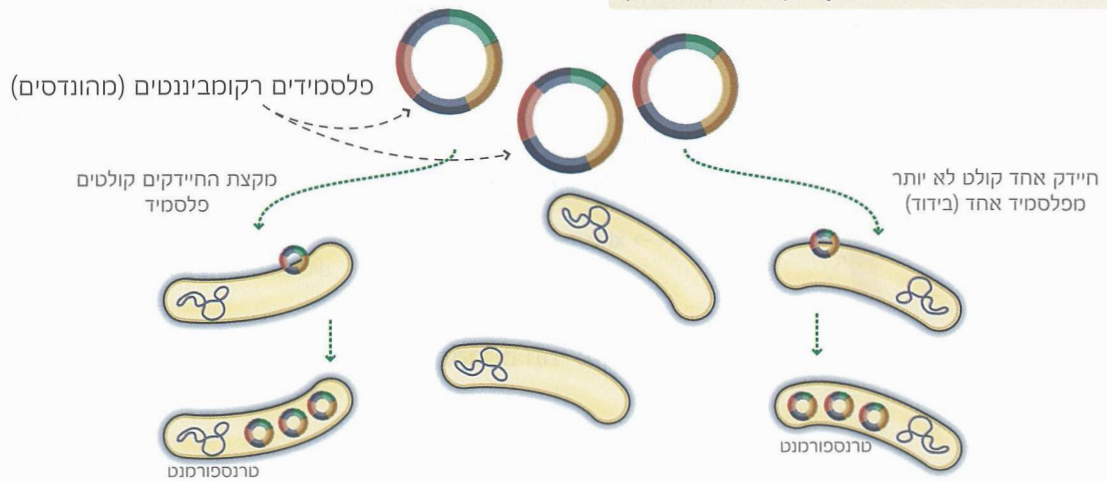
ג-2. תוצרי הקשירה המעגליים:  
פלסמידים רקומביננטיים ובהם מחדרים 'יחודיים'.



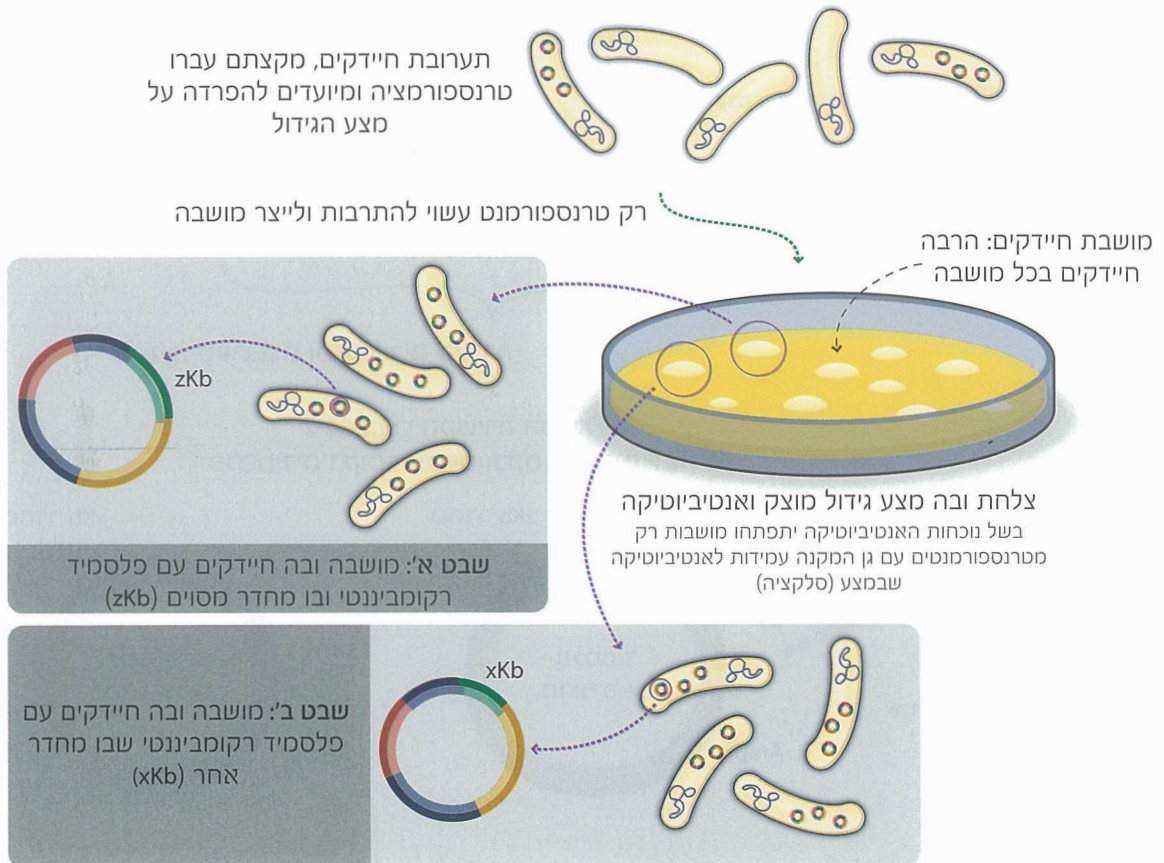
**איור 3.5: שיבוט בו-זמני של מספר רב של מקטעים באמצעות פלסמידים וחיידקים.**

לאחר החיתוך של המקטע המקורי, מאפשרים קשירה של תתי-המקטע למולקולת פלסמיד נפרדת. מתקבלים מספר תוצרי קשירה, פלסמידים רקומביננטיים ייחודיים. **המשך האיור בעמוד הבא.**

ד. החדרת הפלסמידים לחיידקים (טרנספורמציה)



ה-ו. הפרדה, סלקציה, ריבוי ואיתור השבט הרצוי



איור 3.5: המשך.

הטרנספורמציה של חיידקים על ידי פלסמידים רקומביננטים שונים והפרדה של הטרנספורמנטים על מצע שמכיל אנטיביוטיקה (מצע בררני) מאפשרות את השלמת השיבוט. מתקבלות מושבות חיידקים ובכל אחת מהן פלסמיד רקומביננטי עם מחדר מסוים.

החדרת הפלסמידים הרקומביננטים לחיידקים, שבעקבותיה מתרחשת טרנספורמציה, מאפשרת השלמת שלב א' בבידוד מקטעי ה-DNA השונים (3.5ד'). הפרישה של החיידקים על מצע ובו אנטיביוטיקה מאפשרת סלקציה לטרנספורמנטים והשלמת שלב ב' בבידוד. כל מושבה היא תוצר של ריבוי טרנספורמנט, ומתקיים בה ריבוי פלסמיד מסוים. בשלב זה הושלם השיבוט (3.5ה'). במושבות שונות (שבטים שונים) מוצאים פלסמידים ובהם מקטעי DNA שונים.



ב. **חיתוך הפלסמיד:** חיתוך הפלסמיד באמצעות אנזים או אנזימי הגבלה מתאימים. לאחר חיתוך הפלסמיד מפרידים את התוצרים בג'ל ומבודדים מתוך הג'ל רק את החלק של הפלסמיד שישמש כנשא לצורך קשירה עם המקטעים משלב א'.

ג. **קשירה (Ligation):** מערבבים את המקטע שמקורו בפלסמיד (הנשא) עם מקטעי DNA המיועדים לקישור לנשא ואחר כך לשיבוט. סוג האנזימים שבהם משתמשים לחיתוך הנשא מכתוב את סוגי הקצוות הדביקים שיתקבלו בנשא. סוגי הקצוות הדביקים שמתקבלים בנשא מכתובים אילו מקטעים משלב א', כלומר בעלי אילו קצוות, יוכלו להיקשר לנשא. מובן שסוג האנזימים ששימשו לחיתוך הנשא יכתבו על פי מפת ההגבלה את המיקום המדויק בנשא שבו ישתבצו המקטעים שנועדו להחדרה. בגמר שלב הקשירה מתקבלים פלסמידים רקומביננטים. בדוגמה שלנו מתקבלת תערובת פלסמידים רקומביננטים שונים ובהם תתי-מקטע שונים.

□ בשלב הקשירה בין מקטע ה-DNA שמקורו בפלסמיד (מולקולת הנשא) ובין מקטע DNA שנועד להחדרה, מתקיימים קודם קשרי מימן רופפים בשל הימצאות קצוות דביקים בעלי בסיסים משלימים. לבסוף, קשירה קוולנטית של מקטע DNA למולקולת הנשא הפלסמידית מתאפשרת הודות לפעילותו של האנזים DNA ליגאז היוצר קשרים פוספודיאסטרניים.

ד. **טרנספורמציה:** בשלב זה מחדירים את הפלסמידים הרקומביננטים לחיידקים. התנאים הניסיוניים מאפשרים לחיידק לקלוט רק פלסמיד אחד. לכן פלסמיד רקומביננטי עובר בחיידק בידוד ראשוני מפלסמידים רקומביננטים אחרים. לאחר חדירת הפלסמיד לחיידק, משוכפל הפלסמיד בחיידק מספר רב של פעמים. זהו ריבוי ראשוני של הפלסמיד בתא החיידק.

ה. **להשלמת השיבוט מאפשרים הפרדה, ברה (selection) וריבוי שניוני:** מעבירים את החיידקים שעברו טרנספורמציה (טרנספורמנטים) (משלב ד' באיור 3.5) לצלחת ובה מצע מזון ואנטיביוטיקה. האנטיביוטיקה מאפשרת ברה שמשמעותה היא שרק חיידק שקיבל לתוכו פלסמיד עם גן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה יוכל להתרבות. חיידקים שלא קיבלו את הפלסמיד הרלוונטי, והם הרוב, מתים בנוכחות האנטיביוטיקה שבמצע.

□ התנאים הניסיוניים מאפשרים עם העברת החיידקים למצע הגידול את ההפרדה של טרנספורמנט אחד מאחרים ואחר-כך קבלת מושבות נפרדות זו מזו. ההפרדה בין המושבות מאפשרת לממש את מרכיב הבידוד בתהליך השיבוט.

כל טרנספורמנט ששרד את הברה מתרבה על מצע הגידול, ועקב הריבוי שלו ושל צאצאיו נוצרת תוך פחות מיממה מושבת חיידקים מבודדת שגודלה כראש סיכה. במושבה כזו מיליונים רבים של חיידקים המכילים אותו פלסמיד רקומביננטי. כך מומשו בידוד וריבוי שניוני של הפלסמיד.

ו. **איתור המושבה הרצויה:** בשלב זה מאפיינים את המושבות שהתקבלו ושואלים איזה פלסמיד יש בכל מושבה ובפרט איזה מקטע DNA חדר לפלסמיד זה? כדי לאפיין מושבה מסוימת מעבירים חיידקים ממושבת חיידקים זו למצע גידול נזלי. לאחר מספר שעות ב-37°C מתקבלת תרבית חיידקים נזלית שמקורה במושבה אחת. מפיקים מתרבית זו עותקים רבים של הפלסמיד המסוים. לאחר מכן ניתן לחתוך את הפלסמיד שמקורו במושבה הנבדקת באמצעות אנזימי ההגבלה ששימשו בשיבוץ המחדר. לבסוף מאפיינים את גודלו של המחדר בג'ל, וכך ניתן לקבל מידע על אופיו של הפלסמיד במושבה הנבחרת (בשבט הנבחן).

לסיום, מה הייתה תוצאת הניסיון לשבט במקביל מקטעי DNA כמתואר באיור 3.5? המקטע שקצותיו היו מטיפוס E1 נחתך על ידי האנזים E2 ונתקבלו שלושה תתי-מקטע בגדלים של xKb, yKb, zKb. רק שניים מתוך שלושת תתי-המקטע היו בעלי קצוות E1/E2 ולכן רק הם יכלו להיקשר (לחדור) למולקולות הנשא שנחתכו על-ידי E1 ו-E2. לעומתם, המקטע בגודל xKb היה בעל קצוות דביקים E2/E2, והדבר לא אפשר את חדירתו לנשא שקצותיו הדביקים E1/E2. לכן סביר להניח כי כ-50% מהמושבבות שהתקבלו לאחר ברהר הכילו פלסמיד עם מחדר שגודלו xKb, וכ-50% מהמושבבות הכילו פלסמיד עם מחדר שגודלו zKb.

### שאלה 3.1

בידיכם מקטע DNA ממקור מסוים שהתקבל לאחר חיתוך עם האנזים Hae III וכן מקטע DNA ממקור אחר שהתקבל לאחר חיתוך עם האנזים Hpa I. האם ניתן לקשור בין שני מקטעי ה-DNA הללו למרות שנחתכו על ידי אנזימים שונים (היעזרו בטבלה 2.1)? איזה אנזים נדרש לקשירה ומהי פעילותו?

### שאלה 3.2

1. שאלת סיכום: ציינו את כל המרכיבים הנדרשים להעביר מקטע מפלסמיד אחד לפלסמיד שני.
2. הציעו דרך להעביר מקטע DNA מפלסמיד אחד (פלסמיד א') לתוך פלסמיד אחר (פלסמיד ב') על סמך מפות ההגבלה של שני הפלסמידים המתוארת באיור 3.2. מטרתכם היא להעביר את האזור המסומן בחץ דו-ראשי בפלסמיד א' לתוך פלסמיד ב'. אתם מתבקשים להעביר מפלסמיד א' לפלסמיד ב' מקטע קטן ככל האפשר (מינימלי) שמכיל את האזור המסומן. המספרים במפות ההגבלה מציינים את מספר הבסיסים מנקודת התחלת הספירה (נקודת האפס). ניתן באמצעות המספרים לחשב את גודלם (אורכם) של מקטעים צפויים בין אתרי הגבלה.

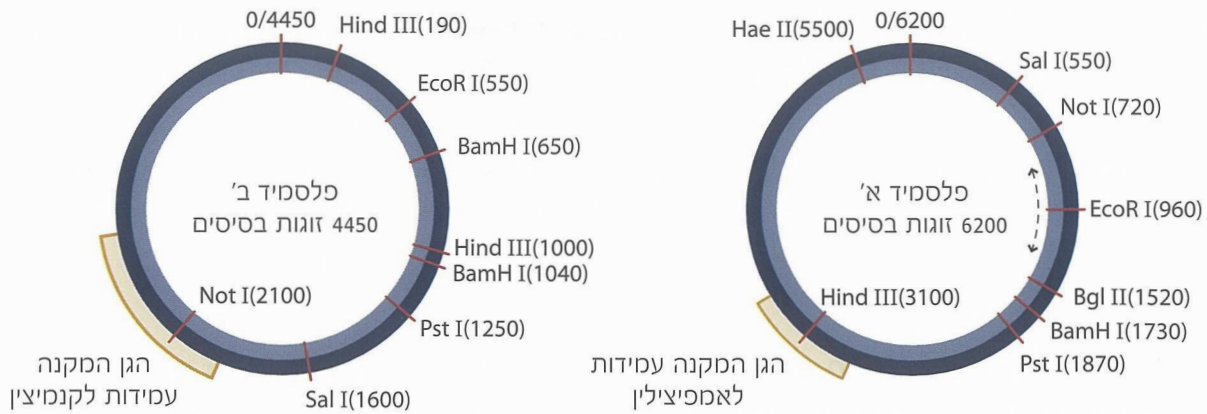
רמז לפתרון השאלה: לפני ביצוע ההעברה של מקטע מפלסמיד א' לפלסמיד ב' יש לוודא שההעברה עצמה לא תגרום לפגיעה בגן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה בפלסמיד ב'. פגיעה כזו עלולה להתרחש אם יתווסף מקטע DNA בתוך הגן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה. מדוע אין לפגוע בגן זה?

ענו על השאלה לפי השלבים א'-ד' המפורטים כאן:

- א. באילו אנזימים תחתכו את פלסמיד א' ובאילו תחתכו את פלסמיד ב' לצורך העברת המקטע המינימלי מפלסמיד א', שכולל את האזור המסומן בחץ, לפלסמיד ב'? הסבירו את בחירתכם ונמקו אותה.
- ב. לאחר החיתוך, איזה מקטע תבודדו מכל פלסמיד באמצעות הרצה בג'ל לצורך הקשירה? ציינו את הגדלים המדויקים של המקטעים בבסיסים.
- ג. בנוכחות איזו אנטיביוטיקה תגדלו את החיידקים לאחר הקשירה בין המקטעים והטרנספורמציה? מה יהיה גודלו המדויק של הפלסמיד הרקומביננטי שיתקבל?

3.1

3.2



**איור ש'-3.2: מפות הגבלה של שני פלסמידים המשמשים להעברת מקטעים מהאחד לשני (לתרגול בלבד).**

ד. בשלב איתור השבט הרצוי, באילו אנזימים תשתמשו לחתוך פלסמידים שיבודדו ממושבות בודדות כדי לבדוק אם קבלתם את הפלסמיד הרקומביננטי הרצוי? לאחר חיתוך פלסמיד רצוי שכזה באמצעות אנזימים שהצעתם, מה יהיה גודלם של המקטעים שיתקבלו (כפי שניתן לבחון זאת בג'ל)? שימו לב, יכולה להיות יותר מדרך אחת להשגת תשובה לשאלה אם התקבל הפלסמיד הרצוי.

### שאלה 3.3

תלמיד המחקר גנטין קיבל לידיו את תשובתכם לשאלה 3.2. הוא הציע דרך חלופית שתאפשר להעביר מפלסמיד 'א' לפלסמיד 'ב' מקטע שהוא קטן מזה שהצעתם, ואשר עדיין כולל את האזור המסומן שהעברתו נדרשת. הוא הציע להשתמש באנזימים Sal I ו-Bgl II כדי לחתוך את פלסמיד 'א' ולהחדיר לפלסמיד 'ב' את המקטע בן 970 הבסיסים שיתקבל. תלמיד המחקר גנצ'יק ראה את הצעת גנטין והתכלא: אמנם יש אתר חיתוך Sal I בפלסמיד 'ב', אך אין בפלסמיד 'ב' אתר חיתוך של Bgl II שיוכל לשמש כדי לקלוט את המקטע מפלסמיד 'א' שקצותיו Sal I / Bgl II. גנטין אמר שאת פלסמיד 'ב' יחתוך באמצעות Sal I ו-BamH I והכול יסתדר".

ולעצם השאלה:

1. אתר ההגבלה של BamH I מסומן בקיצור כך: G/GATCC ואתר ההגבלה של Bgl II מסומן כך: A/GATCT. תארו את אתרי ההגבלה של אנזימים אלה בסימון מלא הכולל את רצף הנוקלאוטידים בשני הגדילים. לאחר מכן ציירו את הקצוות המדורגים שיווצרו לאחר חיתוך בכל אחד מהאנזימים, בכל אחד מאתרי ההגבלה BamH I ו-Bgl II. האם יהיה ניתן לקשור קצה שנוצר על ידי חיתוך באנזים ההגבלה BamH I לקצה שנוצר על ידי חיתוך באנזים ההגבלה Bgl II? האם צדק גנטין כשטען שדרכו אפשרית?

2. ענו על סעיפים א'-ב' שבשאלה 3.2 והפעם הוציאו לפועל את הצעתו של גנטין.

3. האם אפשר יהיה לחתוך את הפלסמיד הרקומביננטי שיתקבל לאחר ביצוע הצעת גנטין באמצעות Bgl II? בִּדְקוּ הִיטֵב אֶת רֵצֵף הַנוֹקְלֵאוֹטִידִים בְּאִזֹּר הַקְּשִׁירָה בֵּין חֵד-גְּדִיל שֶׁמְקוֹרוֹ ב־I BamH לֶחֶד-גְּדִיל שֶׁמְקוֹרוֹ ב־II Bgl.

4. ענו שוב על סעיף ג' שבשאלה 3.2 והתייחסו לפלסמיד הרקומביננטי שהתקבל לאחר ביצוע הצעת גנטין.

### שאלה 3.4

הביאו בחשבון כל מה שאתם יודעים על פלסמידים: כשמערבבים מקטע קטן ומקטע גדול ליצירת פלסמיד רקומביננטי, האם תמיד ייקרא המקטע הגדול "נשא"? מהן התכונות שצריכות להיות למקטע על מנת שייקרא נשא?

### שאלה 3.5

בהסתמך על איור 3.5, הביאו בחשבון מקרה פרטי מסוים שאלה הם נתוניו:

אתר ההגבלה/האנזים E1 (אנזים 1) הוא EcoR I;

אתר ההגבלה/האנזים E2 (אנזים 2) הוא BamH I;

גודלו של מקטע X הוא 1.5Kb;

גודלו של מקטע Y הוא 4Kb;

גודלו של מקטע Z הוא 3.5Kb;

לפי נתונים אלה ועל פי איור 3.5, ענו על השאלות הבאות:

1. אילו קצוות דביקים של DNA יש למקטע ה-1.5Kb, למקטע ה-4Kb ולמקטע ה-3.5Kb?
2. בהנחה שאתם מעוניינים לשבט את המקטע שגודלו 1.5Kb ואת המקטע שגודלו 3.5Kb, אילו קצוות דביקים יהיו למקטע הפלסמיד שישמש כנשא?
3. אילו תהליכים מאפשרים בידוד תתי-המקטע של ה-DNA המיועדים לשיבוט? ציינו לפחות שני תהליכים. מה מאפשר ריבוי תתי-המקטע המיועדים לשיבוט?
4. אתם בשלבים ה' ו-ו' (איור 3.5) של השיבוט וברצונכם לאפיין זהות הפלסמיד הרקומביננטי במושבות חיידקים שונות. מה תעשו? באילו אנזימים תחתכו את הפלסמידים מהמושבות השונות ואיך תאפיינו אותם לאחר החיתוך? מכיוון שנהוג לאפיין את ה-DNA המצוי במספר מושבות, לדוגמה 10 או יותר, מה התוצאות המשוערות שעשויות להתקבל לאחר אפיון של 10 מושבות?

3.4

3.5

## שאלה 3.6

1. בתשובתכם לשאלה 3.5 ודאי שמתם לב כי קיים מקטע שגודלו 4Kb ושקצותיו BamH I/BamH I. מדוע מקטע זה לא עבר שיבוט?

## שאלה 3.7

נסו לשער אם בשיבוט שבו נעשה שימוש באנזימי הגבלה היוצרים קצוות חלקים, יהיה שלב הקשירה יעיל יותר או יעיל פחות בהשוואה לשיבוט שבו משתמשים באנזימי הגבלה היוצרים קצוות דביקים? נמקו.

## שאלה 3.8

1. בהמשך לשאלה 3.5, אתם מעוניינים לשבט את המקטע בן ה-4Kb (מקטע Y) מתוך מקטע ה-DNA המתואר באיור 3.5 תוך כדי שימוש בנשא pBR322. תארו את הליך השיבוט לפי ששת השלבים ושימו לב באיזה אנזים/אנזימי הגבלה משתמשים, מה הם תוצרי קישור ושיבוט רצויים ומה הם תוצרים בלתי רצויים.

2. יש מקרים שבהם פלסמיד ללא מחדר חודר לחיידק וגורם לטרנספורמציה שלו. פלסמיד כזה אינו רצוי. הציעו דרכים להגברת יעילות הליך השיבוט על פי הנתונים שבסעיף 1 של שאלה זו. בפועל הנכם מתבקשים להציע דרך להימנע ככל האפשר מקבלת פלסמידים לא רצויים ודרך לזרוז איתור השבט הרצוי. במיוחד הביאו בחשבון כי במקרה של הפלסמיד pBR322 ובמקרה של המערך הניסיוני הספציפי שבשאלה זו קיימת דרך לסלקציה המאפשרת ניכוי המושבות שחיידקיהן מכילים רק נשא ללא מחדר, וזאת ללא הפקה וחיתוך של ה-DNA.

## הבקטריופאג' כנשא המשמש בשיבוט

אחת המגבלות של השימוש בפלסמידים כנשאים היא בכך שניתן להחדיר לפלסמידים רק מחדרים בעלי אורך מוגבל. למעשה, לא ניתן לשבט ביעילות באמצעות פלסמידים מקטעי DNA אשר גודלם עולה על 10Kb. לעומתם, הבקטריופאג', אותו וירוס תוקף חיידקים שהוצג בפרק 2, יכול לשמש כנשא המתאים לשיבוט יעיל של מקטעים גדולים יותר, עד כ-25Kb (שהם 25,000 זוגות בסיסים). היות שאורכם של גנים מסוימים מגיע לממדים אלה, שיבוטם (כמתואר בפרק 4) חייב שימוש בבקטריופאג'ים כנשאים.

מה הן תכונותיו של הבקטריופאג' כנשא? ה-DNA של הבקטריופאג' כנשא, בדומה לפלסמיד כנשא, הוא קטן וניתן להפיק אותו בקלות יחסית. כמו כן, כמו במקרה של הפלסמיד, ניתן להחדיר ל-DNA של הבקטריופאג' מקטע DNA רצוי (מחדר). בנוסף DNA רקומביננטי זה ניתן לאריזה לתוך הקופסית החלבונית של הבקטריופאג'. בעקבות זאת מתקבל חלקיק בקטריופאג' המאפשר החדרה קלה של ה-DNA הרקומביננטי לחיידק וכל זאת בזמן ההדבקה של החיידק. לבסוף, הבקטריופאג' כמו הפלסמיד מאפשר לבודד מקטע DNA מסוים מאחרים ולהרבותו בחיידק (שיבוט). כדי לנצל באופן יעיל את תכונותיו אלה של הבקטריופאג' כנשא, משתמשים בזן חיידקים מיוחד, שאין בו אנזימי הגבלה.

## השלבים לשיבוט בו-זמני של מקטעי DNA שונים באמצעות נשא בקטריופאג'י הם אלה (היעזרו באיור

3.6):

א. **חיתוך ה-DNA:** חיתוך ה-DNA באמצעות אנזים הגבלה מייצר תערובת של מקטעים שונים שכל אחד מהם מיועד לשיבוט.

ב. **חיתוך הנשא הבקטריופאג'י:** חיתוך ה-DNA של הבקטריופאג' באמצעות אותו אנזים הגבלה.

ג. **קשירה ויצירת נשאים רקומביננטיים:** מאפשרים קשירה של מולקולות DNA של הבקטריופאג' עם מקטעי ה-DNA המיועדים לשיבוט כך שמקטע אחד מהתערובת נקשר למולקולת נשא אחת.

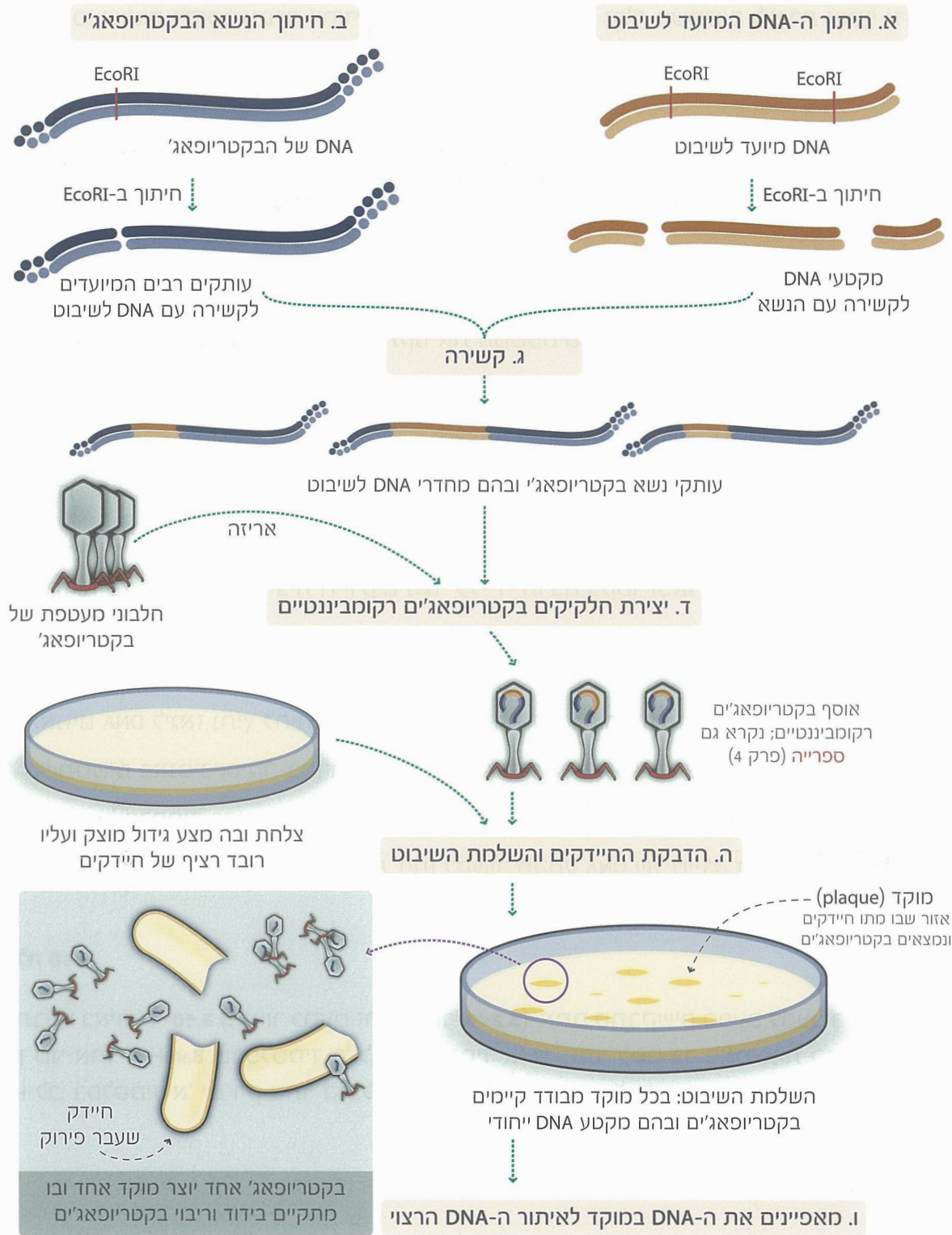
ד. **יצירת חלקיקים בקטריופאג'ים רקומביננטיים:** מערבבים את התוצרים הרקומביננטיים משלב ג' עם חלבוני מעטפת של הבקטריופאג'. מתקיים תהליך של הרכבה עצמית שבסופו מתקבלים בקטריופאג'ים רקומביננטיים, כשבכל בקטריופאג' ארוז הנשא עם מחדר DNA ייחודי (בידוד ראשוני). הקופסית החלבנית של הבקטריופאג' מסוגלת להיצמד לחיידק ולהחדיר לתוכו את ה-DNA.

ה. **הדבקה והשלמת השיבוט:** כדי לאפשר בידוד וריבוי ה-DNA שבבקטריופאג'ים, משתמשים בחיידקים הגדלים כרובד על מצע מזון. מאפשרים לבקטריופאג'ים להדביק מקצת החיידקים. במהלך ההדבקה מתקיימים אירועים רבים שבהם מחדיר בקטריופאג' אחד את ה-DNA הרקומביננטי לחיידק אחד. בעקבות זאת הבקטריופאג' מתרבה, החיידק מפורק והבקטריופאג'ים מדביקים חיידקים שכנים. כתוצאה מכך מתקבל מוקד הדבקה. כמתואר באיור 3.6, מוקד הדבקה הוא חור ברובד החיידקים שנוצר לאחר תמותת חיידקים, ובמוקד מצויים הרבה בקטריופאג'ים עם מחדר DNA מסוים (ריבוי). הבקטריופאג'ים השונים יוצרים מוקדי הדבקה שונים המופרדים פיזית זה מזה, ולכן ממומש עקרון הבידוד (השניוני) שאף הוא מרכיב הכרחי בשיבוט.

ו. **אפיון ה-DNA במוקד לאיתור ה-DNA הרצוי:** אפשר להשתמש בבקטריופאג'ים שבמוקד כדי למצות DNA מתוכם ולאפיינו באמצעות אנזימי הגבלה. לחילופין, אפשר לאתר ישירות DNA רצוי במוקדים באמצעות כלים מיוחדים שיוצגו בפרק הבא.

□ אם מתחילים מגנום שלם של תא אדם, ניתן לחשב כמה מקטעים ייחודיים יתקבלו לאחר חיתוך. גודלו של גנום האדם הוא שלושה מיליארד בסיסים ומכיוון שבאמצעות חיתוך מבוקר של הגנום באנזים הגבלה, ניתן לקבל מקטעים בגודל ממוצע של 15,000 בסיסים כל אחד, המסקנה המתבקשת היא כי חומר המוצא לשיבוט עשוי להגיע לכ-200,000 מקטעים ייחודיים המיועדים לשיבוט במקביל.

בפרק זה תוארו שתי מערכות לשיבוט בו-זמני של **מספר מצומצם** יחסית של מקטעי DNA מתוך תערובת. בסיומו של תהליך זה מתקבל מספר מצומצם של מושבות או מוקדים הנבדלים בסוג מקטע ה-DNA ששובט בהם. לעומת זאת, כשחומר המוצא לקראת שיבוט בו-זמני של מקטעים הוא הגנום השלם, הרי שלאחר חיתוכו מתקבלת תערובת שבה מקטעים רבים מאוד שאת מספרם ניתן להעריך. כשמאפשרים למקטעים מתערובת זו שמקורה בגנום להיקשר לנשאים, עשויים להתקבל



**איור 3.6: שיבוט בו-זמני של מספר מקטעי DNA שונים באמצעות בקטריופאג'ים וחיידקים.**

מוקדי הדבקה הם אזורים במשטח החיידקים שבכל אחד מהם עותקים רבים של בקטריופאג' רקומביננטי בעל מחדר ייחודי משובט (איור 3.6). המוקדים הנפרדים מייצגים בידוד וריבוי מקטעי DNA שונים. לאחר שיבוט בו-זמני של מקטעי DNA שונים שמקורם בגנום באמצעות בקטריופאג'ים, מקבלים כמה מאות אלפי מוקדים שבכל אחד מהם מקטע DNA גנומי ייחודי.

מאות אלפי נשאים רקומביננטיים "יחודיים". נשאים רקומביננטיים אלה משמשים ליצירת אוסף גדול של בקטריופאגים רקומביננטיים הנקרא גם "ספרייה". לאחר השלמת השיבוט, עשויים להתקבל מאות אלפי מוקדים.

בפרק הבא יוסבר כיצד ניתן לאתר מקטע DNA אחד רצוי או גן אחד רצוי מכלל הגנום כשהוא מצוי בין מאות אלפים של מושבות או מוקדים "יחודיים".

### שאלה 3.9

3.9

צינו אילו מבין המשפטים הבאים נכונים. תקנו את המשפטים הלא נכונים.

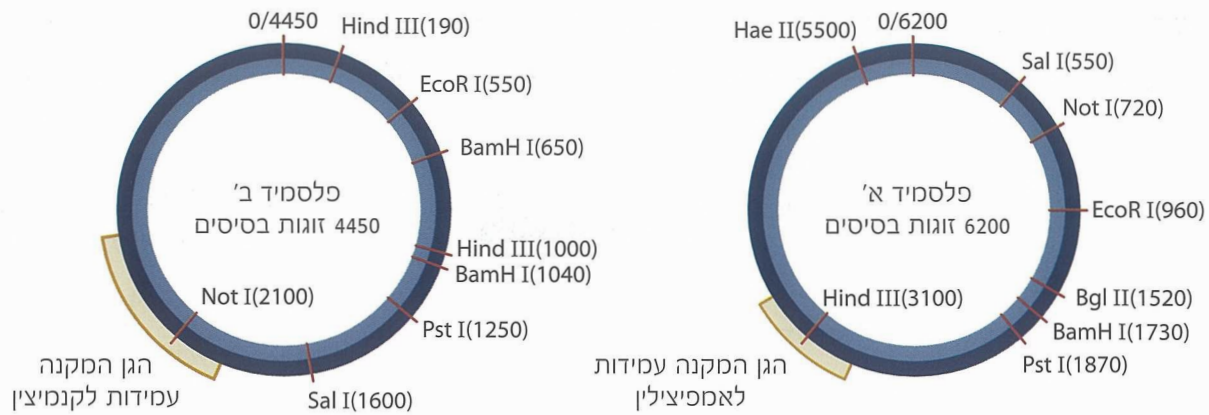
1. בידוד מקטע DNA מתאפשר על ידי שיבוט וריבוי שלו.
2. הפלסמיד והבקטריופאג' הם נשאים שלתוכם ניתן לשבץ DNA המיועד לבידוד וריבוי.
3. מחדר רקומביננטי עשוי להכיל פלסמיד שאינו קיים במחדר הטבעי.
4. בשיבוט מספר רב של מקטעים בו-זמנית מתקבלת ספרייה.
5. מוקד הדבקה מבודד בתרבית חיידקים נוצר על-ידי הרבה בקטריופאגים.
6. האנזים A.P. הוא אנזים שימושי מכיוון שהוא מאפשר לקבל העשרה למושבות חיידקים שבהן הנשא הפלסמידי אינו מכיל מחדר.
7. האנזים DNA ליגאז נחוץ לחיתוך מקטעי DNA לקראת שיבוצם בנשא.
8. משתמשים באנטיביוטיקה בתרבית חיידקים כדי לאפשר גידול של כל החיידקים שנזרעו לצלחת.
9. כדי לקבל פלסמיד רקומביננטי, יש לערבב מקטעי DNA שונים ולהדגירם עם האנזים DNA ליגאז.
10. בשל האוניברסליות של מבנה ה-DNA, ניתן לקשור מקטע DNA של חיידק למקטע DNA של אדם.

### שאלה 3.10

3.10

התבוננו באיור ש'-3.10 (האיור כמעט זהה לאיור ש'-3.2). אתם מתבקשים הפעם להעביר את המקטע שבין שני אתרי BamH I שבפלסמיד ב' לתוך פלסמיד א' שייחתך לשם כך באמצעות האנזים BamH I. שימו לב: בפלסמיד א' יש רק אתר הגבלה אחד שיזוהה וייחתך על-ידי BamH I.





**איור ש'-3.10: מפות הגבלה של שני פלסמידים המשמשים להעברת מקטעים מזה לזה (לתרגול בלבד).**

1. בהביאכם בחשבון את המטרה שצוינה, באיזה אנזים נוסף יש "לטפל" בפלסמיד 'א' לאחר חיתוכו על-ידי BamH I ולשם מה נחוץ טיפול זה?
2. לאחר הטיפולים האנזימטיים לשני הפלסמידים יש להפריד את המקטעים שיתקבלו בג'ל ולבודד מהג'ל את המקטעים המיועדים לקשירה. שובו וציינו באילו אנזימים תחתכו כל פלסמיד. ציירו את תוצאות ההפרדה בג'ל וציינו מה גודלם המדויק של המקטעים שיש להוציא מהג'ל לשם מימוש המטרה שצוינה.
3. לאחר הטרנספורמציה, הפרדת הטרנספורמנטים וגידול החיידקים על מצע מכיל אנטיביוטיקה (איזו אנטיביוטיקה?), התקבלו כמה עשרות מושבות. החלטתם לבדוק את גודל המחדר במקצת המושבות באמצעות חיתוך על-ידי האנזימים Pst I ו-Bgl II.

■ מתוך 10 מושבות שנבדקו, מ-7 מושבות התקבל מקטע של 740 בסיסים בנוסף למקטע גדול (ארוך) המייצג את רובו של הנשא הרקומביננטי. מהו אם כך גודל המחדר ומהו הפירוש המעשי של תוצאות אלה ב-7 מושבות?

■ בשתיים מתוך 10 המושבות התקבל מקטע של 350 בסיסים. למה לדעתכם התקבלה תוצאה זו?

■ באחת מתוך 10 מושבות התקבל מקטע של 1130 בסיסים. מה הפירוש המעשי של תוצאה זו?



## עיקרי הפרק

בִּרְרָה (Selection) המאפשרת רק התרבותם של חיידקים שיש בהם גן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה.

### שיטות

- הפקת פלסמידים מחיידקים
- חיתוך DNA באמצעות אנזימי הגבלה
- מיצוי מקטע DNA מג'ל
- סילוק קבוצות זרחה מקצה מקטע DNA באמצעות האנזים A.P.
- קשירה בין מקטעי DNA (Ligation)
- החדרת DNA לחיידק שבעקבותיה מתרחשת טרנספורמציה.

### יישומים

שיבוט מקטע DNA ושיבוט בו-זמני של מקטעי DNA רבים.

### חומרים

- צלחת מזון לגידול חיידקים
- מצע נוזלי לגידול חיידקים
- אנטיביוטיקה.

### כלים ב"ארגז הכלים"

- פלסמידים
- בקטריופאג'ים
- אנזימי הגבלה (Restriction enzymes)
- DNA ליגאז (DNA ligase)
- האנזים פוספאטאז בסיסי (A.P.) (Alkaline phosphatase)

### מונחים ומושגים

- נשא (Vector)
- מחדר (Insert)
- שיבוט (Cloning)
- DNA רקומביננטי (Recombinant DNA)
- פלסמיד רקומביננטי, בקטריופאג' רקומביננטי
- טרנספורמציה (Transformation)
- שבט חיידקים (מושבה) (Clone)
- מוקד הדבקה (Plaque)
- מוצא השכפול (Ori)

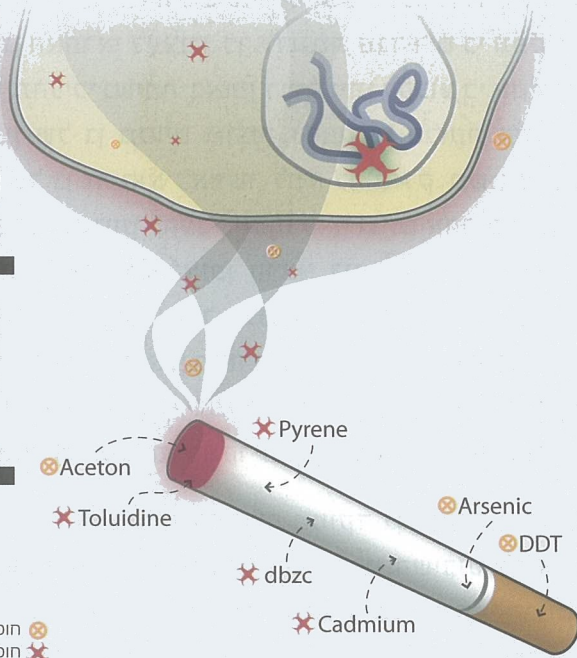
### עקרונות

בידוד וריבוי מקטעי DNA בחיידקים באמצעות פלסמידים או בקטריופאג'ים (שיבוט).

# שיבוט DNA בעזרת ספריות וגלאים



## העיטון מזיק



עד כה זהו 4000 תרכובות כימיות בעשן סיגריות. רבות מתרכבות אלה רעילות, וכ-50 זהו בוודאות כמסרטנות. חומר סרטן נקרא גם קרצינוגן. קרצינוגנים רבים גורמים למוטציות ב-DNA.

היכולת לשבט מקטעי DNA (פרק 3) העלתה מיד לסדר היום המדעי את האפשרות לשבט גנים שלמים לצורכי מחקר. **גן** הוא מקטע DNA בעל רצף בסיסים ייחודי, שנוצר ממנו RNA בתהליך התעתוק. ב-RNA תוצר גן מסוים עשוי להיות מוצפן על פי קוד מידע לייצור חלבון ייחודי. גן שנוצר ממנו RNA ובו מידע מוצפן לייצור חלבון, הוא גן **מקודד** לחלבון. לגן ולתוצריו (RNA וחלבון או רק RNA) ניתן לייחס תפקידים מוגדרים בתא. בנוסף, אומרים כי גן והחלבון שהוא מקודד לו, משתתפים בקביעת תכונה או תכונות מסוימות בתא ובאורגניזם. לרוב תכונה מסוימת בתא או באורגניזם נקבעת על ידי יותר מגן אחד.

**שיבוט גן** מוגדר כבידוד וריבוי מקטע DNA שמקורו בגנום ושמאפשר יצירת RNA בתא. השיטות החדשות

מאפשרות כיום לשבט גנים במהירות יחסית ובלא קשר לזהותם ולתפקידיהם של הגנים. אולם בסוף שנות

ה-70 ותחילת שנות ה-80 של המאה ה-20 העדיפו ראשוני המשבטים לעסוק בשיבוט ממוקד של גנים מסוימים בלבד, שנחשבו "מעניינים" מבחינה מדעית ורפואית. הם בחרו בגישה זו מכיוון שהשיטות שעמדו לרשותם היו עתירות עבודה. ניתן היה למצוא בקבוצת הגנים "המעניינים" ששובטו את הגן שאחראי ליצירת הורמון הגדילה וכן את הגן המקודד

לחלבון האינסולין שנחוסך בין השאר לשמירת רמת גלוקוז תקינה בדם. בשלבים מאוחרים יותר שובטו גנים רבים המקודדים להורמונים נוספים, גנים המקודדים לגורמי חלוקת תאים וגנים המקודדים לחלבונים המשתתפים בהעברת אותות בין תאי עצב. למעניינים נחשבו גם גנים בצמחים וביניהם גנים המקנים לצמח

ישנם גנים שמקודדים ל-RNA, אך ה-RNA אינו כתורגם לחלבון. עם גנים אלה נמנים לדוגמה הגנים המקודדים ל-RNA שמרכיב את הריבוזום.

**גן** הוא מקטע DNA שמקורו בגנום ושממנו נוצר RNA. גן עשוי **לקודד** לחלבון. **שיבוט גן** מוגדר כבידוד וריבוי מקטע DNA גנומי המאפשר יצירת RNA. חלוצי השיבוט של גנים שיבוטו גנים שנחשבו מעניינים מבחינה מדעית ורפואית. כך שובט הגן המקודד לאינסולין, הגן המקודד להורמון הגדילה וגנים המעורבים בסרטן.

יכולת לשרוד בתנאי יובש קיצוניים או גנים המקנים לצמח עמידות למחלות. שיבוטם של גנים המשתתפים בקביעת תכונות אלה אפשר לאפיין את החלבונים שגנים אלו מקודדים להם. חשוב לא פחות היה שיבוטם של גנים שעלולים להיות מעורבים בסרטן, וכן גנים המקודדים לחלבונים הנחוצים למבנה תקין של התא ולשלמות אברונו. גנים כאלה שובטו מתאי אדם, מחיידק, מתאי צמח ואפילו מתאי חרק.

החשיבות של שיבוט גנים לא הייתה ברורה לכול בתחילה. למה בעצם לשבט גן? פרק זה ופרק 8 ממחישים כי שיבוט גן מאפשר להגדיר את תפקידי הגן באמצעות שליטה בכמות תוצר הגן בתא. ראשית, ניתן להחדיר לתא גן משובט, ואם הוא מקודד לחלבון, ניתן לייצר בתא באופן מכוון כמויות עודפות של החלבון (ביטוי-יִתָּר של החלבון). שנית, השיבוט מאפשר ניצול דרכים למנוע יצירת החלבון. חקר השינוי בהתנהגות התא כתוצאה מביטוי-יִתָּר של חלבון מסוים או בעקבות מניעת ייצורו, משמש להגדרת תפקידי החלבון והגן האחראי לייצורו. כך לדוגמה, מגדירים כי תפקידו של גן הוא לאפשר לתא לנשום אם ביטוי-יתר

שלו מגביר תהליכי נשימה. באופן דומה ניתן לקבוע כי אם מניעת ייצור חלבון של גן מסוים גורמת להפסקת חלוקת התא, הרי שתפקידו של גן זה הוא לאפשר לתא להתחלק. משנמצאו לגן משובט תפקידים, ניתן להעביר אותו לאורגניזם אחר, כדי לשנות את תכונות האורגניזם באופן הרצוי לנו (פרק 8). וחשוב לא פחות - חקר גן משובט יכול ללמדנו אם הוא מעורב במחלות. ניתן לקבוע שגן מסוים אכן מעורב במחלה, אם מאתרים מוטציות

שיבוטם של גנים נחוץ להבנת תרומת תוצריהם לתפקוד התא והאורגניזם. נכון גם לומר כי תהליכים סורכבים בתא (לדוגמה, נשימה, תנועה וחלוקה) ניתנים להבנה בצורה מעסיקה רק לאחר שיבוט הגנים שהם בעלי תפקיד בתהליכים אלה.

בגן זה אצל חולים. לבסוף, במקרים מסוימים מנצלים גן משובט כדי לייצר כמות גדולה של תוצרו החלבוני העשוי לשמש תרופה כמו במקרים של האינסולין ושל הורמון הגדילה (פרק 8).

איך משבטים ומאתרים בתהליך ממוקד גן שאחראי לתכונה מסוימת מתוך כלל ה-DNA בתא (הגנום)? לצורך **שיבוט ואיתור** גן מסוים נהגו חלוצי השיבוט לבודד ולהרבות (לשבט) במקביל גנים ומקטעי DNA המייצגים את כל הגנום. השיבוט במקביל של מקטעי הגנום, שמספרם הגיע לעתים למאות אלפים, נעשה באמצעים שתוארו בפרק 3. אוסף גדול של מקטעים מהגנום המצוי בתוך עותקים של נשא נקרא **ספרייה גנומית**. בשל ממדיו הגדולים של אוסף מקטעים שכזה, כדי **לאתר** בספרייה את מקטע ה-DNA ובו הגן הרצוי, יש צורך להשתמש ב"אמצעים מיוחדים", שהסבר אודותיהם אפשר למצוא בפרק זה. אולם בנוסף ל"אמצעים מיוחדים" יש צורך גם ב"אמצעים ייחודיים" לאיתור (לגילוי) כל גן וגן. למעשה, אין סיפור איתורו של גן אחד זהה לסיפור איתורו של גן אחר. ראוי לציין כי לרוב משתמשים במושג "**שיבוט גן**" כדי לתאר את תהליכי **השיבוט והאיתור** גם יחד.

השיבוט של גנים ומקטעי DNA המקודדים לחלבון בעזרת ספריות ומגוון "האמצעים המיוחדים" פחת עם השנים וכיום אינו דבר שבשגרה. למרות זאת, אפשר למצוא בפרק זה את עיקריו ועקרונותיו של שיבוט בעזרת ספריות בשל כפל סיבות. האחת, כדי להבהיר איך התקבל באמצעות השיבוט הממוקד ידע ביולוגי חיוני שעיצב את התפתחות הביולוגיה המולקולרית, והשנייה, כדי להכיר עקרונות ושיטות ששימשו לשיבוט ושנותרו בשימוש, גם אם לא למטרות שיבוט.

שיבוט גן נחוץ למציאת תפקידיו של הגן. כך, גן משובט מאפשר לייצר בתאים עודף מהחלבון שהוא מקודד לו (ביטוי-יִתָּר). לחילופין, גן משובט מאפשר לנצל אמצעים מיוחדים כדי למנוע באופן ממוקד את ביטוי. עקב כך משתנה לעתים התנהגות התא. חקר השינוי בתכונות והתנהגות התא מאפשר ללמוד על תפקידי הגן. גן משובט מאפשר גם לבחון את מעורבותו האפשרית במחלות. ניתן להשתמש בגן משובט לייצור חלבון שישמש כתרופה.

(-) גנצ'יק נהג לנצל את שעות הבוקר המוקדמות לקריאת מאמרי מחקר לפני שהתחיל בעבודה הניסיונית. בוקר אחד הניח גנטין על שולחנו מאמר שכתרתו: "שיבוט גן שעשוי להסביר התנהגות גברית טיפוסית". גנצ'יק, שהיה עסוק בשיבוט גן אחר, גילה מיד עניין...

המבוא למאמר נראה מעניין במיוחד: "גברים ניחנו לעתים בחוסר רגישות כלפי נוסאים המעסיקים נשים, והדבר תורם למתיחות בין המינים. יצאנו לכן לשבט את הגן ח.ר. (חוסר רגישות) ששיערנו שהוא ממוקם על כרומוזום Y ושביכולתו לבקר את ההתנהגות הגברית המיוחדת..." בתיאור השיטות מצא גנצ'יק פרטים מועילים: "הספרייה הוכנה ממקטעי DNA שמקורם ב-RNA מרקמת מוח של גברים..." הוא גילה בעניין כי לאחר ששובט הגן, נמצא כי הוא מתבטא באופן חזק אצל גברים שנוהגים במהירות מופרזת בליווי מוזיקה רועשת, ואילו אצל גברים שקטים גן זה כמעט ואינו מייצר RNA. ולבסוף מעניין במיוחד היה הדין שבמאמר: אנו מציעים, כך נכתב, לערוך ריפוי גני באותם גברים פרועים במיוחד, כדי להשתיק בהם את ביטוי הגן ח.ר. ששיבטנו, ולהחזירם למוטב...

בשלב זה כבר היה ברור לגנצ'יק מה הוא צריך לעשות... הוא רץ לחפש את גנטין לשאול אותו באיזו תוכנה השתמש כדי לייצר את המאמר המשכנע מאוד אבל מפוברק...

## שיבוט גן מסרטן באמצעות ספרייה גנומית

התאים הנורמליים באורגניזם מתחלקים ומתרבים באופן תקין: התאים נוצרים במועד המתאים, בכמות הנכונה ובמקומות הדרושים. לעתים חל שיבוש, ותא נורמלי הופך להיות תא סרטני. תא סרטני הוא תוצר של "שינויים מסרטנים" שהתרחשו בתא, שמבדילים אותו מתא נורמלי. תא סרטני מוריש את ה"שינויים" שהתרחשו בו לתאי הבת שלו. כתוצאה מה"שינויים" התא וצאצאיו התאים מתחלקים בקצב מוגבר ובלתי מרוסן. חלוקות חוזרות ונשנות של תאים סרטניים יוצרות בתחילה צבר תאים סרטניים שיכול להתפתח לגידול ממאיר. הסיכוי להופעת תא סרטני עולה בעקבות השיפתם של תאים לגורמים מסרטנים שמעלים את ההסתברות ל"שינויים" בתא.

שאלות בסיסיות בחקר הסרטן הן: מהי מהות ה"שינויים המסרטנים" שעלולים להתרחש בתא וכיצד הם תורמים להפיכתו לתא סרטני? האם השינויים מתרחשים בגנים ואם כן באלו מהם? האם ניתן לשבט ולאחר גן מוגדר שבו התרחש "שינוי"? האם ניתן ללמוד את תכונותיו של גן זה ("הגן המסרטן")? לאיזה חלבון מקודד "הגן המסרטן" ומה הם תפקידיו של החלבון בתא?

במעבדות רבות חקרו בתחילת שנות ה-80 של המאה ה-20 את הביולוגיה התאית והמולקולרית של הסרטן. במעבדתו של החוקר האמריקני רוברט וינברג (Robert Weinberg) ובמעבדות אחרות שאלו החוקרים את עצמם אם "התכונה הסרטנית" נמצאת ב-DNA ואם ניתן להעביר אותה באמצעות החדרת DNA מתא סרטני לתא נורמלי. כדי לענות על שאלה זו, יש צורך להשתמש בתאים הגדלים בתרבית (תיבה 4.1).

באזור 4.1 אפשר לראות כיצד ניתן להביא להופעתם של תאים סרטניים בתרבית וכיצד ניתן להעביר באמצעות DNA את התכונה הסרטנית לתאים נורמליים. על פי המתואר באזור זה, חשיפה של תאים לא סרטניים בתרבית לחומר מסרטן (כימיקל מסוים במקרה זה) גורמת להופעתם של תאים סרטניים בתרבית. ניתן להפיק DNA מתאים סרטניים אלה ולחתוך אותו באמצעות אנזים הגבלה. בשלב הבא מאפשרים למקטעי DNA שמקורם בתאים סרטניים לחזור לתאים לא סרטניים. בפועל, מקצת התאים הלא סרטניים שבתרבית קולטים לתוכם באקראי מקטע DNA זה או אחר המשתבץ בגנום והופך להיות חלק בלתי נפרד מה-DNA שבגרעין התא. מסתבר כי מכלל התאים הלא סרטניים שבתוכם השתבץ

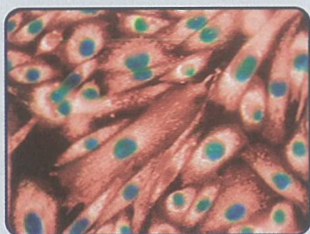
תא סרטני מקורו בתא נורמלי שעבר שינוי. כתוצאה מהשינוי, תא סרטני מתחלק באופן בלתי מרוסן. חוקרים שאלו עצמם אם ניתן להעביר את התכונה הסרטנית מתא סרטני לתא נורמלי באמצעות העברת DNA שמקורו בתא הסרטני. מערך ניסיוני כזה ניתן לקיים בעזרת תאים הגדלים בתרבית (תיבה 4.1).

מקטע DNA **אקראי** שמקורו בתא הסרטני, רק מקצתם הופכים לתאים סרטניים. הפירוש לממצא זה הוא כי לא כל ה-DNA שמקורו בתא הסרטני הוא בעל יכולת לגרום להתמרה סרטנית. המסקנה המתבקשת היא כי ניתן להפוך תא שאינו סרטני לתא סרטני באמצעות החדרה של מקטע DNA **מסוים** שמקורו בתא הסרטני. השאלה היא אם כן, מהו אותו מקטע DNA מסוים שיכול לגרום להתמרה סרטנית?

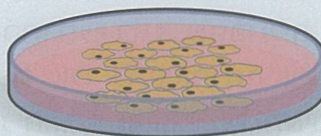
□ בניסוי ביקורת כשלוקחים DNA מתאים נורמליים ומחדירים מקטעים ממנו לתאים לא סרטניים, אין ביכולתו של DNA זה לגרום להתמרה סרטנית.

### □ תיבה 4.1 : גידול תאים נורמליים ותאים סרטניים בתרבית

תרבית תאים היא אוסף של תאים הגדלים במנותק מהגוף בכלי המכיל מצע גידול נוזלי שבו מרכיבי הגידול הנחוצים: סוכרים, חומצות אמינו, מלחים וגורמי גדילה. את הצלחת או הקכל עם התאים שמים באינקובטור שבו מתקיימת טמפרטורה אופטימלית לגידול. הטיפול בתאים נעשה במנדף סטרילי למניעת זיהום תרבית התאים בחיידקים או בפטריות.



תאים מבעד למיקרוסקופ אור חלבוני שלד התא נצבעו עם נוגדנים זוהרים באדום והגרעינים נצבעו עם צבע ירוק הנקשר ל-DNA



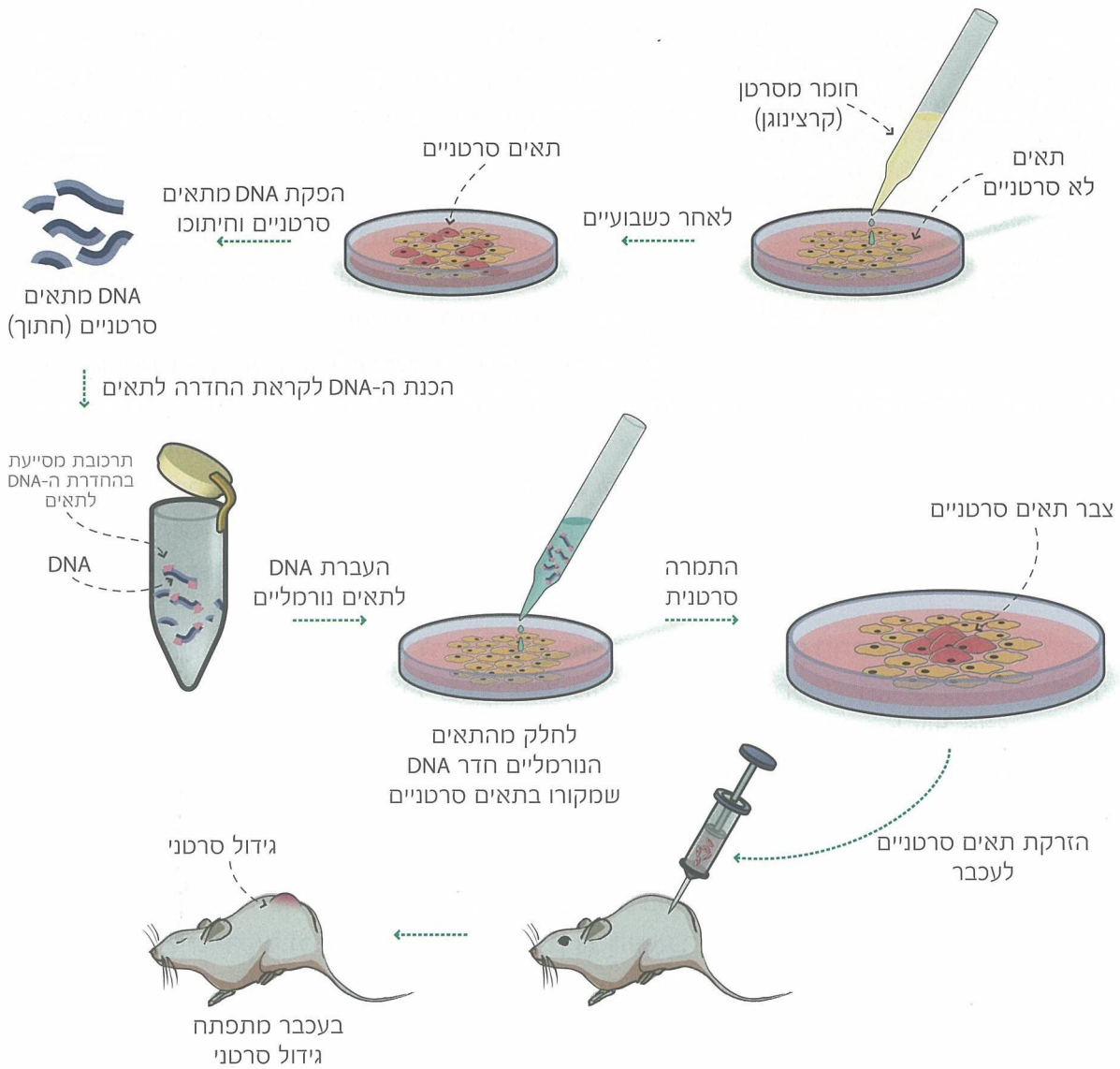
תאים בתרבית גדלים בנוכחות מצע גידול נוזלי ויוצרים שכבה על קרקעית הצלחת. ממקמים את הצלחת באינקובטור



עבודה עם תאי בעל-חיים במנדף סטרילי החלפת מצע גידול ודילול התאים הוא טיפול המתבצע אחת לשלושה ימים

למעט תאים כמו תאי הדם הגדלים בתרחיף, תאים נורמליים של בעל-חיים הגדלים בתרבית מתאפיינים בכך שגידולם מעוכב כתוצאה ממוגע עם תאים שכנים (Contact inhibition). לכן תאים נורמליים מפסיקים להתחלק כאשר הם מכסים את כל הצלחת בשכבת תאים אחת אחידה. כדי להמשיך לגדל תאים אלה יש לדלל אותם ולהעביר מקצת התאים לצלחת חדשה. לעומתם, תאים סרטניים אינם מעוכבים כתוצאה ממוגע בין תאים, ובשל המשך החלוקות שלהם מתקבלים בתרבית צברי תאים הגדלים זה על גבי זה. כדי לקבל תאים סרטניים במעבדה אפשר לקחת תאים נורמליים הגדלים בתרבית ולחשוף אותם לחומר מסרטן (קרצינוגן). החשיפה של תאים לחומר מסרטן יוצרת שינוי סרטני באחדים מהם שבעקבותיו מופיעים צברי תאים סרטניים הגדלים זה על גבי זה. כל צבר תאים מקורו בתא אחד שעבר שינוי סרטני. מה היא התרומה הראשונית של החומר המסרטן לתהליך ההתמרה הסרטנית? החומר המסרטן גורם לשינוי ב-DNA (מוטציה). המוטציה המסרטנת היא לעתים לא יותר מאשר מוטציה נקודתית, כלומר החלפה של נוקלאוטיד אחד בלבד באחר. כאשר המוטציה מתרחשת בגן שתוצרו נעשה פעיל יותר, ותוצר גן זה מביא לזירוז חלוקת תאים, הגן זוכה לכינוי "גן קסרקטן" (Oncogene).

איור 4.1 מדגים כיצד העברת DNA מתאים סרטניים לתאים נורמליים גורמת להופעת תאים סרטניים. כך, תא אחד מהתאים הנורמליים קלט באקראי מקטע DNA מסוים שמקורו בתא הסרטני ושאחראי להתמרה הסרטנית ולהופעת צבר תאים סרטניים.



**איור 4.1: DNA מתאים סרטניים מסוגל להפוך תאים נורמליים לסרטניים בתהליך הקרוי התמרה.**

כאשר תאים נורמליים בתרבית נחשפים לחומר מסרטן (קרצינוגן), הופכים אחדים מהתאים הנורמליים לסרטניים. מתאים סרטניים אלה ניתן להפיק DNA ולהחדירו לתאים שאינם סרטניים. רק מקצת התאים הלא סרטניים שקלטו DNA מתאים סרטניים, הופכים בעצמם לתאים סרטניים. מכאן שישנו רק מקטע DNA מסוים (או מקטעים בודדים מסוימים) שמסוגל להפוך תא לא סרטני לתא סרטני. התא הסרטני מתחלק, ומתקבל צבר תאים סרטניים שיכול לגרום לגידול סרטני בעכבר מיוחד החסר מערכת חיסונית. המערך הניסויני המתואר כאן אין די בו כדי לענות על השאלה איזה מבין מקטעי ה-DNA הרבים שמקורם בתא הסרטני, אחראי להתמורה הסרטנית.

בעקבות חידרה **אקראית** של מקטעי DNA מתאים סרטניים לתאים נורמליים, רק מקצת התאים הופכים לתאים סרטניים. עובדה זו עשויה להעיד כי רק מקטע DNA מסוים מהתא הסרטני מסוגל לגרום להתמרה סרטנית. לכן השאלה שנשאלה הייתה מהו אותו מקטע DNA שאחראי להתמרה הסרטנית? האם הוא גן והאם ניתן לשבט אותו?

החוקרים שיערו שעל מקטע ה-DNA המסוים שיכול לגרום להופעת תא סרטני, נמצא גן מסוים שזכה לכינוי "הגן המסרטן". האתגר של החוקרים היה לאתר מבין כל מקטעי ה-DNA הרבים שמקורם בתא הסרטני, את מקטע ה-DNA שהכיל את "הגן המסרטן", כדי לחקור את השינוי שחל בו. למעשה, החוקרים שאפו **לשבט את הגן המסרטן**.

□ איך נוצר בתא "גן מסרטן"? התא נחשף מדי פעם לחומרים שונים שגורמים באופן אקראי למוטציות ב-DNA. מוטציות אקראיות מתרחשות גם בתוך גנים. מבין הגנים המוטנטים שמתקבלים באקראי, רק אחוז קטן הם גנים שמעורבים בסרטן. מכן מסרטן נוצר בתא חלבון מוטנטי השונה מהחלבון שנוצר מאותו הגן שלא עבר מוטציה. החלבון המוטנטי מתאפיין ביכולת לתרום לתהליך הסרטני.

שיבוט גנים מסרטנים נחשב בתחילת שנות ה-80 של המאה ה-20 לאתגר. ואכן, האתגר שבפניו ניצבו ויינברג ועמיתיו היה קשה במיוחד, מכיוון שלא היה שום מידע לגבי זהות הרצף של הגן המסרטן המיועד לשיבוט. החוקרים נזקקו לפיכך לגישה מקורית המתוארת באיור 4.2. בתחילה הופק DNA מתאים סרטניים של **אדם**. DNA זה הוחדר לתאים לא סרטניים של **עכבר**. בעזרת DNA זה של אדם נגרם אירוע ייחודי ובו תא בודד של עכבר, שלא היה סרטני, קלט באקראי מקטע DNA **מסוים** והפך לתא סרטני (התהליך שהתרחש בתא מכונה "**התמרה**"). התא הסרטני הביא ליצירת צבר תאים סרטניים שמהם הופק DNA, והאתגר היה לאתר אי שם ב-DNA זה **של עכבר** את מקטע ה-DNA **של אדם** המכיל את הגן המסרטן.

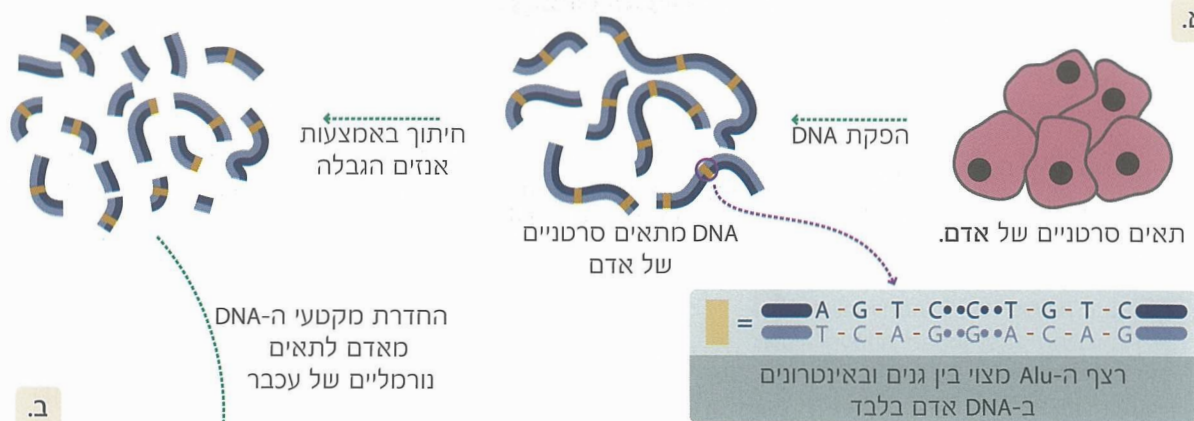
כמתואר באיור 4.2 וכמוסבר בתיבה 4.2, הופק בשלב הבא **DNA גנומי** מהתאים הסרטניים העכבריים, והוא נחתך באנזים הגבלה. התקבל אוסף גדול של כ-200,000 מקטעים ייחודיים מהגנום. לאחר מכן כל מקטע שובץ ב-DNA של בקטריופאג' ששימש כנשא, והתקבל אוסף גדול של מקטעים בנושאים בקטריופאג'יים (בדומה למתואר בפרק 3). בשל ממדיו של האוסף נקרא אוסף זה **ספרייה**. הספרייה שהתקבלה הייתה **ספרייה גנומית** של DNA מעכבר (איור 4.2 ג'). ייחודה של ספרייה זו היה בכך שרוב הבקטריופאג'ים שבה נשאו מקטעי DNA גנומי של עכבר, אך בקטריופאג' **אחד** הכיל מקטע שמקורו באדם ובו "הגן המסרטן". לבסוף, כדי להשלים את השיבוט, שימשו הבקטריופאג'ים שבספרייה לייצור מוקדים ברובד חיידיקים (כמודגם באיור 3.6 בפרק 3). השאלה שנשאלה הייתה: איזה מהמוקדים הרבים שנוצרו מכיל בקטריופאג' ובו הגן המסרטן מאדם? המשימה הממוקדת והפשוטה יותר הייתה לאתר את המוקד היחיד שבו היה DNA שמקורו באדם.

בניגוד ל-DNA מעכבר, DNA מאדם מתאפיין בכך שיש בו רצף נוקלאוטידים הקרוי Alu החוזר במספר רב של מקומות בגנום ובכלל זה באינטרונים של גנים (איור 4.2). מן הסתם צפו החוקרים שגם בגן המסרטן יהיה רצף Alu. לכן כדי לאתר את המוקד הרצוי עם הגן המסרטן מאדם, נדרשו החוקרים לאתר את המוקד ובו רצף Alu. איתור מוקד זה נעשה בעזרת **גלאי DNA** (תת-פרק ג'). בסיפור שיבוט זה גלאי ה-DNA היה מקטע DNA בעל רצף Alu שסומן בחומר רדיואקטיבי. הגלאי נועד להיצמד לרצף ה-Alu שבמוקד. לאחר ההיצמדות ניתן לאתר את מיקום הסימון הרדיואקטיבי וכך לאתר את המוקד שבו רצף Alu. החוקרים אימתו את השערתם שמוקד זה הוא גם המוקד שבו נמצא הגן המסרטן (פירוט נוסף על השימוש בגלאי לאיתור מוקד רצוי קיים באיור 4.6). ואכן, ויינברג ועמיתיו הצליחו באמצעות פרוטוקול ניסיוני זה שהצטיין בתחכום ובמקוריות, לשבט את הגן המסרטן ששמו Ras (תיבה 4.3).

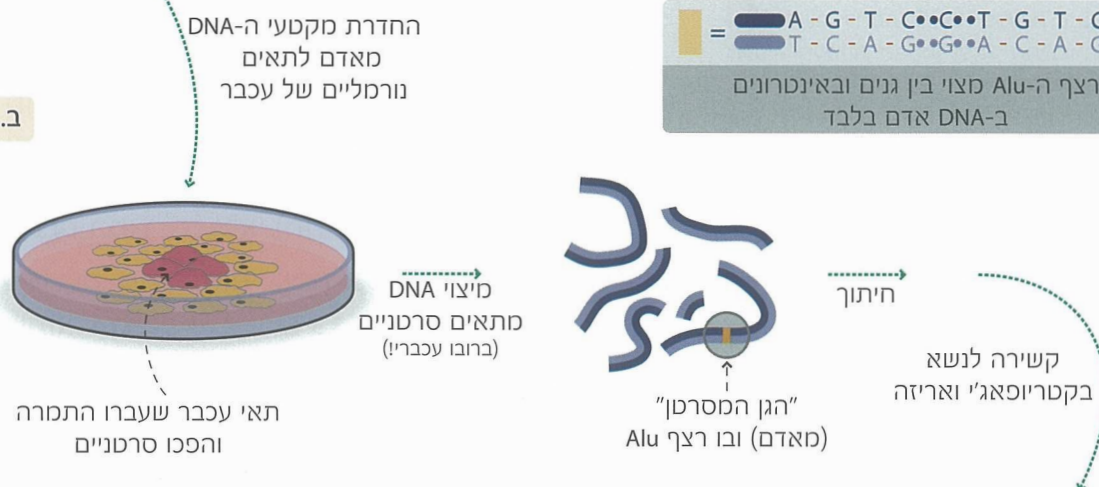
האתגר שבפניו ניצבו חוקרים וביניהם החוקר ויינברג היה לשבט את מקטע ה-DNA שהעברתו לתא נורמלי מסרטנת (אתגר שיבוט "הגן המסרטן"). הגישה שבה נקטו ויינברג ועמיתיו מתוארת באיור 4.2. DNA שמקורו בתאים סרטניים של אדם, הוחדר לתאים נורמליים של עכבר. אחד ממקטעי ה-DNA שמקורו בתא אדם יצר צבר תאים עכבריים סרטניים. DNA מהתאים הסרטניים העכבריים שימש להכנת **ספרייה גנומית** הנחוצה לשיבוט הגן המסרטן.



א.



ב.



ג.



ד. מדביקים חיידקים על ידי בקטריופאג'ים לקבלת מוקדים. דרוש גלאי לאיתור המוקד ובו רצף Alu המצוי בגן המסרטן

**איור 4.2: גישת ויינברג לשיבוט הגן המסרטן שמקורו בתאי אדם: מתאים סרטניים ועד לספרייה גנומית.**

כדי לאתר מקטע DNA מסוים המכיל את הגן המסרטן שנמצא בין מקטעי DNA רבים אחרים, קיימו ויינברג ועמיתיו את התהליך הבא. בשלב א' DNA מתאים סרטניים של אדם נחתך באנזים הגבלה. בשלב ב' הוחדרו מקטעים של DNA שמקורם בתאים סרטניים של אדם לתאים לא סרטניים של עכבר. מקטעי DNA שונים מתאים סרטניים של אדם השתבצו אקראית בגנום של תאי עכבר שונים. רק באחד מתאי העכבר השתבץ מקטע ובו הגן המסרטן של אדם. תא זה הפך להיות סרטני וייצר צבר תאים סרטניים. לאחר מכן הופק ונחתך מתאי העכבר הסרטניים DNA שבו הגן המסרטן מאדם. בשלב ג' הוחדרו המקטעים שהתקבלו למולקולות נשא של בקטריופאג', ולאחר אריזה התקבל אוסף בקטריופאג'ים רקומביננטיים גדול הקרוי ספרייה. בספרייה היה חבוי הבקטריופאג' עם הגן המסרטן. לבסוף, לאחר הדבקת חיידקים באמצעות הספרייה התקבלו מוקדים. החוקרים ניצלו את העובדה כי ה-DNA האנושי (אך לא העכברי) מכיל רצף DNA הקרוי Alu החוזר בתדירות גבוהה בגנום, וכי ניתן למצוא אותו באינטרונים של גנים. לכן יכלו החוקרים לגלות איזה מהמוקדים הכיל את הגן המסרטן על פי זיהוי המוקד שבו רצף Alu.

## תיבה 4.2: שיבוט DNA בעזרת ספרייה גנומית

כ-97% מכלל ה-DNA בתא אדם אינו מקודד לחלבון.

אפשר להסתכל על ספרייה באנלוגיה שלפיה מעטפת הבקטריופאג' החלבנית היא "כריכת הספר" וה-DNA הייחודי שבבקטריופאג' הוא "התוכן" הייחודי של "הספר". במקרה זה "הספרים" שונים בתוכן אך לא בכריכה. כמו בכל ספרייה יש צורך "לסדר" גם את הספרייה הגנומית. לשם כך יש להפריד בין הבקטריופאג'ים הרקומביננטיים כך שיהיה נוח מאוחר יותר לאתר אחד מהם ("הרצוי"). לשם כך נדרש שלב הדבקת חיידקים והפרדת מוקדים.

חלוצי השיבוט הממוקד של DNA מצאו עצמם מול משימות של שיבוט גנים מסוימים. הגן הרצוי לשיבוט מצוי אי שם בתוך ה-DNA של התא (הגנום). כל גן מצוי בין גנים אחרים (כ-20,000 גנים בתא אדם, כ-6,000 גנים בתא שמר וכ-4,000 גנים בחיידק) וגם אי שם בין "סתם" DNA, DNA שאין בו גנים. לצורך עבודת שיבוט יש לחתוך את ה-DNA למקטעים של 10Kb-20Kb, כך שמגנום נתון מתקבלים כחומר מוצא עשירות אלפי ואפילו מאות אלפי מקטעי DNA ייחודיים (תלוי בגודל הגנום של האורגניזם הנחקר). איתור גן בין מאות אלפי מקטעים הוא משימת שיבוט המצריכה גלאי (תת פרק ג').

שיבוט מתוך גנום דומה במהותו לתהליכי השיבוט שתוארו בפרק 3 (איורים 3.5 ו-3.6). לשם שיבוט מהגנום יש לחתוך את ה-DNA הגנומי ואת הנשא הבקטריופאג' ולקשור את עותקי הנשא למקטעי DNA גנומי.

בשיבוט מהגנום מתקבל אוסף גדול במיוחד של מקטעי DNA ייחודיים בתוך מולקולות נשא. לאחר מכן אורזים את ה-DNA בחלקיקים בקטריופאג'ים, ומתקבל אוסף בקטריופאג'ים רקומביננטיים. בשל ממדיו של אוסף זה הוא נקרא **ספרייה**. מכיוון שאוסף זה של מקטעי DNA במולקולות נשא מקורו בגנום, הוא נקרא **ספרייה גנומית**.

## תיבה 4.3: הביולוגיה המולקולרית של הסרטן היא סיפורם של אירועים מולקולריים רבים

כמו לגן הנקרא Ras, לגנים אחרים שמות אחרים כגון: Fos, Myc ועוד. לרוב אין למקור שמם של הגנים חשיבות.

הגן Ras שהוא אחד הגנים האחראים להתמרה סרטנית, שובט באמצעות גלאי ה-Alu. מיד לאחר שיבוט נקבע רצף הבסיסים של הגן (פרק 5). רצף הבסיסים של הגן מקודד לחלבון קטן שנקרא אף הוא Ras. ההכתעה הייתה שגן זה מצוי גם בכל התאים הנורמליים של האדם.

אם Ras מצוי בכל התאים הנורמליים שבגוף, מדוע Ras איננו מעורב בסרטן בכל התאים בגוף? כזכור, Ras ששובט - מקורו בתא סרטני, ושאלת השאלה מה מיוחד בעובדה זו? האם יש הבדל בין Ras שבתאים סרטניים לבין Ras שבתאים נורמליים, ואכן, נמצא כי רצף הנוקלאוטידים של הגן Ras המסרטן שונה מהרצף של הגן Ras בתאים נורמליים, וההבדל ביניהם הוא של נוקלאוטיד אחד! במילים אחרות, ב-Ras קסרָטן קיימת **מוטציה נקודתית**, (point mutation).

**ספרייה גנומית** משמשת לשיבוט גנים ומקטעי DNA מהגנום כמוסבר בתיבה 4.2. גלאי DNA ובו רצף בסיסים מסוים הקרוי Alu שימש לשיבוט ולאיתור הגן המסרטן. נמצא כי גן זה מקודד לחלבון Ras המצוי בכל תאי הגוף (כולל התאים הנורמליים). כמתואר באיור 4.3, הכיל הגן Ras המסרטן **מוטציה נקודתית**.

כמתואר באיור 4.3, כשבוחנים את ההשלכות שיש למוטציה נקודתית זו, מגלים שהיא אחראית להחלפה של חומצה אמינית אחת באחרת ב-Ras הסרטני בהשוואה ל-Ras הנורמלי. אין הבדלים נוספים ברצף המקודד לחלבון בין Ras המסרטן ו-Ras הנורמלי, ושניהם מקודדים לחלבונים שיש בהם רצף של 189 חומצות אמינו. מכאן ששינוי מזערי בגן מסוים מספיק כדי לתרום להתמרה סרטנית. אפיונים נוספים הראו שהשינוי המזערי מספיק כדי לגרום לחלבון המסרטן להיות פעיל פי 10 בזירוז חלוקת תאים בהשוואה לחלבון הנורמלי. פעילות יתר זו מכתובה הופעה והצטברות של תאים סרטניים.

Ras הוא גן שמוטציה בו הופכת את תוצרו החלבוני לפעיל יותר וכתוצאה מכך מתרחשת התמרה סרטנית. גן גורם התמרה (גן מסרטן) נקרא גם **אונקוגן** (Oncogene). Onco ביוונית פירושו: מסה, צבר או גידול, והשם משקף את יכולתו של אונקוגן לגרום להופעת צברי תאים וגידולים. חשוב: אם בוחנים גידולים סרטניים שונים, מוצאים כי לא בכל הגידולים ניתן לאתר Ras מוטנטי שהוא אונקוגני. במקביל נמצא שבגידולים סרטניים שונים יש לעתים מוטציות בגנים שונים מ-Ras, וגנים אלה מתפקדים כאונקוגנים לכל דבר. המסקנות הן ש-Ras אינו האונקוגן היחיד, שבמקרי סרטן שונים מעורבים אונקוגנים שונים ושיש יותר מדרך אחת להפיכתו של תא נורמלי לתא סרטני.

	1	.....	7	8	9	10	11	12	.....	188	189	מספר חומצת האמינו
<b>Ras הנורמלי באדם</b>	Met	.....	Val	Val	Val	Gly	Ala	Gly	.....	Leu	Ser	רצף חומצות האמינו
	ATG	.....	GTG	GTG	GTG	GGC	GCC	GCC	.....	CTC	TCC	רצף ה-DNA
<b>Ras המסרטן (האונקוגני)</b>	ATG	.....	GTG	GTG	GTG	GGC	GCC	GTC	.....	CTC	TCC	רצף ה-DNA
	Met	.....	Val	Val	Val	Gly	Ala	Val	.....	Leu	Ser	רצף חומצות האמינו

### איור 4.3: השוואת רצף ה-Ras הנורמלי לרצף Ras המסרטן.

בגן הנורמלי המקודד ל-Ras מצוי רצף נוקלאוטידים המאפשר לבטא חלבון Ras שבו 189 חומצות אמיניות. בגן ל-Ras המסרטן ישנה מוטציה: במרכז קודון 12 מצוי הנוקלאוטיד ובו הבסיס T (תימין) במקום הבסיס G (גואנין). עקב כך הקודון GGC הומר ל-GTC, ובזמן התרגום משובצת בעמדה 12 בחלבון Ras המסרטן החומצה האמינית ואלין (Val) במקום גליצין (Gly). שינוי ספציפי זה ב-Ras משפעל את החלבון והופך אותו לפעיל יותר.

### שאלה 4.1

הליך השיבוט של הגן Ras עלי ידי ויינברג ועמיתיו דרש תחכום ומקוריות. כדי להעריך זאת בצורה נכונה, יש צורך לענות על שאלה פשוטה: מדוע לא ניתן היה להשתמש בספרייה מתאים סרטניים של אדם כדי לשבט את הגן המסרטן בעזרת גלאי Alu?

## שיבוט באמצעות ספריות DNA משלים

יש ששיבוט גנים שלמים באמצעות ספרייה מלווה בקשיים בשל גודלם של הגנים. גודלם של הגנים מוכתב בין היתר על ידי נוכחות רצפי אינטרונים. לרוב אין עניין מיוחד באינטרונים מכיוון שאינם מיוצגים ב-RNA השליח שבו מצוי המידע לייצור חלבון. כמו כן המידע הגנטי ב-RNA השליח מספיק כדי לחקור רבים מתפקידי הגן. ניצול RNA שליח לחקר גנים ולצורך יישומים אחרים הוא נוח. אבל אליה וקוץ בה: כידוע RNA הוא חד-גדילי ולכן לא ניתן לשבטו באמצעות נשאים. כדי להתגבר על מגבלה זו משתמשים באנזים המייצר DNA מ-RNA. אנזים זה משמר את המידע המוצפן ב-RNA באופן מדויק ב-DNA שאותו הוא יוצר. האנזים נקרא Reverse transcriptase (בקיצור RT) ובעברית "המתעתק במהופך" או "המתעתק לאחור" (תיבה 4.4).

□ נהוג לחקור את תפקידיו של גן המקודד לחלבון בין היתר באמצעות יצירת עודף מלאכותי בתא של ה-RNA שליח שלו המקודד לחלבון.

### □ תיבה 4.4: המתעתק במהופך: גילוי, ייעודו ומקור שמו

החוקרים הוורד טמין ודיוויד בולטימור (Howard Temin and David Baltimore) חקרו וירוסים שהגנום שלהם עשוי RNA חד-גדילי הנקראים **רטרו-וירוסים**. חלק מהרטרו-וירוסים מסוגלים לגרום להתמרה סרטנית. תהליך ההדבקה של תאים של בעלי חיים על ידי רטרו-וירוסים מתואר באיור 4.4.

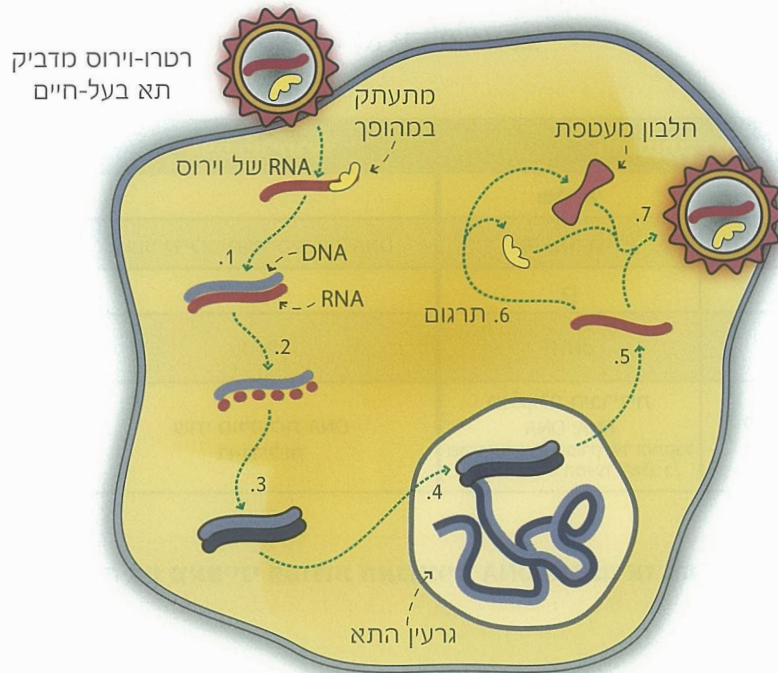
החוקרים שאלו את עצמם מה קורה בעקבות חדירת מולקולת RNA ויראלי לתא? הסתבר כי ה-RNA הויראלי נחוץ הן לתרגום החלבונים של הוירוס והן כחומר תורשתי בוירוסים חדשים שנוצרים בתא. אך כיצד מתרבה ה-RNA של הוירוס? נמצא שוירוסים מסוג זה מכילים בין היתר אנזים הנקרא "**מתעתק במהופך**" שמשתמש ב-RNA ליצירת DNA דו-גדילי. מפני שהדוגמה המרכזית גרסה מעבר מ-DNA ל-RNA בלבד, הרי שהמרת RNA ל-DNA נחשבה להיפוך מגמה, וזה מקור שמו של האנזים הויראלי, הנקרא גם "המתעתק לאחור" (Reverse transcriptase). נוכחות המתעתק במהופך היא שהקנתה לרטרו-וירוסים את שמם: המילה Retro פירושה לאחור, והיא באה לציין כי מ-DNA ל-RNA נחשב "קדימה", ואילו מ-RNA ל-DNA נחשב "אחורה".

משיצר המתעתק במהופך DNA ובו המידע הגנטי שמקורו ב-RNA של הוירוס, DNA זה עובר שיבוץ בגנום התא. כשהוא בגנום, ה-DNA שמקורו בוירוס מתועתק על ידי האנזים התאי RNA פולימראז. בעקבות התעתוק מתקבלים עותקים רבים של RNA ויראלי לצורכי תרגום חלבוני הוירוס וכדי שישמשו כגנום בוירוסים חדשים שנוצרים בתא (ריבוי). האנזים המתעתק במהופך נמצא רק בוירוסים מקבוצת הרטרו-וירוסים (במאגר הגנים של בעלי-חיים אין גן המקודד לאנזים זה). לימים התגלה כי אף מחולל מחלת **האיידס**, וירוס ה-HIV, הוא רטרו-וירוס. מעניינת לא פחות הייתה התגלית שגנום הרטרו-וירוסים מהטיפוס המסרטן מכיל מקטע RNA נוסף שאינו מצוי ברטרו-וירוסים שאינם מסרטנים. כאשר מקטע נוסף זה הומר ל-DNA על ידי האנזים המתעתק במהופך, ניתן היה לקבוע כי מקורו בגן של בעל-חיים. כמו כן התברר כי המקטע הנוסף המסרטן מוגדר כאונקוגן מכיוון שמקורו בגן תאי והוא מכיל מוטציות. על גילוי המתעתק במהופך בשנת 1970 זכו טמין ובולטימור בשנת 1975 בפרס נובל.

כלי חשוב ב"ארגז הכלים" של העוסקים בהנדסה גנטית הוא האנזים המייצר DNA מ-RNA והנקרא **המתעתק במהופך** מקורו של אנזים זה **ברטרו-וירוסים** שהם וירוסים שהחומר התורשתי שלהם הוא RNA חד-גדילי. ישנם רטרו-וירוסים בעלי יכולת התמרה סרטנית (לרוב בתאי בעלי-חיים ולא בתאי אדם) או רטרו-וירוסים בעלי יכולת לגרום למחלות, דוגמת וירוס ה-HIV המחולל **איידס**.

## האנזים המתעתק במהופך ויצירת DNA משלים

על פי "הדוגמה המרכזית", מ-DNA נוצר RNA בתהליך התעתוק, ואילו מ-RNA נוצר חלבון בתהליך התרגום. במשך שנים רבות לא נחשב ייצור DNA מ-RNA לדבר אפשרי. היה זה חקר וירוסים שהגנום שלהם בנוי מ-RNA חד-גדילי שאפשר לגלות את האנזים המתעתק במהופך. אנזים זה הפך לכלי חשוב ב"ארגז הכלים" של העוסקים בהנדסה גנטית. על גילוי אנזים זה, ייעודו ומקורו שמו, ראו תיבה 4.4.



### איור 4.4: מחזור חיי הרטר-וירוס: מהדבקה ועד הנצחה של חלקיקי וירוס חדשים.

רטר-וירוסים שונים מדביקים תאים אאוקריוטים שונים. כך לדוגמה, וירוס ה-HIV מחולל ה-AIDS, שאף הוא רטר-וירוס, מדביק תאים של המערכת החיסונית באדם. בתהליך ההדבקה הרטר-וירוס נספח לתא המטרה ומחדיר לתוכו את ה-RNA ואת האנזים המתעתק במהופך. משהוחדר ה-RNA של הרטר-וירוס לתא מסנתז המתעתק במהופך גדיל DNA על פי ה-RNA ומתקבל היברידי RNA:DNA (שלב 1). לאחר שה-RNA מפורק מהיברידי זה (2), מסנתז המתעתק במהופך, או DNA פולימראז תאי, גדיל DNA משלים ומתקבל DNA דו-גדילי (3) העובר שיבוץ בגנום (4). כמקומו בגנום מקטע ה-DNA המקודד לחלבוני הוירוס מתועתק ל-RNA ועותקים רבים יוצאים לציטופלסמה (5). ה-RNA מתורגם, ונוצרים חלבוני הוירוס (6); RNA וחלבוני הוירוס יוצרים חלקיקי וירוס (7) שיכולים להנץ מהתא ולהדביק תאים נוספים.

איך פועל האנזים המתעתק במהופך, מה הן דרישותיו ובמה שונה פעילותו מפעילות ה-DNA פולימראז?

**תחל (primer)** הוא אוליגו-נוקלאוטיד (רצף קצר וחד גדילי של נוקלאוטידים). תחל יכול להיצמד לגדיל RNA או DNA. כשמוסיפים למבחנה אנזימים מתאימים הם יכולים להאריך את התחל על פי המידע המצוי בגדיל שאליו נצמד.

את התשובה המלאה לשאלה זו ניתן למצוא בטבלה 4.1 ובאיור 4.5. בקצרה, האנזים נזקק לגדיל תבנית, ובשלב הראשון זהו גדיל ה-RNA. כמו כן זקוק האנזים לתחל הנצמד ל-RNA (ראו תיבה צדדית). המתעתק במהופך מאריך את התחל על פי המידע בגדיל ה-RNA תוך כדי הוספת נוקלאוטידים מסוג dNTP, וכל נוקלאוטיד שמתווסף משלים לנוקלאוטיד

שעל ה-RNA (מול A יתווסף ד וכדומה). על פי המידע הגנטי של ה-RNA מתקבל עותק **משלים** של DNA חד-גדילי. לכן התוצאה של השלב הראשון היא מולקולה היברידי (מולקולת כלאיים) שגדיל אחד בה הוא RNA והגדיל השני הצמוד לו הוא גדיל DNA. בהמשך מתפרק ה-RNA הצמוד ל-DNA. פירוק זה מאפשר לאנזים DNA פולימראז או לסוגים מסוימים של המתעתק במהופך להתחיל בסנתזה של גדיל DNA נוסף על פי תבנית ה-DNA החד-גדילי שבסופה מתקבל DNA דו-גדילי. בתהליך שבו כוורת מולקולה של RNA חד-גדילי ל-DNA דו-גדילי נשמר המידע הגנטי שהיה ב-RNA גם ב-DNA שנוצר. מכיוון שההמרה נעשתה תוך כדי יצירת גדילים משלימים, נקרא ה-DNA שנוצר מה-RNA **DNA משלים (complementary DNA)** ובקצרה הוא נקרא **cDNA**.

המתעתק במהופך		DNA פולימראז	
שלב ב'	שלב א'		
DNA חד-גדילי	RNA (חד-גדילי)	שני גדילים משלימים של DNA	גדיל תבנית
כן	כן	כן	דרישה לתחל
dNTP	dNTP	dNTP	הארכת תחל על ידי הוספת:
מולקולה של DNA דו-גדילי	מולקולה היברידי RNA: DNA שה-RNA שבה מפורק מיד ומתקבל DNA חד-גדילי המיועד לשלב ב'.	שתי מולקולות DNA דו-גדיליות	תוצאה סופית

**טבלה 4.1: השוואה בין מאפייני פעילות האנזימים DNA פולימראז והמתעתק במהופך.**

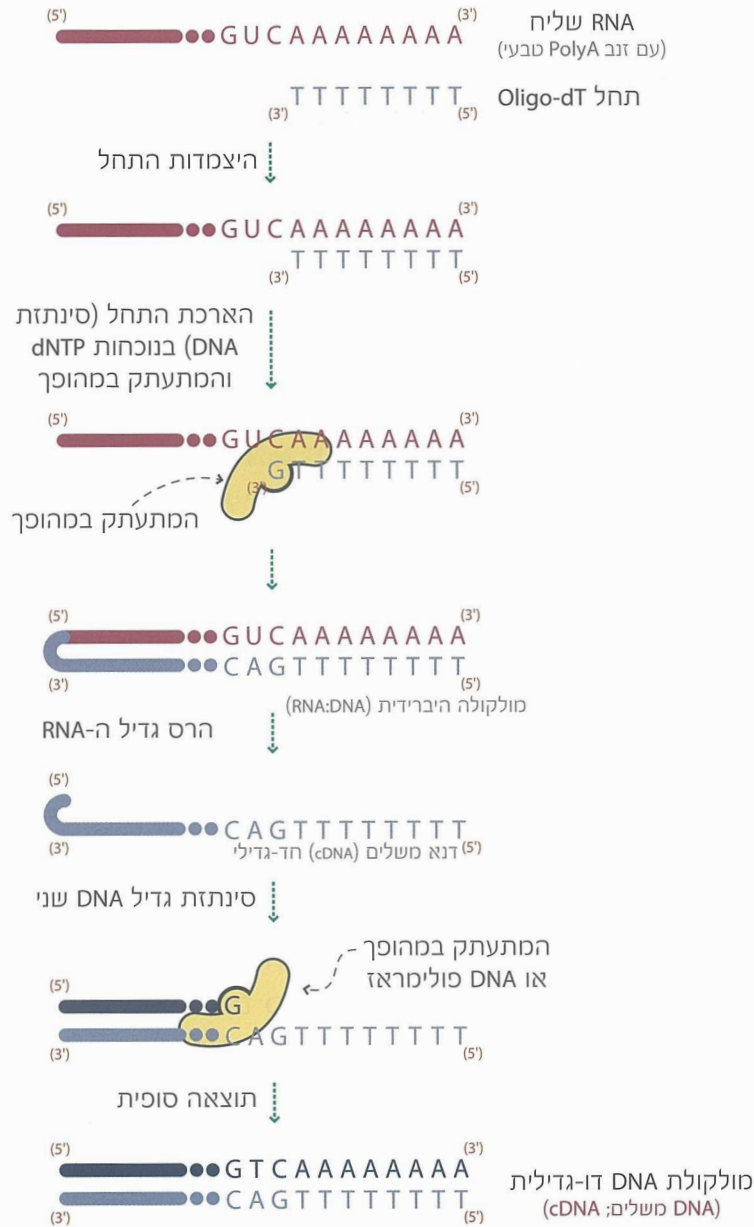
## יצירת ספריית DNA משלים

כדי לשבט ולאחר DNA משלים מסוים נהגו חלוצי השיבוט לייצר ספרייה של DNA משלים. חומר המוצא למשימה של שיבוט DNA משלים מסוים הוא מולקולות ה-RNA שבתא.

השלים ליצירת **ספרייה של DNA משלים** הם אלה:

- הפקה של RNA:** מפיקים RNA שליה מתאים. מתקבל אוסף מולקולות RNA שליה שמקורן מגנים רבים שהתבטאו בתאים בזמן שלפני ההפקה.
- יצירת DNA משלים (cDNA):** לשלב זה נדרשים מלבד ה-RNA השליה משלב א' גם תחל והאנזים המתעתק במהופך. ניתן להשתמש בתחל שיש בו רק תימין (T) (Oligo-dT) הנצמד לזנב ה-Poly A בקצה 3' של ה-RNA השליה. האנזים מאריך את התחל על ידי הוספת נוקלאוטידים משלימים. בשלב זה מתקבל DNA משלים הטרוגני שמקורו בגנים שונים. שלבי ההמרה מ-RNA שליה ל-DNA משלים מתוארים באיור 4.5.

בטבלה 4.1 יש סיכום של הדרישות לפעילות המתעתק במהופך. באיור 4.5 מתוארת פעילותו של המתעתק במהופך לצורך המרת RNA חד-גדילי ל-DNA דו-גדילי הנקרא **DNA משלים** או **cDNA**. מכיוון שבקצהו של RNA שליה יש מקבץ טבעי של נוקלאוטידים מטיפוס A (המקבץ נקרא A-Poly), ניתן להשתמש בתחל של Oligo dT להכנת DNA משלים. תחל זה נצמד לרצף ה-Poly A שבקצה ה-RNA השליה.



**איור 4.5: מ-RNA שליח ל-DNA משלים דו-גדילי באמצעות המתעתק במהופך.**

RNA שליח משמש כתבנית, וניתן להשתמש בתחל שבו נוקלאוטידים מטיפוס T הנצמד לזנב A של ה-RNA השליח. התבנית והתחל מאפשרים בנוכחות המתעתק במהופך לקבל DNA משלים חד-גדילי. בשלב הבא המתעתק במהופך או DNA פולימראז תאי מייצרים על פי ה-DNA המשלים החד-גדילי DNA משלים דו-גדילי.

ג. **החדרת ה-DNA המשלים לנשא ויצירת ספרייה:** קושרים מולקולות DNA שונות משלב ב' לעותקים רבים של נשא היכול להיות פלסמיד או בקטריופאג'. מתקבל אוסף הטרוגני של מולקולות רקומביננטיות הבנויות כל אחת מנשא שאליו חובר מקטע DNA ייחודי. האוסף נקרא ספרייה.

ד. **השלמת השיבוט:** מחדירים את הספרייה לחיידקים. עקב כך יוצרים בידוד וריבוי של מקטעי DNA ייחודיים במוקדים או במושבות. שלב זה הוא השלב האחרון לפני איתור על ידי גלאי של ה-DNA הרצוי במוקד או מושבה מסוימים.

חשוב להעריך כי קיימים הבדלים עקרוניים בין ספרייה גנומית לספרייה של DNA משלים. סיכום ההבדלים מצוי בתיבה 4.5.

### □ תיבה 4.5: על ההבדלים העקרוניים בין ספרייה גנומית לספריית DNA משלים

אחד המאפיינים של ספרייה גנומית הוא כי רוב המקטעים בה אינם מכילים גנים אלא DNA אחר. כמו כן בספרייה הגנומית ניתן למצוא ייצוג לכל הגנים, ואין העדפה לייצוג של גן אחד על פני אחר. לעומת זאת, בספריית DNA משלים יש ייצוג שונה לגנים שונים. עובדה זו נובעת בראש ובראשונה מכך שבתא נתון (תא מסוג מסוים: תא דם, תא מוח וכו') ובמצב נתון שבו שרוי התא, אין נוכחות של RNA שליה של כל הגנים (פרק 7). ויותר מכך, בתא יש כמויות שונות של RNA שמקורו בגנים שונים: מאחדים יש מעט ומאחרים הרבה. לכן בספריית DNA משלים יהיו הרבה עותקים של DNA משלים של גנים שהתבטאו בתא ושנוצר מהם הרבה RNA (ייצוג גבוה לגנים המתבטאים במיוחד). בשל כך קיים סיכוי נמוך לאתר בספרייה מסוימת DNA משלים הנגזר מן שאינו מתבטא ברמה גבוהה בתא. לכן כדי לשבט DNA משלים הנגזר מן מסוים, יש לבחור בקפידה רק אותם התאים שנוצר בהם הרבה RNA מהגן הרלוונטי.

לאחר שנוצרה ספרייה, ניגשים לאיתור הגן או ה-DNA המשלים ועושים זאת באמצעים הכוללים את **הגלאי, התספיג וההיברידיזציה**. מה הם סוגי הגלאים השונים, מה הם תכונותיהם וכיצד משתמשים בהם? מה תפקידם של התספיג וההיברידיזציה?

## איתור הגן/ה-DNA הרצוי בספרייה באמצעות גלאי, תספיג והיברידיזציה

בגמר תהליך יצירת ספרייה גנומית או ספריית DNA משלים מתקבלות כמה עשרות צלחות ובהן כמה מאות אלפי מוקדים שבאחד מהם עשוי להימצא הגן הרצוי. ללא אמצעי יעיל לגילוי המוקד האחד מבין מאות אלפי המוקדים ואשר בו מצוי הגן הרצוי, תהיה המשימה לאיתורו חסרת סיכוי, כמוה כמציאת "מחט בערימת שחת". האמצעי הראשי לאיתור מקטע DNA מסוים או גן מסוים נקרא "גלאי".



כדי לאתר מקטע DNA רצוי, ובכלל זה גן, באחד מהמוקדים בספרייה של בקטריופאג'ים בעזרת גלאי, מקיימים את התהליך המתואר באיור 4.6 ששלביו הם אלה:

□ הפילטר נראה כפיסת נייר עגולה או ריבועית (בהתאם לצורך). במקרים מסוימים זהו נייר ניטרוצלולוז, אך קיימים חומרים מתקדמים יותר המצויים בשימוש כיום. הפילטר נקרא כך משום שהוא מאפשר לנוזלים לעבור דרכו, אך "סופח" מולקולות גדולות.

□ פילטר שספח חומר, כגון DNA, RNA וחלבונים, נקרא בשם **תספיג** (Blot). ה"חומר" הרלוונטי שנספג (נספח) לפילטר במקרה הפרטי של הספרייה הגנומית הוא בקטריופאג'ים ובכלל זה ה-DNA הייחודי שבהם.

#### א. העברת הספרייה לפילטר וקבלת התספיג: כדי

לאפשר איתור של ה-DNA הרצוי המצוי באחד המוקדים, מעבירים את ה-DNA שבמוקדים למשטח דק וקשיח הקרוי פילטר. לשם כך מניחים את הפילטר על המוקדים, ומקצת מתכולתו של כל מוקד ושל ה-DNA הייחודי שבו נספגת לפילטר בתהליך שבסופו מתקבל **תספיג**. התספיג הוא הפילטר שעליו ממוקמים כתמי חומר שמקורם במוקדים. הכתמים ממוקמים כתמונת ראי מדויקת של המוקדים שעל הצלחת.

#### ב. הכנת הגלאי: לצורך איתור ה-DNA הרצוי על התספיג משתמשים בגלאי. **גלאי** (probe) הוא מולקולה

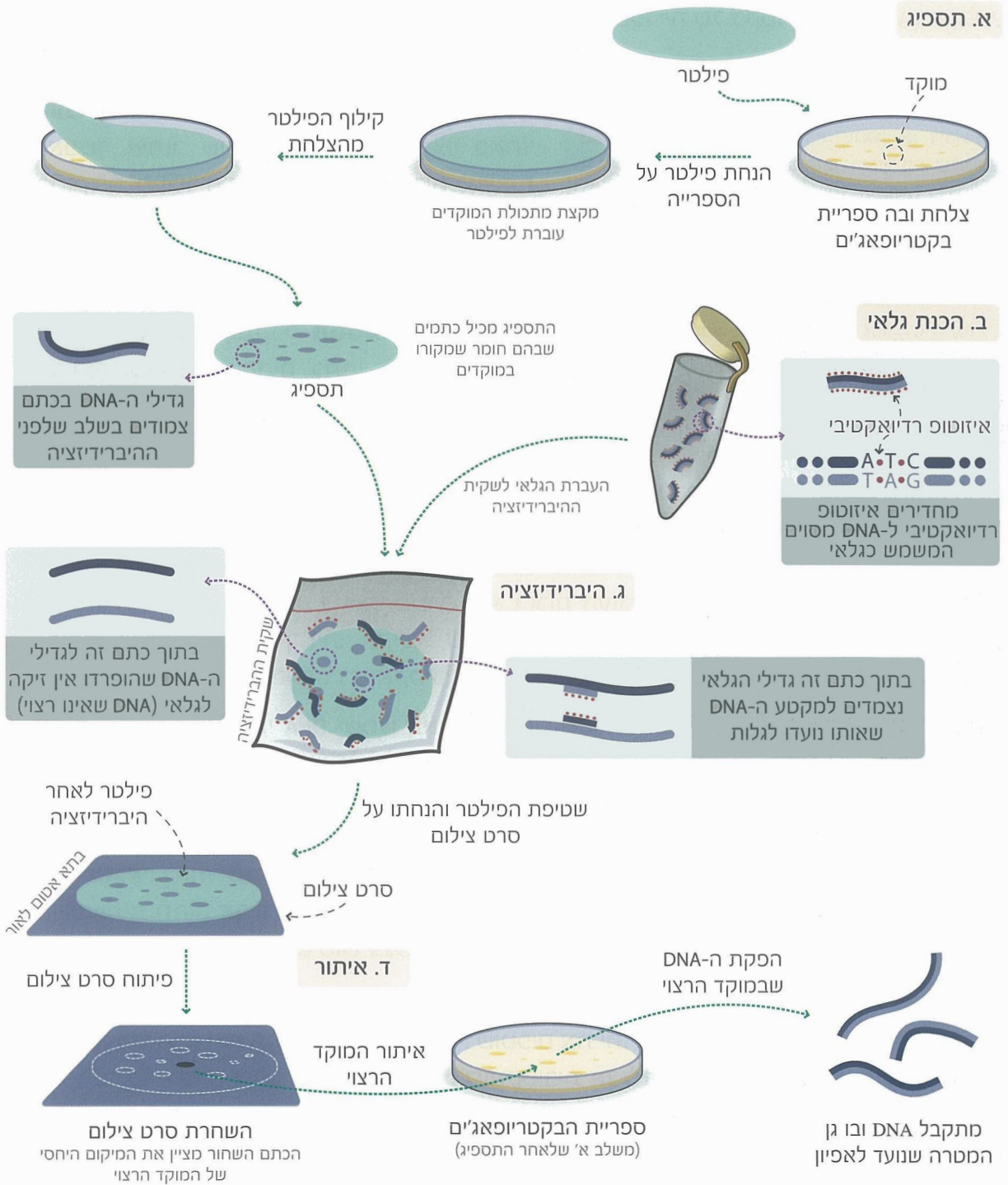
שיש לה יכולת להיצמד למולקולה אחרת שאותה נועד הגלאי לגלות (מולקולת המטרה). גלאי יכול להיות מולקולת DNA, RNA או נוגדן. היצמדות הגלאי למטרה מתקיימת בזכות קשירה לא קוולנטית ביניהם. היצמדות גלאי DNA ל-DNA מטרה היא בזכות העובדה שלגלאי גדילים בעלי רצף משלים לרצף ה-DNA המטרה. לצורך זיהוי הקישור של הגלאי למטרה משתמשים בגלאי מסומן. הסימון על הגלאי הוא בדרך כלל איזוטופ רדיואקטיבי או מולקולה פלואורסצנטית.

#### ג. היברידיזציה: כדי שגלאי DNA ישמש באיתור ה-DNA המטרה הרצוי, יש לקיים תהליך **היברידיזציה**.

בתהליך ההיברידיזציה הגלאי נצמד ל-DNA מטרה ונוצר **היבריד** של גלאי - DNA מטרה. ההיבריד מתקבל באחד מהכתמים שבתספיג שמקורו במוקד **ייחודי** של הספרייה. לקיום ההיברידיזציה נעזרים בשקית אטומה שבה מאפשרים הפרדה של גדילי ה-DNA שמקורם במוקדים וכן הפרדה של גדילי הגלאי. לאחר מכן נצמדים גדילי ה-DNA מסומן של הגלאי לגדילי ה-DNA שעל הפילטר. היצמדות משמעותית תהיה אך ורק לאותו כתם שמקורו במוקד ייחודי של בקטריופאג'ים שבו ה-DNA המטרה. מידע נוסף על עקרונות השימוש בגלאי ובהיברידיזציה (ולאו דווקא במקרה המיוחד של ספרייה) נמצא בתיבה 4.6.

#### ד. זיהוי המוקד הרצוי ובו הגן (או ה-DNA) הרצוי: שוטפים את יתרת הגלאי המסומן שלא נצמד וחושפים

את הפילטר לסרט צילום הרגיש לקרינה רדיואקטיבית או לאור. סרט הצילום מושחר רק באותה נקודה שבה מצוי הכתם ובו גלאי שנצמד למקטע ה-DNA רצוי. מיקומה היחסי של "הנקודה השחורה" על הפילטר זהה למיקומו היחסי של המוקד הרלוונטי בצלחת (איור 4.6). על פי מידע גאוגרפי זה שבים לצלחת המכילה את המוקדים המקוריים ומבודדים ממנה את המוקד שבו ה-DNA הרצוי. מאפיינים את ה-DNA הרצוי במספר אמצעים וביניהם חיתוך ולבסוף קביעת רצף ה-DNA.



**איור 4.6: תהליך איתור DNA מטרה המצוי אי שם בספרייה באמצעות גלאי, תספיג והיברידיזציה.**

השלבים לאיתור DNA מטרה בספרייה: (א) העברת הספרייה לפילטר באמצעות תספיג. (ב) סימון מקטע DNA מסוים המשמש כגלאי רדיואקטיבי. (ג) ההיברידיזציה: לשם כך מעלים טמפרטורה, מאפשרים לגדילי ה-DNA והגלאי להיצמד לכתם מסוים על הפילטר. (ד) הכתם עם הגלאי הרדיואקטיבי מאפשר השחרת סרט צילום. ניתן בעקבות זאת לאתר את המוקד הרצוי ובו גן המטרה.

מקיימים **היברידיזציה** כדי לאפשר לגלאי DNA להיצמד ל-DNA הרצוי והמצוי בכתם שאותו רוצים לאתר (לגלות) (תיבה 4.6). שלב ד' באיור 4.6 מתאר כיצד מאתרים את המוקד בספרייה שבו ממוקם ה-DNA הרצוי וכך מושלם תהליך השיבוט והאיתור.

## □ תיבה 4.6: היברידיזציה של חומצות גרעין ויישומיה

ניתן לאפשר לחד-גדיל של חומצת גרעין (DNA או RNA) ממקור מסוים להיצמד לחד-גדיל של חומצת גרעין ממקור אחר בתהליך הנקרא היברידיזציה (הפירוש המילולי של היבריד הוא בן-כלאיים, משהו המורכב משני חלקים ממקורות שונים). כדי שהיברידיזציה תתרחש, מולקולות החד-גדיל שעתידות להיצמד זו לזו צריכות להיות בעלות רצפים של בסיסים משלימים. כתוצאה מההיצמדות נוצרת חומצת גרעין דו-גדילית היברידיית. ההיברידיזציה מנוצלת, בין השאר, לאיתור (גילוי) של גנים וגם לקביעת כמותן ואיכותן של חומצות גרעין (פרק 7).

בתהליך ההיברידיזציה של חומצות גרעין מערבבים מקטעי "גלאי" עם מקטעי "מטרה". גלאי חומצת גרעין הוא בעל רצף ייחודי המשלים לרצף DNA או RNA המטרה שאותו נועד לגלות. אם הגלאי והמטרה דו-גדיליים, הרי שלפני ההיברידיזציה מפרידים את גדיליהם באמצעות חימום או טיפול בחומר כימי מתאים (דנטורציה). לאחר ערבוב הגלאי והמטרה מאפשרים היצמדות בין חד-גדילי הגלאי וחד-גדילי המטרה (על פי הכלל A-T ו-G-C). במקרה הפרטי של עבודה עם ספריות, המטרה היא ה-DNA או הגן החבוי באחד מהכתמים שבתספיג, והגלאי נצמד למטרה ומגלה את הכתם הרצוי.

היברידיזציה של חומצות גרעין לצורך גילוי מקטע DNA רצוי (מטרה) מחייבת שימוש בחומצת גרעין מסומנת בחומר רדיואקטיבי או בחומר פלואורסצנטי זהה (פולט אור). מי בעצם מסומן - הגלאי או המטרה? במקרים כמו איתור DNA בספרייה (או RNA בתספיג צפוני - כמתואר בפרק 7) מקובל לסמן את הגלאי. במקרים אלה הגלאי מצוי בתמיסה בעוד ש-DNA או RNA המטרה הוא צמוד-משטח (לדוגמה, פילטר). לעומת זאת, יש מקרים שבהם מקיימים "היברידיזציה במהופך" שבה DNA המטרה ההטרוגני הוא זה שמסומן ושנמצא בתמיסה בעוד שהגלאי הוא צמוד-משטח ואינו מסומן. לצורך מימוש מערך שכזה ממקמים גלאים שונים בסמיכות רבה זו לזו על פני משטח הקרוי "שבב DNA" (פרק 7). לפיכך חשוב להעריך כי הסימון אינו משמש להגדרת הגלאי והמטרה. במקום זאת, ייחודה של המטרה הוא בהימצאותה (של המטרה) בתוך סביבה של מולקולות שונות זו מזו (לעתים אין יודעים עליה הרבה), בעוד שהגלאי שזהותו המולקולרית ידועה, משמש "לגילוי המטרה החבויה".

לצורך היברידיזציה טיפוסית, יש צורך לבצע דנטורציה של DNA דו-גדילי לקבלת DNA חד-גדילי. הדנטורציה מושגת על ידי חימום ו/או טיפול כימי המאפשרים ניתוק קשרי המימן שקושרים שני גדילי DNA משלימים. הדנטורציה הדרושה כדי להפריד לגמרי שני גדילי DNA משלימים זה מזה, מושפעת בין השאר מהגורמים הבאים:

1. אורך הגדילים: דרושה אנרגיה רבה יותר לפירוק גדילים ארוכים עם קשרי מימן רבים בהשוואה לכמות האנרגיה המושקעת בפירוק גדילים קצרים.
2. הרכב הבסיסים: מכיוון שלבסיס G-C יש קשר מימן נוסף בהשוואה לבסיסי A-T, דרושה יותר אנרגיה להפרדת גדילים עתירי G-C.

ניתן לשלוט בדנטורציה באמצעות הסביבה הכימית: יונים כגון  $\text{Na}^+$  מייצבים את הדו-גדיל, בעוד שכימיקלים מסוימים כגון Formamide גורמים לערעור יציבות קשרי המימן שיש להם תפקיד בייצוב המבנה הדו-גדילי.

לסיום, לא רק DNA משמש כגלאי: גם נוגדן כנגד חלבון מסוים יכול לשמש כגלאי לשיבוט DNA. לשם כך משתמשים בסוג מיוחד של ספריית DNA משלים שבה DNA המטרה יכול לתפקד לצורך יצירת RNA וחלבון. כך, בכל מוקד בספרייה נוצר גם חלבון ייחודי שמקורו ב-DNA המשובט. הנוגדן יגלה את הכתם הרצוי שבו החלבון הרלוונטי. אחר-כך יהיה ניתן לבודד מהמוקד את ה-DNA הרצוי המקודד לחלבון הרלוונטי ולהרבותו. לשימוש בנוגדנים כגלאים יש יתרון שכן אין צורך במידע מוקדם על רצף ה-DNA המיועד לשיבוט.

## אסטרטגיות לשיבוט DNA משלים הנגזר מגנים שונים

אסטרטגיית שיבוט היא אוסף של דרכי פעולה הנחוצות להגברת הסיכוי להצלחת השיבוט. צריך לבחור אסטרטגיית שיבוט בקפידה לפני שמתחילים בשיבוט. על פי האסטרטגיה יבחרו התאים שמהם יופק ה-DNA או ה-RNA וייקבעו האנזימים שימשו להכנת ספרייה וסוג הנשאים שימשו בספרייה. כמו כן ייקבע איזה גלאי ואיזה סוג היברידיזציה יתבצע, וכל זאת לצורך איתור ה-DNA הרצוי. תכנון אסטרטגיית שיבוט מצריך לשאול את השאלות הבאות:

1. מה רוצים לשבט (גן או מקטע DNA גנומי אחר או אולי DNA משלים)?
2. באילו תאים רצוי להשתמש כדי לקבל מהם DNA או RNA לצורך השיבוט?
3. איזה מידע ו/או חומרים קיימים במעבדה שיכולים לעזור בבחירת גלאי מתאים?

כיום, בעקבות המידע הקיים מפרויקטי הגנום השונים, השימוש בספריות גנומיות הולך ופוחת. לכן מובאים כאן רק שיקולים בבחירת אסטרטגיות לשיבוט DNA משלים. אחד השיקולים המרכזיים הוא בחירת תאים להפקת RNA. כבר הומחש כי לכמות ה-RNA הרלוונטי בתא מסוים יש חשיבות רבה להצלחת השיבוט (תיבה 4.5). ככלל, לשיבוט DNA משלים הנגזר מגן מסוים, צריך לבחור רק בתאים שבהם הגן הרלוונטי מבטא כמות רבה יחסית של RNA. לדוגמה, כדי לשבט DNA משלים המקודד להורמון הגדילה (Growth Hormone), הופק RNA מתאי בלוטת יותרת המוח. רק בתאים אלה נוצר הרבה RNA מהגן להורמון הגדילה. RNA זה משמש להכנת DNA משלים.

□ הורמון הגדילה הוא חלבון וכשמו כן הוא, הוא אחראי לגדילה והתפתחות. היעדר הורמון זה אצל ילדים מתבטא בננסות שבה הפרופורציות בין איברי הגוף נכונות, אבל הילדים נמוכים יחסית. ההורמון מיוצר באזור קטן במוח הנקרא בלוטת יותרת המוח (היפופיזה). משם ההורמון מופרש לזרם הדם ומשפיע על גדילת עצמות הגוף, על בניית מסת השריר ועל חילוף החומרים בתאים.

השיקול האחר בבחירת אסטרטגיית השיבוט, ובכלל זה סוג הספרייה הנדרש, מביא בחשבון את סוג הגלאי הנדרש כדי לאתר את השבט בספרייה. כך, במקרים רבים של שיבוט DNA משלים, אין בתחילת הדרך מקטע DNA היכול לשמש כגלאי. במקרים כאלה נחוץ חלבון רלוונטי שנוצר מה-DNA שאותו רוצים לשבט. משיגים את החלבון הרלוונטי כשהוא

נקי ובכמויות מספיקות שמאפשרות לקבוע את הרצף שלו או להכין נוגדנים כנגדו. אם מצליחים בקביעת רצף החלבון, קובעים מה עשוי להיות רצף ה-DNA הרלוונטי המקודד לחלבון. עושים זאת על פי הקוד הגנטי (כריכה פנימית אחורית). במקרה כזה שואפים להשיג גלאי DNA ולשם כך מסנתזים כימית (ללא אנזים) תערובת אוליגו-נוקלאוטידים שבה גם האוליגו-נוקלאוטיד הרלוונטי. אוליגו-נוקלאוטיד זה נוצר על פי רצף החלבון הרלוונטי, והוא בעל יכולת להיצמד ל-DNA המשלים שאותו רוצים לשבט.

כשניגשים לשיבוט DNA משלים, יש לתכנן קודם את אסטרטגיית השיבוט. ראשית, יש לבחור תאים שמהם יופק RNA. בוחרים בתאים שבהם הגן הרלוונטי מתבטא באופן מוגבר, כלומר תאים שיש בהם הרבה RNA רלוונטי שאת ה-DNA המשלים שלו רוצים לשבט. כך, ה-DNA המשלים המקודד להורמון הגדילה שובט מתאי יותרת המוח שבהם הגן מתבטא ומייצר RNA.

בשלב הבא מסמנים אוליגו-נוקלאוטידים אלה בחומר רדיו-אקטיבי כדי שימשו כגלאי בהיברידיזציה לאיתור השבט הרצוי בספריית DNA משלים "רגילה".

□ לצורך קבלת נוגדנים שימשו כגלאים של חלבון יש להשתמש בחלבון כדי לחסן בעלי חיים שייצרו בגופם נוגדנים כנגד החלבון. הנוגדן מיוצר על ידי המערכת החיסונית ויש לו זיקה (יכולת קישור) חזקה לחלבון המסוים.

□ לרוב, אי אפשר להשתמש בגלאי מסוג נוגדן לצורך איתור מוקד בספרייה גנומית שהוכנה מיצורים אאוקריוטים. הסיבה היא שבחיידיקים הסרים האנזימים הנחוצים לסילוק איטרונים. לפיכך, גם אם נאפשר ל-DNA גנומי אאוקריוטי להיות מתועתק בחיידקים זה יהיה חסר ערך כי ה-RNA שיתקבל לא יעבור שחבור ולכן תרגומו לחלבון רלוונטי יכשל במרבית המקרים. בהעדר חלבון מתאים במוקדי הספרייה אין אפשרות להשתמש בנוגדן כגלאי.

אם מצליחים להשיג נוגדנים כנגד החלבון הרלוונטי, ניתן לבחור באסטרטגיית איתור ייחודית אחרת בה הנוגדן משמש כגלאי. לניצול הנוגדן כגלאי יש להשתמש בספריות המאפשרות ביטוי RNA וחלבון מה-DNA המשלים שבהן. מכיוון שהתספיג הוא פילטר המכיל לא רק DNA אלא גם חלבונים, ניתן להשתמש בנוגדן מסוים כגלאי נגד החלבון המתבטא במוקדי הספרייה. מאפשרים לנוגדן המסוים לקשור את החלבון המצוי בכתם הרלוונטי. לאחר מכן מבודדים את המוקד שבו ה-DNA המשלים הרצוי.

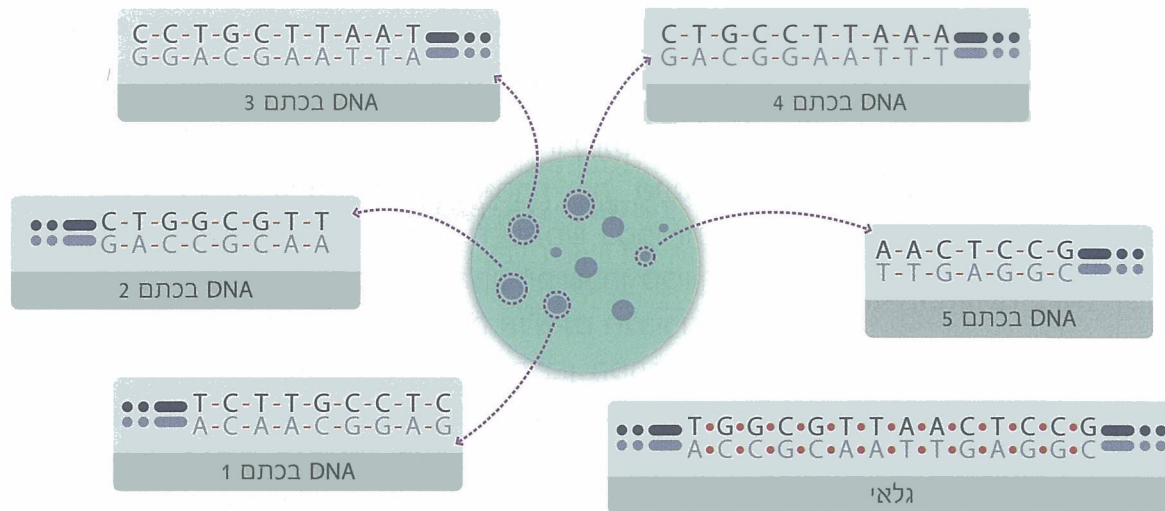
לסיום, שיבוט גנים ו-DNA משלים **באמצעות ספריות** הולך ופוחת משתי סיבות עיקריות: אחת הסיבות היא שבמסגרת פרויקטי גנום רבים שובטו הגנים השונים בשיטת "הסרט הנע". הגנים ומידע על הרצף שלהם זמינים לכול. פרויקטי הגנום אפשרו גם לייצר אוספים של DNA משלים הנגזר מגנים

רבים, ואלו נעשו זמינים לכל מי שנזקק להם. הסיבה הנוספת שבגללה פחת השיבוט באמצעות ספריות היא שניתן **לשבט במבחנה** (ללא חיידקים) באמצעות תהליך הקרוי PCR (פרק 6). לעומת זאת, שיבוט באמצעות ספריות חשוב עדיין במקרים שבהם יש צורך לשייך לתופעה מסוימת את הגן האחראי כמו במקרה של הגן המסרטן Ras. במקרה כדוגמת זה, גם כיום אין מנוס מספריות, שכן כשמדובר בתופעות נצפות מסוימות, ייתכן שאין רמז לגבי רצף ה-DNA הרלוונטי האחראי לתופעה. מסיבה זו, ומכיוון שחלק מהשיטות שתוארו בפרק זה עדיין מיושמות, גם אם לא למטרות שיבוט, יש עניין בנושאים הנדונים בפרק זה. כך לדוגמה, הכנה של DNA משלים, תספיגים מסוגים שונים והיברידיזציות משמשים עד היום למטרות שונות (פרקים 6-8).

## שאלה 4.2

א. באיור **ש' 4.2** מתואר תספיג ובו כתמים המכילים DNA. כמו כן ניתן למצוא באיור פירוט מקצת רצף ה-DNA בחמישה כתמים. בנוסף מתואר מקצת רצף הגלאי. לאחר היברידיזציה בין גלאי מסוים ל-DNA המטרה שבכתמים וחשיפת סרט צילום לתספיג, לאילו כתמים ייצמד הגלאי שכתוצאה מההיצמדות יושחר סרט הצילום? מה יכול להיות ההסבר האפשרי לתוצאת ההיברידיזציה?

ב. החוקרים גנטית וגנטי שמחו ללמוד על השיבוט של גן מסרטן באמצעות גלאי Alu והחליטו לשאול אם בתאים סרטניים מסוג אחר, שלא נחקר עדיין, מצוי גן מסרטן שונה מ-Ras. בניסוי השיבוט שלהם, שכלל מערך ניסיוני דומה למערך שהביא לשיבוט Ras המסרטן, הם אתרו שני מוקדים ובהם DNA שזוהה על ידי גלאי Alu. לפני אפיון רצף ה-DNA במוקדים אלה היו להם שלוש השערות המסבירות מדוע נמצאו שני מוקדים ולא מוקד אחד בלבד. מה לדעתכם היו השערותיהם?



**איור ש'-4.2: למי מהכתמים בתספיג ייקשר הגלאי המסומן?**

**שאלה 4.3**

החוקרים גנטי וגנטית הצליחו במשימתם לבודד אונקוגן חדש. הם בודדו את כל הגן שגודלו 30,000 זוגות בסיסים (30kb). הם רצו להמשיך ולחקור את תפקידיו בתא, אך לשם כך חשוב היה להם להשיג את ה-DNA המשלים הנגזר כגון זה. גנטית הציעה להכין ספרייה של DNA משלים ולהשתמש בגלאי.

1. מה יהיו השלבים בעבודתה של גנטית?
2. כמה לדעתכם תבחר כגלאי מתאים?

כששמע גנטי על תכנית העבודה של גנטית ובהתחשב בעובדה שמדובר בגן אדם, הציע לה לבחור בדרך שונה. גנטי ידע על כך שיש כבר אוספים גדולים של DNA משלים משובט שמקורו באדם, והציע לנסות ולבדוק אם כבר קיים באוספים אלה ה-DNA המשלים שנגזר מהגן המסרטן ששיבטו. כל שהתכוון לעשות הוא פשוט לרכוש אותו ולחסוך חודשים של עבודה קשה.

3. לאיזה מידע נזקק גנטי כדי לממש את גישתו?
4. איך ישיג מידע זה ואיך ישתמש בו למטרותיו?

**שאלה 4.4**

- א. במהלך היברידיזציה לאיתור גן משתמשים בעודף של גלאי מסומן שמרביתו כלל לא נצמד ל-DNA שעל הפילטר. התוכלו לשער מדוע יש צורך בעודף גלאי?
  - ב. אם ברצונכם לאתר בספרייה גן חדש (גן  $\gamma$ ) שהוא "קרוב משפחה" של גן שכבר שובט (גן  $\alpha$ ), ובידיעה שהגנים  $\alpha$  ו- $\gamma$  יהיו זהים רק ב-70% מהרצף שלהם – מה יהיה הגלאי לאיתור הגן  $\gamma$ ? קבעו מה יהיו תנאי ההיברידיזציה היחסיים במקרה מיוחד זה בהשוואה להיברידיזציה שבה יש זהות של 100% בין רצף המטרה לרצף הגלאי. התייחסו לארבעת המשתנים הבאים:
1. גודל הגלאי.

כאשר ישנו חלבון שאת הגן שלו רוצים לשבט, ללא רמז לרצף הגן, ניתן להשתמש בנוגדן כגלאי. לשם כך יש להשתמש בספרייה שמאפשרת ביטוי חלבונים. מאפשרים לנוגדן להיקשר לחלבון בכתם שמקורו במוקד המבטא את החלבון הרצוי. לאחר מכן מבודדים ממוקד זה את ה-DNA הרצוי.

2. ריכוז המלחים היחסי בזמן ההיברידיזציה.
3. הטמפרטורה היחסית בזמן ההיברידיזציה.
4. השטיפות לסילוק גלאי עודף בגמר ההיברידיזציה.

#### שאלה 4.5

החוקרים גנטי וגנטית התעניינו במין דבורה מסוים שחדר מאפריקה ושנמצא מזיק במיוחד לחקלאות דבורים מייצרות דבש. הם מצאו כי ישנו חלבון בדבורה האלימה שאינו קיים בדבורים אחרות. מכאן הסיקו שיתכן כי חלבון זה אחראי לתכונות האלימות והציבו להם למטרה לשבט את ה-DNA המשלים המקודד לחלבון זה. לשם כך התכוונו להפיק חלבון בכמות שתאפשר להם לקבוע את רצף חומצות האמינו של החלבון ו/או לייצר נוגדנים כנגד החלבון.

- א. על פי מידע זה הציעו לפחות אסטרטגיה אחת לשיבוט ה-DNA המשלים הרצוי. פרטו את עיקרי השלבים והשיטות הנחוצים למימוש אסטרטגיית השיבוט.
- ב. הציעו יישום חקלאי בעקבות הצלחת השיבוט של ה-DNA המקודד לחלבון שאחראי לתכונות האלימות של הדבורה האפריקנית.

#### שאלה 4.6

גידלתם צמח בר מסוים במשך שבועיים בתנאי יובש קשים. למרבה ההפתעה הצמח שרד. אתם מניחים שאם תבינו איך שרד הצמח, תוכלו בשיטות של הנדסה גנטית לשפר את עמידותו ליובש של זן עגבנייה שנודע בחשיבותו הכלכלית. בקיצור, קיוויתם להתעשר. ההשערה שלכם היא שהעמידות ליובש נזקפת לזכותם של גנים מסוימים המקנים עמידות ליובש. גנים אלה מקודדים לחלבונים שתפקודם בתא הוא אשר מקנה עמידות זו, אבל איזה גן או גנים אחראים לעמידות ליובש (מה הם הגנים הרלוונטיים)?

א. תארו כיצד יש לשבט ולאתר את הגן או הגנים המעורבים בהקניית עמידות ליובש (שמקורם בצמח הבר) וזאת כאשר נעזרים בספרייה. לצורך כך היעזרו רק במשפטים הקצרים הנחוצים מתוך אלה שלפניכם וסדרו אותם בסדר הנכון.

1. מאתרים ומבודדים את החלבונים שכמותם שונה בצמחים שגדלו ביובש בהשוואה לכמותם בצמחי ביקורת (חלבונים אלה הם "החלבונים הרלוונטיים").
2. מפיקים חלבונים מצמחי ביקורת.
3. מפיקים חלבונים מצמחים שגדלו בתנאי יובש.
4. מייצרים נוגדנים כנגד החלבונים הרלוונטיים.
5. מפיקים RNA מצמחים עמידים ליובש ומייצרים DNA משלים.
6. שולפים ממוקדי הספרייה את ה-DNA המשלים של הגנים הרלוונטיים.
7. משתמשים ב-DNA משלים ובנשאים כדי להכין ספרייה שמאפשרת ביטוי חלבונים.

8. מבצעים היברידיזציה עם נוגדן המשמש כגלאי במטרה לאתר את השבט שבו מתבטא החלבון הרלוונטי ושבבו מצוי גם ה-DNA המשלים הרלוונטי. חוזרים על תהליך זה עם נוגדנים רלוונטיים נוספים.

9. קובעים את רצפי ה-DNA המשלים המקודדים לחלבונים הרלוונטיים.

10. קובעים את רצפי החלבונים הרלוונטיים.

11. מזהים בעזרת רצף החלבון ובעזרת המחשב ומאגרי מידע את הגן המקודד לחלבון הרלוונטי. לשם כך מנצלים את יכולת התוכנות להמיר רצף DNA לרצף חלבון (פרק 5). חוזרים על תהליך זה לגבי כל רצף של חלבון שחשוד כמקנה עמידות ליובש.

12. מזמינים את הגנים הרלוונטיים מחברה האוצרת אוספי גנים.

ב. במקרה אחר הניחו כי לצורך השגת הגנים המקנים עמידות ליובש אין צורך להשתמש בספרייה. במקרה זה נעזרים באוסף קיים של כל הגנים של הצמח העמיד שמקורו בפרויקט גנום. סדרו רק את המשפטים הנחוצים בסדר הנכון כך שיתארו הליך מקוצר להשגת הגנים המקנים עמידות ליובש.

ג. לכשיושגו הגנים המקנים עמידות ליובש, מה לדעתכם יהיה כדאי לנסות לעשות אתם כדי להקנות לצמח עגבנייה שהוא רגיש ליובש עמידות יחסית בתנאי יובש?

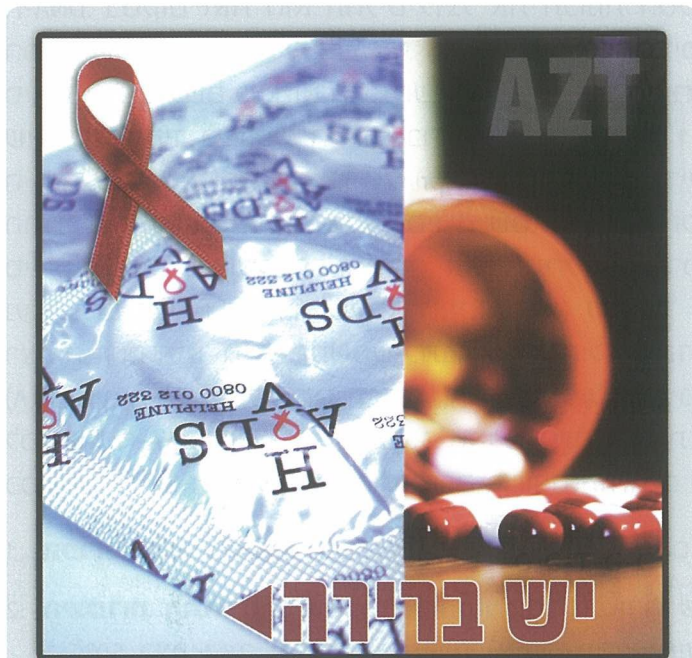


#### עיקרי הפרק

מושגים	כלים ב"ארגז הכלים"
<input type="checkbox"/> גן (Gene)	<input type="checkbox"/> תאים בתרבית
<input type="checkbox"/> שיבוט ואיתור DNA	<input type="checkbox"/> המתעתק במהופך (Reverse Transcriptase)
<input type="checkbox"/> שיבוט גן	<input type="checkbox"/> תחל (Primer)
<input type="checkbox"/> ספרייה (גנומית, DNA משלים)	<input type="checkbox"/> DNA משלים (cDNA)
<input type="checkbox"/> אונקוגן (לדוגמה Ras)	<input type="checkbox"/> ספריית DNA משלים
<input type="checkbox"/> מוטציה נקודתית	<input type="checkbox"/> ספריית DNA גנומי
	<input type="checkbox"/> תספיג (Blot)
<b>תהליכים, שיטות ותוצרים</b>	<input type="checkbox"/> בופר היברידיזציה
<input type="checkbox"/> הפקת DNA	<input type="checkbox"/> גלאי (Probe)
<input type="checkbox"/> הפקת RNA	
<input type="checkbox"/> תספיג (Blot)	<b>עקרונות</b>
<input type="checkbox"/> היברידיזציה (Hybridization)	<input type="checkbox"/> מאפייני תא סרטני
	<input type="checkbox"/> היברידיזציה בין גלאי למטרה



# קביעת רצף הנוקלאוטידים ב-DNA והשימוש במידע הנאגר



לאחר שיבוט גן או חלק ממנו מעוניינים לדעת אם הוא מקודד לחלבון. כמו כן מעוניינים לדעת אם הגן ששובט דומה לגן אחר, מהו תפקידו של הגן בתא ואם הוא מעורב במחלה כלשהי.

צעד ראשון במתן תשובות לשאלות אלה ואחרות הוא קביעת רצף הנוקלאוטידים של הגן ששובט. לכל גן, ובכלל זה גן המקודד לחלבון, יש רצף נוקלאוטידים ייחודי. רצף הנוקלאוטידים מאפשר לקבוע את רצף חומצות האמינו בחלבון. בנוסף, רצף הנוקלאוטידים של גן ששובט מפרט בריא מאפשר לפעמים לאתר מוטציות בגן אצל חולים.

פרק זה עוסק בין היתר בשיטה לקביעת רצף הנוקלאוטידים ב-DNA ובדרך שעל פיה ניתן להסיק מרצף זה את רצף החלבון. חשוב לציין כי יש צורך לקבוע גם רצף נוקלאוטידים של DNA שאינו מקודד לחלבון, לדוגמה רצף DNA המצוי באזורי בקרה בגן (פרק 7).

בסוף הפרק אפשר למצוא מידע באשר לחשיבות ההשוואה בין רצף הנוקלאוטידים של גן מסוים לרצף נוקלאוטידים של גנים אחרים. מידע המתקבל מהשוואת רצפים זו עשוי לסייע בשיוך תפקיד אפשרי לגן ולחלבון. פיתוח כלים לקביעת רצף ה-DNA וכן שכלול יכולות חישוביות לניצול המידע הנאגר אודות הרצפים השונים היו נחוצים, אך לא מספיקים, כדי לאפשר את "מהפכת ההנדסה הגנטית".

- כ-40 מיליון איש הם נשאי HIV, הנגיף שמחולל איידס.
  - רק כ-1.6 מיליון סהנשאים סקבלים טיפול כדוגמת ה-AZT, טיפול שלעולם לא ידביר לחלוטין את הוירוס בגופם. במקרה הטוב ידחה הטיפול את הקץ הבלתי נמנע.
  - כ-3 מיליון איש מתים מדי שנה מאיידס.
  - רק לכ-10% מאלה הנמצאים בסיכון לחלות באיידס יש גישה לקונדומים.
- אלה הנתונים העולמיים העגומים לשנת 2006. מה באשר לטיפול עתידי? רופאים ומדענים מנסים לפתח קרמים וגלולות עבור אנשים בריאים דווקא, אשר ימנעו את ההדבקה הראשונית על ידי וירוס ה-HIV. אבל גם הימצאותו של טיפול מונע עתידי לא יועיל בלא מודעות ואמצעי זהירות. קל להבין את מנגנון פעולתו של AZT אם מבינים את דרך קביעת רצף ה-DNA.

## שיטת סנגר לקביעת רצף נוקלאוטידים ב-DNA

המדען הכימאי פרדריק סנגר (Frederick Sanger) היה הראשון אשר הצליח לפתח שיטה לקביעת רצף של חומצות אמינו בחלבון. רצף חומצות האמינו הראשון שפענח סנגר היה של חלבון האינסולין. הוא עשה זאת בדרך של פירוק הדרגתי של החלבון. הישג מרשים זה זיכה את סנגר בפרס נובל. סנגר לא הסתפק בהישג זה, והוא יצא למשימה נוספת: פיתוח שיטה לפענוח רצף הנוקלאוטידים ב-DNA.

□ "קביעת רצף" של חלבון מאפשרת לדעת את סדר חומצות האמינו בחלבון. פרוש הדבר הוא לדעת מי היא החומצה האמינית הראשונה בחלבון ומי מבין 20 חומצות האמינו הקיימות בתא היא השנייה, מי השלישית וכך הלאה. כך גם לגבי DNA: קביעת רצף ה-DNA מאפשרת לדעת סדר הנוקלאוטידים. כלומר, את הרצף קובעים כדי לדעת מי מבין ארבעת הנוקלאוטידים המרכיבים את ה-DNA מצוי לאחר נוקלאוטיד מסוים ומי מהארבעה לאחר השני וכך הלאה.

(A) מוסיף ה-DNA פולימראז תימין (T) ולהיפך ומול כל ציטדין (C) מוסיף הפולימראז גואנין (G) ולהיפך. למעשה, ה-DNA פולימראז מאפשר הארכת תחל וסינתזת DNA. מה נחוץ לסינתזת DNA במבחנה? כמותאר באיור 5.1, השלבים והמרכיבים השונים הנחוצים לצורך **סינתזת DNA** במבחנה הם אלה:

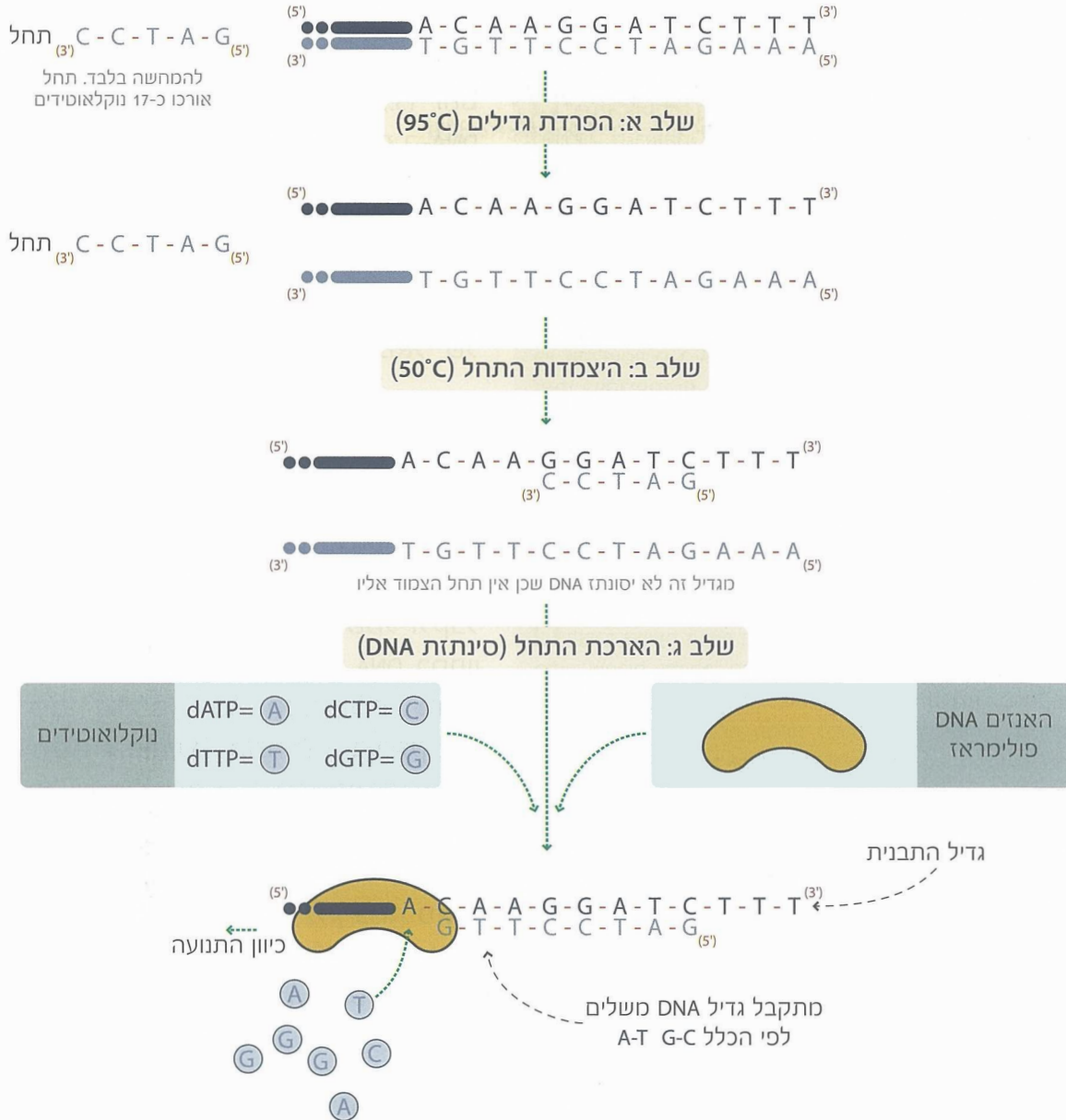
1. **הפרדת גדילי ה-DNA:** חימום DNA דו-גדילי (95°C) גורם להפרדת שני הגדילים.

2. **היצמדות התחל (primer annealing):** בטמפרטורה של כ-50°C רצף קצר של נוקלאוטידים (אוליגו-נוקלאוטיד), המכונה גם תחל, נצמד לאחד מגדילי ה-DNA, שיש לו רצף משלים לרצף התחל.

3. **הארכת התחל וסינתזת DNA:** לצורך כך נדרשים DNA, התחל הצמוד אליו, האנזים DNA פולימראז וכן ארבעת הנוקלאוטידים שהם אבני הבניין של ה-DNA. ארבעת הנוקלאוטידים הנחוצים לסינתזת DNA הם: **dATP (deoxy Adenosine triphosphate)** (דאוקסי-אדנוזין תלת-פוספאט) (A); **dTTP (T)**; **dCTP (C)**; **dGTP (G)**.

העיקרון של שיטת סנגר לקביעת רצף DNA הוא סינתזה מוגבלת של DNA. **סינתזה מוגבלת** פירושה סינתזה שנפסקת לאחר שהתווסף לתחל מספר קטן יחסית של נוקלאוטידים. הסינתזה המוגבלת מתאפשרת הודות לנוכחות של כמות קטנה של נוקלאוטידים מיוחדים שביכולתם להפסיק באקראי את תהליך הארכת התחל והסינתזה. סינתזה מוגבלת מאפשרת לקבל במקביל מקטעים של DNA חד-גדילי באורכים שונים, ואפיונם מאפשר לקבוע את הרצף.

המדען סנגר פיתח שיטה לקביעת רצף DNA העושה שימוש באנזים **DNA פולימראז**. אנזים זה מתפקד בסינתזה ושכפול DNA בתא ויכול לשמש לאותן מטרות גם במבחנה. **סינתזת DNA** במבחנה (איור 5.1) מצריכה DNA, **תחל (primer)**, נוקלאוטידים וכמובן את האנזים DNA פולימראז. האנזים מאריך את התחל ומסנתז DNA באמצעות הוספת נוקלאוטידים זה לזה על פי המידע בגדיל התבנית.



**איור 5.1: סינתזת DNA במבחנה על ידי האנזים DNA פולימראז - מרכיבים ושלבים.**

באיור זה מודגם כיצד ניתן לקיים סינתזת DNA במבחנה כשרק גדיל אחד משמש כתבנית, מכיוון שיש תחל הנצמד רק לאחד מגדילי ה-DNA (בזמן שכפול ה-DNA בתא ה-DNA מסונתז משני הגדילים). סינתזה של DNA במבחנה מצריכה DNA, אנזים ה-DNA פולימראז כמו גם תחל ונוקלאוטידים. בעת סינתזת DNA מוסיף האנזים DNA פולימראז נוקלאוטידים לתחל תוך כדי יצירת קשרים פוספודיאסטריים. הפולימראז סאריך את התחל על פי המידע בגדיל התבנית (מול A מתווסף T ולהיפך, ומול G מתווסף C ולהיפך).

שלושת השלבים לסינתזת DNA במבחנה מפורטים בעמוד הקודם ובאיור 5.1. כדי לקבוע רצף DNA על פי שיטת סנגר, מאפשרים סינתזת DNA מוגבלת. **סינתזה מוגבלת** פירושה סינתזה שנפסקת באקראי במקומות שונים בעותקי DNA שונים. סינתזה מוגבלת מאפשרת לקבל במקביל מקטעים של DNA באורכים שונים. אפיון המקטעים השונים שהם תוצרי הסינתזה המוגבלת, מאפשר לקבוע את רצף ה-DNA.

את רשימת המרכיבים הנחוצים ל**סינתזת DNA מוגבלת** אפשר למצוא באיור 5.2א'. חומרי המוצא כוללים הרבה עותקים של DNA שאת הרצף שלו רוצים לקבוע, הרבה עותקים של תחל, כמות גדולה של נוקלאוטידים רגילים מטיפוס הדאוקסי וכמות קטנה של "נוקלאוטידים מסיימים". **נוקלאוטידים**

**מסיימים** הם נוקלאוטידים מטיפוס די-דאוקסי (תיבה צדדית ואיור 5.3) והם גורמים לעצירה אקראית של סינתזת ה-DNA (בעותק DNA אחד במקום אחד ובעותק DNA אחר במקום אחר, ולכן מתקבלים מקטעי DNA באורכים שונים). ניתן לראות המחשה של תוצרי הסינתזה המוגבלת שמקורם ב-DNA ובתחל מסיימים בחלק השמאלי של איור 5.2א'.

כיצד מאפיינים את תוצרי הסינתזה המוגבלת וכיצד האפיון מאפשר לקבוע את רצף הנוקלאוטידים? אפשר להפריד את תוצרי הסינתזה המוגבלת בג'ל העשוי פולימר מסוג אקרילאמיד בעזרת שדה חשמלי ולקבל "סולם פסים" המייצג מולקולות DNA במגוון אורכים (גדלים). כל המולקולות תוצרי הסינתזה המוגבלת מתחילות בעותק של התחל. יש מולקולות שבהן מתווסף נוקלאוטיד אחד לתחל, מולקולות שבהן מתווספים שני נוקלאוטידים (שאחד מהם מסיים) וכך הלאה עד למולקולות שמתווספים להן כמה מאות בודדות של נוקלאוטידים. אם יודעים באיזה

**□ "הנוקלאוטידים המסיימים"** נקראים בשם המדעי נוקלאוטידים

מטיפוס די-דאוקסי (di-deoxy). ארבעת הנוקלאוטידים מטיפוס הדי-דאוקסי הם: ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP (כאשר dd מציין di-deoxy). נוקלאוטידים מטיפוס הדי-דאוקסי נבדלים מהנוקלאוטידים הרגילים מטיפוס הדאוקסי המשמשים בסנתזת DNA. לנוקלאוטידים הרגילים מטיפוס הדאוקסי שהם dATP, dTTP, dCTP, dGTP (כאשר d מציין deoxy) יש בעמדה 3 של הסוכר קבוצת הדרוקסיל (OH) (איור 5.3) המשמשת ליצירת קשר פוספו-דיאסטריל בין נוקלאוטידים ב-DNA מה שמאפשר הארכה וסינתזה. לעומת זאת, בנוקלאוטידים מסיימים מטיפוס די-דאוקסי יש בעמדה 3 של הסוכר אטום מימן (H) אשר אינו יכול ליצור קשר עם נוקלאוטיד נוסף. כאשר משובץ באקראי במהלך הסינתזה נוקלאוטיד מסיים מטיפוס די-דאוקסי בגדיל ה-DNA המתארך, נפסקת סינתזת ה-DNA ומקטע ה-DNA שמתקבל מכיל בקצהו אחד מארבעת הנוקלאוטידים המסיימים.

**□** לצורך קביעת הרצף בשיטת סנגר משתמשים בג'ל אקרילאמיד

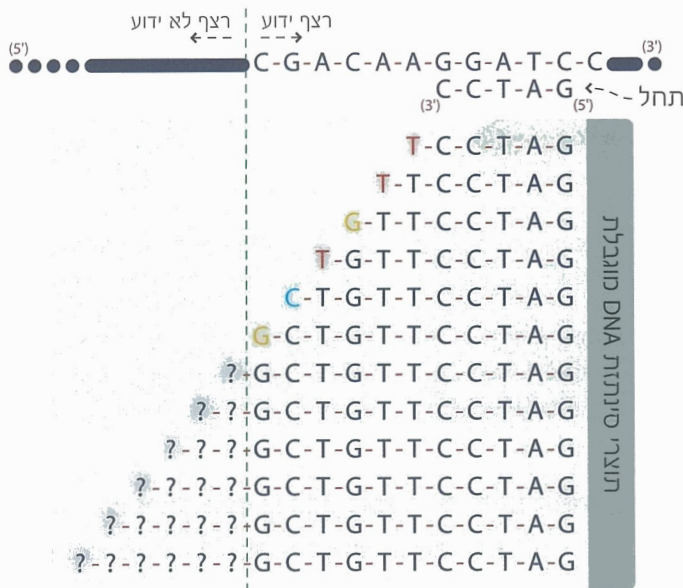
בתוך צינורית דקיקה הקרויה "קפילרה". בג'ל זה, כמו בכל ג'ל המיועד להפרדה על פי גודל, מולקולות קטנות נודדות למרחק גדול יחסית ומולקולות גדולות נודדות למרחק קטן יחסית בג'ל. בשונה מג'ל אגרוז, ג'ל אקרילאמיד מאפשר הפרדה של מקטעים שכנים הנבדלים ביניהם בנוקלאוטיד אחד. וכך, לגבי כל פס בג'ל המייצג מולקולת DNA באורך מסוים הרי שהפס שמעליו מייצג מולקולת DNA הארוכה בנוקלאוטיד אחד. לעומת זאת, הפס שמתחת מייצג מולקולה הקצרה בנוקלאוטיד אחד.

נוקלאוטיד מסתיים כל מקטע DNA בפס נתון (אם ב-ddA, ddT, או ddG), ניתן לדעת את רצף ה-DNA (היעזרו באיור 5.2ב').

איך מזהים מהו הנוקלאוטיד המסיים של כל מולקולת DNA בפס נתון? סנגר פיתח את שיטתו המקורית בעזרת חומרים רדיואקטיביים אך כיום משתמשים בנוקלאוטידי די-דאוקסי שחוברה להם מולקולת צבע זוהרת ייחודית. בהתאם לצבע הייחודי הקשור לכל נוקלאוטיד מסיים (ddG או ddA, ddC, ddT) תהיה מולקולת ה-DNA בפס נתון מסומנת בירוק, אדום, כחול או צהוב בהתאמה. כמודגם באיור 5.2ב', קרן לייזר המאירה לתוך הג'ל היא זו שמאפשרת זהירה של ה-DNA בפס מסוים בזמן שהוא חולף מול הקרן. הצבע נקלט על ידי גלאי אלקטרוני, והמחשב המחובר למערכת אוגר מידע על סדר המולקולות הזוהרות, סדר שניתן להסיק ממנו את סדר הנוקלאוטידים ב-DNA. כמודגם באיור 5.2ג', בשיטת סנגר קובעים בעצם את רצף הגדיל המשלים. נהוג להסיק מרצף זה את הרצף בגדיל המקורי.

באיור 5.2א' ניתן לראות את רשימת המרכיבים הנחוצים ל**סינתזת DNA מוגבלת** וקביעת רצף ה-DNA. סינתזה מוגבלת ולא מלאה מתאפשרת בשל הכללתם של "**נוקלאוטידים מסיימים**" מטיפוס **די-דאוקסי** (איור 5.3). מכיוון שמשתמשים בנוקלאוטידים מסיימים בעלי סימון צבע ייחודי, מתקבלים במבחנה מקטעים ייחודיים באורכים שונים אשר כל אחד מהם מסומן באחד מארבעה צבעים, כצבע הנוקלאוטיד המסיים.

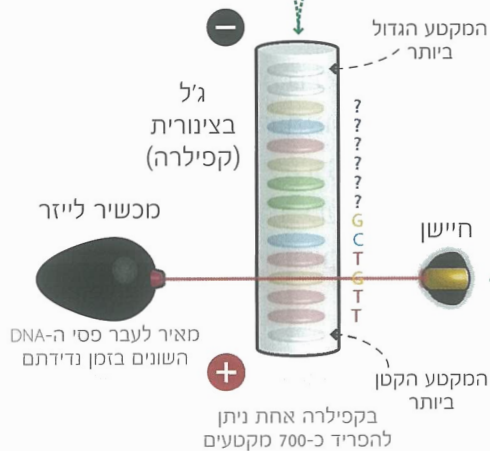
סינתזה מוגבלת לצורך קביעת רצף



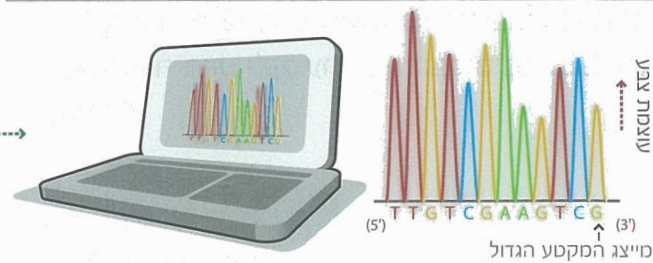
לתגובת הסינתזה המוגבלת של DNA כשתמישים ב:

- DNA (עותקים רבים)
- תחל (עותקים רבים)
- DNA פולימראז
- נוקלאוטידים "רגילים" מטיפוס דאוקסי (כמות רבה)
  - dTTP (T)
  - dGTP (G)
  - dATP (A)
  - dCTP (C)
- "נוקלאוטידים מסיימים" מטיפוס הדי-דאוקסי המסומנים בצבע זוהר (כמות מועטה)
  - ddTTP (T)
  - ddGTP (G)
  - ddATP (A)
  - ddCTP (C)

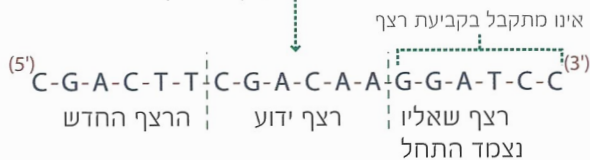
ב. מעבירים התוצרים לגל לצורך הפרדה



עיבוד נתונים בעזרת מחשב



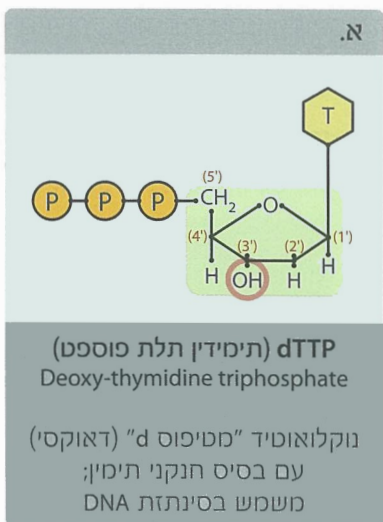
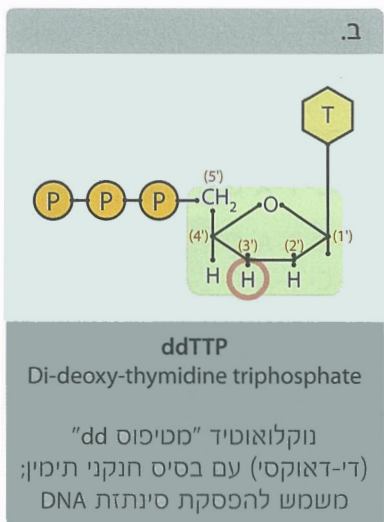
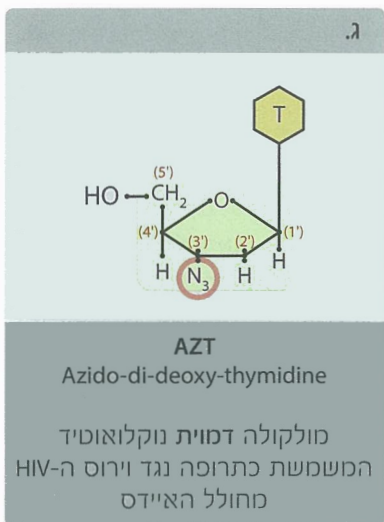
הסקת הרצף המשלים לזה שנקבע



**איור 5.2: קביעת רצף נוקלאוטידים ב-DNA בשיטת סנוגר במערך חצי-אוטומטי.**

- א. מרכיבים ותוצרים של התגובה האנזימטית שבה מאפשרים לייצר אוסף מקטעי DNA באורכים שונים (סינתזה מוגבלת) המסומנים בקצותיהם בצבע זוהר.
- ב. הפרדה בגל של המקטעים השונים תוצרי הסינתזה המוגבלת. מקטעים סמוכים נבדלים בנוקלאוטיד אחד. המערכת מזהה את הנוקלאוטיד המסיים כל מקטע על פי צבעו.
- ג. עיבוד נתונים במחשב והסקת הרצף.

מקטעי ה-DNA תוצרי הסינתזה המוגבלת מועברים לגל לצורך הפרדה (איור 5.2). מכיוון שמקטעי ה-DNA הם בגדלים שונים הם יוצרים בגל "סולם". קרן לייזר וחיישן אור מאפשרים לזהות את הנוקלאוטיד המסיים בכל מקטע ייחודי וזאת על פי צבע הנוקלאוטיד. על פי סדר הנוקלאוטידים המסיימים במקטעים השונים ניתן לקבוע את רצף ה-DNA (איור 5.2 ב' ו-ג').



**איור 5.3: מבנה כימי של נוקלואוטיד dTTP מטיפוס הדאוקסי, נוקלואוטיד ddTTP מטיפוס הדי-דאוקסי וכן התרכובת AZT שהיא דמוית נוקלואוטיד.**

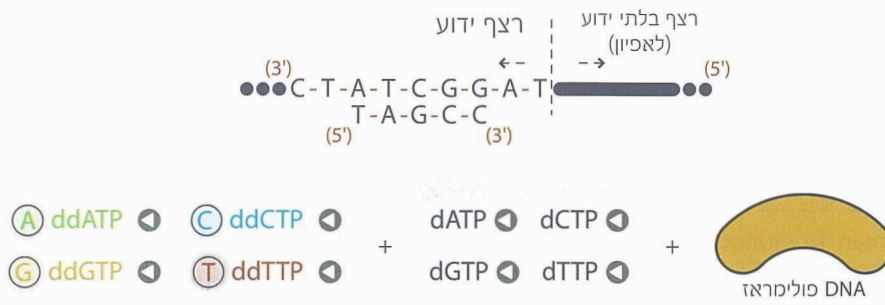
בשנת 1977 הצליח סנגר בקביעת רצף הנוקלאוטידים של בקטריופאג' (כ-5000 נוקלאוטידים). על פיתוח השיטה לקביעת רצף ה-DNA זכה סנגר בפרס נובל והיה לאחד המדענים הבולטים שזכו בשני פרסי נובל (הפרס הראשון ניתן לו, כאמור, עבור פיתוח השיטה לקביעת רצף הלבון). שיטת סנגר בראשית דרכה אפשרה לקבוע במעבדה טיפוסית רצף שאורכו כ-1000 נוקלאוטידים בשלושה ימים. לעומת זאת, לקראת סוף המאה ה-20 אפשרו האוטומציה של שיטת סנגר, מזעור מרכיבים והכנסה לשימוש של נוקלאוטידים זוהרים, כמו גם הלייזר ויכולות מחשוביות מפותחות, לקבוע רצף של 10 מיליון נוקלאוטידים ביום במרכזים מיוחדים שהוקמו במיוחד לשם כך. שכלול שיטת סנגר היה חיוני לקביעת רצף הבסיסים בגנום האדם (Human Genome) ורצף הגנום באורגניזמים רבים אחרים.

**שאלה 5.1:**

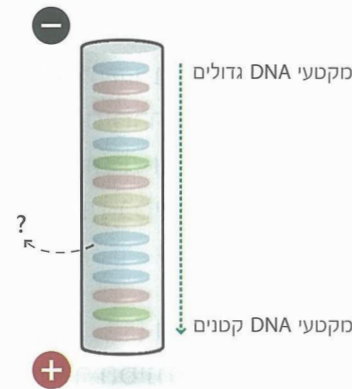
אתם מתכוונים לקבוע את רצף הנוקלאוטידים במקטע DNA מסוים על פי המערך הניסיוני שמתואר באיור **ש'-5.1**. מקצת הרצף ידוע וזה מאפשר לכם לייצר תחל מתאים. כמתואר באיור **ש'-5.1**, לאחר שהושלמה סינתזת DNA מוגבלת בנוכחות נוקלאוטידים מטיפוס די-דאוקסי המסומנים בצבע, הופרדו המקטעים המסומנים בגל.

- א. קבעו על פי המקטעים הצבעוניים מהו סדר הנוקלאוטידים המסיימים כל מקטע. לדוגמה, מהו הנוקלאוטיד המסיים במקטע המסומן בסימן שאלה?
- ב. על פי התוצאות של א' בשאלה זו, קבעו את הרצף ב-DNA שנועד לאפיון. רמז: רצף הנוקלאוטידים שאפיון שלו נדרש הוא הרצף המשלים לרצף שנקבע במערך הניסיוני. כדי להקל על משימתכם, התחילו בציון רצף הבסיסים המשלים לרצף התחל, וזאת מכיוון 3' לכיוון 5' וכתבו משמאל לימין.
- ג. כדי לתרגל צורת כתיבה מקובלת, כתבו את הרצף שקיבלתם משמאל לימין אבל הפעם מכיוון 5' לכיוון 3'.

א.



ב.



תוצאות ההפרדה בג'ל  
לאחר מתן אפשרות  
לסינתזת DNA מוגבלת

**איור 5.1: קביעת רצף בלתי ידוע על פי תוצאות ההפרדה של מקטעי DNA תוצרי סינתזה מוגבלת בג'ל.**

- א. המרכיבים הדרושים לקביעת רצף DNA בלתי ידוע.
- ב. תוצרי הסינתזה המוגבלת שמסתיימים באחד מארבעת הנוקלאוטידים הזוהרים מטיפוס הדי-דאוקסי ושעברו הפרדה בג'ל.

**שאלה 5.2:**

תלמיד המחקר של דר' גנטית, גנצ'יק, סיים את עבודת המחקר שלו ועבר לעבוד ביחידה לקביעת רצף DNA המשרתת מעבדות מחקר שונות. ביחידה זו כלים ומערכות המאפשרות לקבוע רצף של כ-700 נוקלאוטידים ב-DNA בעמודת ג'ל אחת. כלומר, מתקבל סולם פסים אחד של כ-700 מולקולות DNA, ובו מולקולה נתונה בסולם נבדלת מזו שמעליה ומזו שמתחתיה בנוקלאוטיד אחד.

א. ביומו הראשון לעבודה טעה גנצ'יק והוסיף לתגובת הסינתזה המוגבלת כמות נוקלאוטידים מטיפוס הדי-דאוקסי הגדולה פי 3 מהכמות הנדרשת. מה לדעתכם קרה בניסיון לקבוע את הרצף? האם הצליח גנצ'יק לקבל 700 מקטעים באורכים שונים?

ב. למרבה הצער, לאחר שהתגבר על התקלה ביום הראשון, השמיט בימושו השני לעבודה את הנוקלאוטיד ddCTP מתגובת הסינתזה המוגבלת. מה לדעתכם התברר לאחר ניתוח תוצאת הרצף? מה הייתה התוצאה לו היה משמיט את הנוקלאוטיד dATP?

### שאלה 5.3:

מחולל מחלת האיידס הוא הוירוס הנקרא HIV (Human Immunodeficiency Virus). וירוס זה משתייך לקבוצה של הרטרו-וירוסים שהחומר התורשתי שלהם הוא RNA. הוירוס מקודד בין השאר לאנזים המתעתק במהופך (פרק 4). אין אנזים כזה בתאי אדם בריאים. הוירוס לא יתרבה ללא אנזים זה או בהיעדר פעילות תקינה שלו. לפיכך שיבוש פעילותו של אנזים זה הוא מטרה חשובה לעוסקים בפיתוח תרופות כנגד ה-HIV. אנזים זה מסנתז מולקולת DNA ממולקולת RNA, ולצורך כך הוא משתמש בנוקלאוטידים שגם ה-DNA פולימראז משתמש בהם. פרמקולוגים העוסקים במדע פיתוח התרופות גילו כי מולקולה הקרויה AZT (איור 5.3) מומרת לתרכובת דמויית נוקלאוטיד כשהיא חוזרת לתא כתוצאה מהתווספות 3 קבוצות זרחה במקום ה-5' של הסוכר. בתאים נגועים בוירוס ה-HIV, המתעתק במהופך יעדיף - בעת שיעסוק בסינתזה של DNA מ-RNA - את ה-AZT דמוי הנוקלאוטיד dTTP.

א. ערכו השוואה בין dTTP, ddTTP ו-AZT (איור 5.3) והעריכו את ההשלכות הביוכימיות שיש לשיבושה של כל אחת ממולקולות אלו ב-DNA במהלך הסינתזה שלו.

ב. כיצד לדעתכם מושג הפוטנציאל הרפואי של השימוש ב-AZT, פיורשו של דבר, כיצד נפגע הוירוס מנוכחות ה-AZT? רמז: היעזרו במה שלמדתם על הרטרו-וירוסים בפרק 4.

ג. השימוש ב-AZT במינון הנכון אינו כרוך בתופעות לוואי חריגות. לפיכך, מה לדעתכם צריכה להיות עוצמת זיקתו של ה-DNA פולימראז התאי ל-AZT בהשוואה לזיקתו של המתעתק במהופך ל-AZT?

## מורצף DNA לרצף חלבון

□ שלושת המאפיינים של RNA שליה המקודד לחלבון הם: רצף Poly A בקצה 3' שלו שבו עשרות נוקלאוטידים מטיפוס A המצויים זה אחרי זה, רצף מקודד לחלבון במרכזו של ה-RNA שליה ורצפים שאינם מקודדים לחלבון משני צדי הרצף המקודד.

□ **ביואינפורמטיקה** היא מדע חשוב למהפכת ההנדסה הגנטית. העוסקים בביואינפורמטיקה של הגנום מפתחים תוכנות מחשב המאפשרות אפיון וניתוח רצפי DNA. התוכנות הביואינפורמטיות מאפשרות בין השאר להשוות בין רצפים ממקורות שונים.

לאחר שמשבטים מקטע DNA משלים, קובעים את רצף הנוקלאוטידים שבו. לעתים ניתן לזהות בקצה 3' שלו רצף שבו כמה עשרות נוקלאוטידים מטיפוס A כשהם מופיעים זה אחרי זה. זהו רצף Poly A, ובמקרה כזה קרוב לוודאי שה-DNA מייצג רצף המצוי בגן שממנו נוצר RNA שליה. המשימה הראשונית היא לאתר איזה מבין הנוקלאוטידים במקטע ה-DNA המשלים ששובט שייך לרצף המקודד לחלבון. בשלב הבא ניתן לשאול אם ה-DNA ששובט מקודד להתחלה ולסוף של חלבון. לצורך כך נדרשת עבודת **ביואינפורמטיקה** בסיסית באמצעות תוכנות מחשב. עבודה זו מאפשרת לקבוע את הרצף המקודד לחלבון. ראשית, על המחשב לזהות ברצף ה-DNA המשלים שלשות

קביעת רצף הנוקלאוטידים מאפשרת לעתים לזהות ב-DNA משלים רצף של עשרות נוקלאוטידים מטיפוס A (Poly A) המייצג קצה 3' של RNA שליה. זו עדות ראשונית לנוכחות מקטע DNA מקודד לחלבון. בשלב הבא מאתרים מי מהנוקלאוטידים שבמקטע הנחקר משתתף בקידוד לחלבון. לצורך כך נעזרים במדע הביואינפורמטיקה של הגנום המאפשר אפיון וניתוח מידע אודות רצפי נוקלאוטידים ב-DNA.



בסיסים העשויות להיות הקודונים. כל **קודון** (המורכב משלשת בסיסים אחת), כשהוא מצוי ב-RNA שליה, יכול לאפשר הארכת החלבון בחומצה אמינית אחת או להביא לסיום התרגום (תלוי בסוג הקודון). המחשב מסווג את הקודונים הפוטנציאליים לכאלה המקודדים לחומצות אמינו ספציפיות ולכאלה המכתיבים הפסקת תרגום (קודוני סיום). כדי לקבוע מהו הרצף המקודד לחלבון, צריך לאתר

רצף ארוך ככל האפשר, שאין בו אחד מקודוני הסיום. אם נמצא, לדוגמה, רצף של כ-500 נוקלאוטידים שאין בו אף קודון סיום, הרי שניתן לומר ברמה גבוהה של וודאות כי אותו רצף המקודד לחלבון. הרצף של הנוקלאוטידים המקודד לחלבון נקרא גם רצף של **"מסגרת קריאה פתוחה"** (Open reading frame), שכן ניתן למצוא ברצף זה קודונים לחומצות אמינו שהריבזום "קורא" אותם ומסנתז חלבון ללא הפרעה ("פתוח") עד קודון הסיום.

□ מכיוון שבטבע 64 קודונים ומתוכם 3 הם קודוני סיום, הרי שברצף שאינו מקודד לחלבון יש הסתברות למצוא קודון סיום בערך אחת לכל 20 קודונים (20 קודונים הם 60 נוקלאוטידים).

איור 5.4 מדגים כי בכל רצף נתון יש 3 מסגרות קריאה אפשריות וכי ברצף מקודד לחלבון על-פי רוב, רק אחת מהן פתוחה ומתפקדת בקידוד לחלבון. מסגרות הקריאה האחרות הן "מסגרות קריאה סגורות". **"מסגרת קריאה סגורה"** היא מסגרת קריאה שבה יש קודון סיום תרגום אחת ל-60 נוקלאוטידים בממוצע, ולכן אין היא מאפשרת תרגום חלבון משמעותי. אם רצף DNA מסוים אינו מקודד לחלבון בכלל, אפשר יהיה לזהות בו בקלות שלוש מסגרות קריאה סגורות.

לסיום, איך אפשר לדעת אם שיבטנו DNA המקודד לחלבון מתחילתו ועד סופו? אם נמצאה מסגרת קריאה פתוחה משמעותית (לדוגמה, רצף של מאתיים קודונים לחומצות אמינו שהם 600 נוקלאוטידים) המסתיימת בקודון סיום בקצה 3' שלה, ואילו בקצה השני של מסגרת הקריאה הפתוחה (קצה 5') נמצא גם כן קודון סיום, הרי שניתן לקבוע בוודאות שהרצף הקיים מקודד לחלבון שלם. עם זאת, ככל שהדברים נוגעים למסגרת קריאה פתוחה, צריך עוד לקבוע באיזו חומצה אמינית בדיוק מתחיל החלבון. ככלל, קודון ההתחלה הוא כמעט תמיד AUG, וקודון זה מקודד לחומצה האמינית מתיונין (Met או M). עם זאת, לא כל קודון מתיונין הוא קודון התחלה, שכן ניתן למצוא מתיונין גם באזורים אחרים בחלבון. רק קודון המתיונין שהוא חלק ממסגרת קריאה פתוחה ושהוא הקרוב ביותר לקודון סיום שבקצה 5', יהיה ברוב המקרים גם הקודון המקודד לחומצה האמינית הראשונה בחלבון. בדוגמה שבאיור 5.4, הקודון הראשון המקודד לחומצה האמינית הראשונה מסומן בקו אדום.

□ קודון סיום שבקצה 5' של מסגרת קריאה פתוחה אינו מתפקד בסיום תרגום והוא בעל חשיבות רק בקביעת גבולה של מסגרת הקריאה הפתוחה. קודון זה מצוין שאין מידע רלוונטי מעבר לו (לכיוון 5) הדרוש לקידוד החלבון.

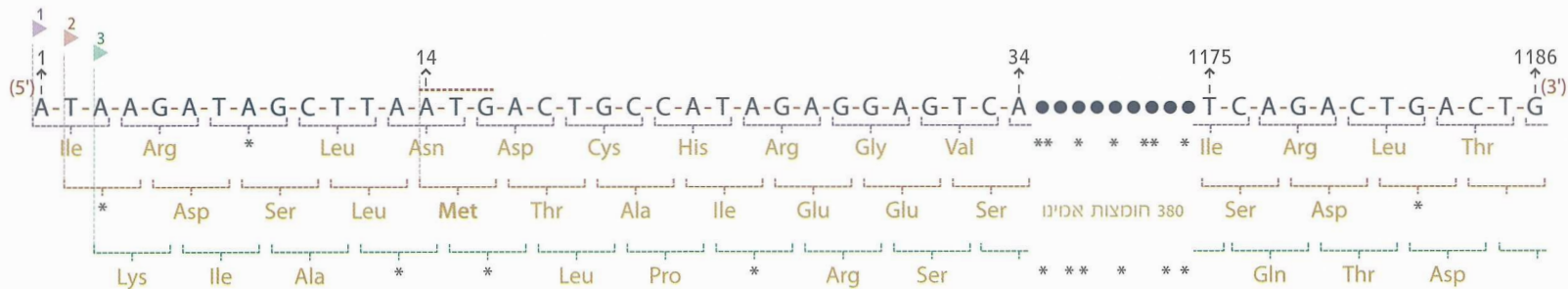
## שאלה 5.4

לפניכם רצף בסיסים קצר המייצג קטע ממולקולת RNA מסוימת המקודדת לחלבון.

●●●● U-A-U-G-A-U-G-A-U-U-A-A-A-A-U-G-U-G-U-C-C-A-A-U-G-A ●●●●

1. אתרו ברצף זה את שלוש מסגרות הקריאה השונות. בכל מסגרת קריאה השתמשו בקוד הגנטי שבכריכת הספר כדי לפרט את רצף החלבון שאותו היא עשויה לקודד.

לצורך איתור תת-מקטע של ה-DNA הנחקר שבו נעשו להימצא רצף מקודד לחלבון, מבקשים מהמחשב לאתר קודונים של חומצות אמינו וקודוני סיום תרגום (בקודון יש שלושה בסיסים). רצף DNA משמעותי שאין בו קודוני סיום תרגום הוא רצף של **"מסגרת קריאה פתוחה"** והוא מקודד לחלבון. מסגרת קריאה פתוחה מקודדת לחלבון השלם אם בקצה 3' שלה ובקצה 5' שלה מצויים קודוני סיום תרגום.



- קודון אפשרי במסגרת קריאה 1 (סגורה)
- קודון אפשרי במסגרת קריאה 2 (פתוחה)
- קודון אפשרי במסגרת קריאה 3 (סגורה)

G-A-C → קודון  
 Asp → חומצה אמינית

1175 1 - מספר הנוקלאוטיד ברצף הנתון  
 Asp, Ser, Met... - קיצורי שמות של חומצות אמינו  
 \* - קודון סיום תרגום

### איור 5.4: אפיון מסגרות קריאה ברצף DNA נתון במטרה לקבוע אם הרצף הנתון מקודד לחלבון ולקבוע את נקודת ההתחלה והסיום שלו.

המחשב משייך את הנוקלאוטידים ברצף ל-3 מסגרות קריאה אפשריות. המחשב מאתר בכל אחת מסגרות הקריאה את הקודונים האפשריים של חומצות אמינו ובמקביל את קודוני סיום תרגום. במסגרת קריאה 2 ניתן למצוא רצף משמעותי של כמעט 400 קודוני חומצות אמינו ללא קודון סיום תרגום, ולכן זוהי מסגרת הקריאה הפתוחה המקודדת לחלבון הרלוונטי. הימצאות קודון מתיונין בסמוך לקודון סיום תרגום בקצה 5' של מסגרת קריאה 2 מאפשרת לקבוע כי קידוד החלבון הרלוונטי מתחיל בנוקלאוטיד 14 (בחומצה האמינית מתיונין). לאחר שנקבעה מהי החומצה האמינית הראשונה, אפשר לקבוע כי מקטע ה-DNA שבאיור מקודד לחלבון של 389 חומצות אמינו. (באיור מתוארות 8 חומצות האמינו בתחילת החלבון, ואילו 380 חומצות האמינו שאחריהן אינן מתוארות בגלל מחסור במקום. לבסוף מתוארות 2 החומצות האמינו האחרונות בחלבון.) מסגרות קריאה 1 ו-3 הן מסגרות, קריאה סגורות שכן אין בהן רצף משמעותי של קודונים שנעדרים ממנו קודוני סיום.

באיור 5.4 מתואר רצף DNA מקודד לחלבון שבו מסגרות קריאה פתוחה (מסגרת קריאה 2) ושתי "מסגרות קריאה סגורות". ב"מסגרות קריאה סגורות" יש קודון סיום תרגום אחת ל-60 נוקלאוטידים בממוצע, ולכן המסגרות הסגורות אינן מקודדות לחלבון. קצה חלבון שזה עתה נוצר מתאפייין במתיונין. אפשר לקבוע מיהו הקודון למתיונין הראשון בחלבון. אם נמצא כי הקודון האמור מצוי בקרבה לקודון סיום תרגום בקצה 5' של הרצף.

2. ציינו איזה מבין שלושת רצפי החלבון שעל פי כל אחת משלוש מסגרות הקריאה, עשוי לייצג מסגרת קריאה פתוחה גם אם אין הכרח שכך הדבר. נמקו.
3. לאיזה מידע נוסף אתם זקוקים כדי לקבוע איזו מבין שלוש מסגרות הקריאה מקודדת בפועל לחלבון?

### שאלה 5.5:

במכון המחקר "גנטוכון" עסקה החוקרת הנדסית בחקר שיח בעל פרות גדולים. כשביקרה בשדה איתרה שני שיחים במקומות שונים, שהפרות שבהם, שלא כמו ביתר השיחים, היו קטנים. היא ידעה כי שובטו מספר גנים האחראים ליצירת פרות וכי רצף ה-DNA שלהם נקבע. לגבי השיחים עם הפרות הקטנים, היא שיערה שהם מכילים מוטציה באחד מהגנים האחראים ליצירת הפרי. היא החליטה לשוב ולשבט את הגנים האחראיים ליצירת פרי, אבל הפעם לשבטם מהצמחים בעלי הפרות הקטנים. מטרתה הייתה לקבוע את רצפי הגנים האחראיים ליצירת פרי בכל אחד מהצמחים בעלי הפרי הקטן ולהשוותם לרצפי הגנים האחראיים ליצירת פרי בצמח נורמלי. כך קיוותה לאתר את הגן או הגנים הפגומים ולאפיין את השינוי ברצף (המוטציה) שאחראי למופע של פרי קטן. במחקר התגלה כי בשני הצמחים בעלי הפרי הקטן נמצאה מוטציה באותו הגן, אך בצמחים השונים הייתה מוטציה שונה.

הניחו כי רצף הגן האמור מתואר באיור 5.4. זהו גן שבצורתו התקינה מקודד לחלבון בן 389 חומצות אמינו (באיור ניתן לראות רצף של 7 חומצות אמינו המתחיל במתיונין שלאחריו רצף של 380 חומצות אמינו, שמפאת חוסר מקום אינו מתואר, ולבסוף מתוארות שתי חומצות אמינו; סה"כ 389). בצמח אחד נמצא שהמוטציה בגן הביאה להחסרת הנוקלאוטיד שמספרו 20 ואילו בצמח האחר הביאה המוטציה האחרת להתווספותו של נוקלאוטיד C לאחר נוקלאוטיד מספר 25.

הביאו בחשבון כי הריבוזום יתחיל בתרגום בקודון ATG שממוקם מבסיס שמספרו 14 ושמהווה חלק ממסגרת קריאה 2. ענו על השאלות האלה:

- א. לאיזו ממסגרות הקריאה המתוארות באיור 5.4 "יעבור" הריבוזום כתוצאה מהמוטציות השונות שבכל אחד מהצמחים?
- ב. מה תהיה השפעת המוטציות השונות על רצף החלבון? ציינו בכל מקרה את רצף החלבון שמתקבל כשאתם מתחילים בציון החומצה האמינית הראשונה שלו. לצורך כך היעזרו בטבלת הקוד הגנטי המופיעה בחלק הפנימי של הכריכה האחורית. שימו לב, תוכלו לקבוע רצף זה רק עד לאזור שבו הושמט הרצף בשל חוסר מקום.
- ג. מה יהיה גודלו של החלבון המוטנטי בצמחים השונים: קטן מהרצף התקין, גדול מהרצף התקין או כרצף החלבון התקין? נמקו.
- ד. הסבירו לפי מיטב הבנתכם כיצד ייתכן שהמוטציות השונות, האחת של תוספת נוקלאוטיד והשנייה של חסר בנוקלאוטיד, יכולות לגרום בדיוק לאותו מופע, למופע הפרי הקטן?

## השוואה ממוחשבת בין רצפים והסקת מסקנות

כשיודעים את רצף ה-DNA מקובל להשתמש בתוכנות מחשב גם כדי לאתר אתרי הגבלה ברצף ה-DNA, וניתן כך לקבל מפות הגבלה בלי שימוש באנזימי הגבלה.

לאחר שמקטע ה-DNA שובט בהצלחה, ורצף הבסיסים שבו נקבע, עולה השאלה: מה היא הרלוונטיות של הרצף? למי הוא זהה או דומה, אם בכלל? כדי לאפיין את רצפי הבסיסים של גנים, משתמשים בתוכנות מחשב. תוכנות המחשב מאתרות מסגרת קריאה פתוחה, אם ישנה, ומאפשרות לנו לקבוע אם

בידינו רצף הנגזר מן המקודד לחלבון. כמו כן עלינו לדעת לאיזו קבוצת גנים משתייך הגן, כלומר, לאילו גנים הוא דומה? לשם כך, מיד עם קביעת הרצף של מקטע מסוים, נהוג להשוות את הרצף שהתקבל לכלל רצפי ה-DNA הקיימים במאגרי מידע ממוחשבים עולמיים. לשם כך מסתייעים בתוכנות מחשב שנועדו לגלות דמיון בין רצפי בסיסים ובין רצפי חומצות אמינו. "עם קצת מזל" רצף הבסיסים של הגן הנחקר דומה לרצף של גנים בעלי תפקיד ידוע. במקרה כזה ניתן לשער שאחד מתפקידיו של הגן הנחקר דומה לתפקיד מסוים של גן ידוע. תיאור המקרה הבא הוא דוגמה מפורסמת המעידה על כך שהשוואה של רצף גן מסוים לרצפים אחרים עשויה לסייע בשיוך תפקיד ראשוני לגן.

בתחילת שנות ה-80 של המאה ה-20 ניסו חוקרים להבין כיצד וירוסים מסוימים מטיפוס הרטרו-וירוסים גורמים לסרטן בבעלי-חיים. הרטרו-וירוסים נושאים RNA כחומר תורשתי, והוא מומר בתא בעל-חיים ל-DNA. DNA זה עובר שיבוץ בגנום התא. החלק ב-DNA הוויראלי האחראי להתמרה הסרטנית נקרא אונקוגן. כאשר נחקר סרטן מסוים,

כאמור בפרק 4, מקור השם אונקוגן הוא: אונקו-מיונית, מסה, צבר; והפירוש- גן שתוצרו החלבוני מעורב ביצירת מסה של תאים סרטניים. האונקוגן הרטרו-ויראלי מיוצג בגנום ה-RNA של הוירוס, אך מקורו למעשה ב-RNA מהתא שנארז בגרסה משובשת לתוך קופסית הוירוס ו"אומץ" על ידו. רטרו-וירוס עם RNA שהוכף ל-DNA אונקוגני גורם להתמרת תא נורמלי (הפיכתו לסרטני). רטרו-וירוסים מסרטנים שונים נושאים אונקוגנים שונים.

אנו נמצאים כיום בעידן "הפוסט-גנומי" שבו ידוע הרצף של כלל הגנים באורגניזמים שונים. לפיכך השוואה בין רצף נתון לכלל הרצפים במאגרי המידע יכולה לספק מידע חשוב לחוקרים. אבל בראשית עידן השיבוט היה קושי להסיק מסקנות באמצעות השוואת רצפים, משום שבמאגרי המידע נמצא מידע מועט על רצפי גנים.

חלבון ה-PDGF נמצא בריכוז גבוה בטסיות דם, ובין יתר המקרים הוא משתחרר מהטסיות לזרם הדם לאחר פציעה. לאחר שהשתחרר מהטסיות, מתפקד ה-PDGF כגורם המכתיב חלוקת תאים החשובה בהגדלת פצעים.

בקופים הנגרם על ידי רטרו-וירוס מסוים, נקבע רצף הבסיסים של האונקוגן הספציפי שאותו נושא הרטרו-וירוס, והוא זכה לשם sis. קובעי רצף האונקוגן הפקידו את הרצף במאגר רצפים ממוחשב. בעזרת המחשב הם איתרו מסגרת קריאה פתוחה המקודדת לחלבון, אבל לא הצליחו למצוא במאגר הרצפים רצף אחר בעל דמיון לרצף האונקוגן שלהם. בשל כך לא הצליחו החוקרים לנבא באופן מידי את תפקידו בתא של החלבון הנוצר מהאונקוגן.

בערך באותה תקופה עסקו מדענים אחרים בחקר גורם החלוקה והגדילה החלבוני הנקרא PDGF (Platelet-derived Growth Factor) והידוע בפעילות ביולוגית אופיינית. חוקרי חלבון זה שמו להם למטרה לשבט את הגן המקודד ל-PDGF. לרשות החוקרים עמד חלבון PDGF שהצליחו לנקות ולקבוע את רצף

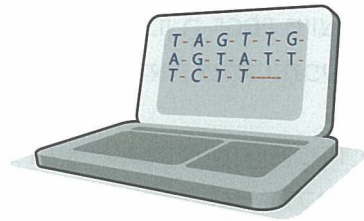
חומצות האמינו שלו. כמודגם באיור 5.5, המידע על רצף חומצות האמינו אֶפְשָׁר לשבט את הגן המקודד ל-PDGF בשיטות שתוארו בפרק 4. רצף הבסיסים שלו נקבע, וחוקרים אלה אף הם הפקידו את הרצף

משנמצא דמיון בין חלבון חדש ללא תפקיד ידוע לבין חלבון בעל תפקידים ידועים, ניתן לשער מה עשויים להיות מקצת תפקידיו של החלבון החדש. באיור 5.5 ניתן לראות את המערך הניסיוני שאֶפְשָׁר לגלות על פי השוואת רצפים ש-PDGF-1 הם חלבונים דומים.

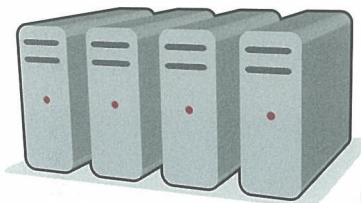
א. קביעת רצף החלבון



קביעת הרצף של sis והפקדתו במחשב



הפקדת הרצף במאגר נתונים ממוחשב



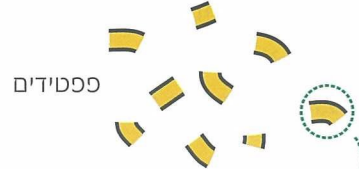
מאגר רצפי DNA עולמי שבו גם מידע על מקורם של הרצפים

תוצאת ההשוואה

חלבון PDGF



חיתוך



קביעת רצף חלבון מידע

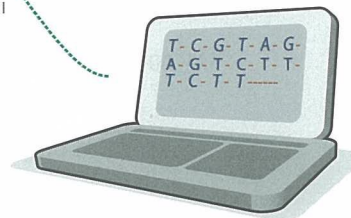
ב. שיבוט וקביעת רצף הגן

ספרייה

שיבוט

קביעת רצף הגן המקודד ל-PDGF

הפקדת הרצף במחשב



ג. השוואת רצפים במחשב

המרת רצף DNA לרצף חלבון ואיתור חלבון בעל רצף דומה המצוי במאגר רצפים

רצף חלבון ה-sis	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Ser	Val	Ala	Glu	Pro	Ala	●●●
רצף חלבון ה-PDGF	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Thr	Ile	Ala	Glu	Pro	Ala	●●●
	אזור זהות					אזור שונות בין החלבונים		אזור זהות				

איור 5.5: השוואת רצפים של חלבונים שונים מאפשרת לגלות חלבונים בעלי דמיון.

משנבקע רצף DNA ורצף חלבון חדש ניתן להשוותו לרצפי DNA ולרצפי חלבונים המצויים במאגרי המידע באמצעות תוכנות מחשב המשמשות להשוואת רצפים. לאחר שיבוט ה-PDGF, ניתן היה לגלות באמצעות השוואת רצפים את הדמיון הרב בין גן/חלבון ה-PDGF ולבין גן/חלבון ה-sis.

בעוד של-PDGF היו תפקודים ידועים רבים, ל-sis היה רק תפקוד אחד ידוע (אונקוגן). לכן, לאחר השוואת הרצפים ולאחר שנקבע כי sis ו-PDGF דומים ברצף, ניתן היה להסיק מה עשויים להיות מקצת תפקידיהם התאיים והמולקולריים של sis ולחזות כי PDGF עלול להשתתף כאונקוגן בהתמרה סרטנית.

של PDGF במאגר רצפי בסיסים ממוחשב. בשלב הבא נערך חיפוש במאגר שנועד למצוא רצפים בעלי דמיון לרצף ה-PDGF. תוצאת החיפוש הראתה שיש דמיון ניכר בין הרצף החלבוני של ה-PDGF לרצף החלבוני של תוצר האונקוגן *sis* (כמתואר באיור 5.5). השוואת רצפים זו אפשרה לשער כי *sis* הוא גורם חלוקה דמוי PDGF וכי תפקידו הראשוני של החלבון *sis* הוא להאיץ חלוקת תאים. למעשה ניתן היה ללמוד על מנגנון מעורבותו של *sis* הוויראלי בהתמרה הסרטנית. וכך ניתן היה להסיק כי לאחר שיבוץ האונקוגן *sis* ב-DNA של התא, מכתוב DNA זה את ייצור חלבון ה-*sis* שהוא גורם חלוקה דמוי PDGF. התא שנחשף לגורם חלוקה זה עובר חלוקות בקצב מוגבר האופייניות לתהליך הסרטני.

מנגד, השוואת רצפים זו אפשרה לחוקרי ה-PDGF להעריך את מלוא חשיבותו הביולוגית. כך הועלתה השערה כי אם חלבון ה-PDGF מיוצר ייצור-יתר (בדומה ל-*sis* המיוצר ייצור-יתר) הוא עלול להיות מעורב בתהליך הסרטני וזאת שלא כתפקידו הנורמליים לאחר פציעה. השערה זו התבררה כנכונה.

לסיום, חשוב להבין כי שיוך תפקיד לחלבון מצריך יותר מאשר השוואת רצפים: דרוש מחקר מולקולרי וביוכימי על מנת לאתר את תפקידו הייחודיים הנוספים של החלבון, ועל כך נדון בפרק 8.

✓✓

**עיקרי הפרק**

<p style="text-align: center;"><b>מרכיבים ביולוגיים</b></p> <p>רטרו-וירוס <input type="checkbox"/></p> <p>אונקוגן (Oncogene) <input type="checkbox"/></p> <p>וירוס ה-HIV <input type="checkbox"/></p> <p>PDGF <input type="checkbox"/></p> <p><i>sis</i> <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: center;"><b>יישומים</b></p> <p>קביעת הרצף המקודד לחלבון <input type="checkbox"/></p> <p>מציאת תפקודו של גן/חלבון על סמך השוואת רצפים <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: center;"><b>חומרים</b></p> <p>נוקלאוטידים "רגילים" <input type="checkbox"/></p> <p>נוקלאוטידים מטיפוס די-דאוקסי מסומנים ("נוקלאוטידים מסיימים") <input type="checkbox"/></p> <p>AZT <input type="checkbox"/></p>	<p style="text-align: center;"><b>כלים ב"ארגז הכלים"</b></p> <p>DNA פולימראז <input type="checkbox"/></p> <p>תחל (Primer) <input type="checkbox"/></p> <p>תוכנות מחשב <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: center;"><b>עקרונות ושיטות</b></p> <p>סינתזת DNA (DNA synthesis) <input type="checkbox"/></p> <p>סינתזת DNA מוגבלת <input type="checkbox"/></p> <p>קביעת רצף ה-DNA <input type="checkbox"/></p> <p>השוואת רצפים (רצף DNA לרצף DNA ורצף חלבון לרצף חלבון) <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: center;"><b>מונחים</b></p> <p>קודון מקודד לחומצה אמינית (Codon) <input type="checkbox"/></p> <p>קודון סיום תרגום (Stop codon) <input type="checkbox"/></p> <p>מסגרת קריאה פתוחה <input type="checkbox"/></p> <p>מסגרת קריאה סגורה <input type="checkbox"/></p> <p>ביואינפורמטיקה <input type="checkbox"/></p>
--	--

# תגובת השרשרת של הפולימראז (PCR)



PCR שינה תחומים חשובים בחיינו שינוי מהותי. האבחון הגנטי והרפואי שאנו נזקקים לו לעתים, והזיהוי הפלילי שתופך בקיומה של חברת חוק, מבוססים בין היתר על שימוש מושכל ב-PCR. השימוש השוטף ב-PCR במדע ממשיך להאיץ תחומי מחקר כגון חלוקת גנום ונעוד להגדיל את כמות המוצרים הרקומבינטיים בחקלאות וברפואה.

"המצאה יוצאת דופן במקורותיה", שיטה מהפכנית שמאיצה את התקדמות הביולוגיה המולקולרית, "טכנולוגיה שסוללת את הדרך למדע, רפואה ואפילו חוק ומשפט יעילים וטובים יותר", אלה הם רק חלק מההתייחסויות של מדענים ופרשנים לפריצת הדרך הטכנולוגית שאותה הגה ויזם אדם אחד בלבד, המדען האמריקני קרי מוליס (Kary Mullis).

קרי עבד בחברה ביוטכנולוגית בייצור של אוליגו-נוקלאוטידים המשמשים בין היתר כתחלים (פרקים 1, 5). במסגרת עבודתו התכוון לנצל אוליגו-נוקלאוטידים לצורך איתור מוטציות ב-DNA אגב התבססות על עקרונות ואמצעים שפיתח סגור לצורך

קביעת רצף נוקלאוטידים. בלא קשר לכוונתו זו, וכמעט שלא במודע, מצא עצמו מפתח שיטה מהפכנית שאותה כינה "PCR" (Polymerase Chain Reaction). שיטה זו מאפשרת שכפול מחזורי של DNA במבחנה לקבלת מקטעי DNA מוגדרים בכמות גדולה. השיטה משמשת למעשה לשיבוט מקטעי DNA רצויים ללא צורך בספריות ובחיידקים, וזאת בשעות ספורות במקום בחודשים ארוכים. תודות לכך ותודות לרגישות השיטה, השימוש בשיטתו של מוליס הוא נרחב ביותר גם כיום, כ-30 שנה לאחר הפיתוח המקורי.

מהי שיטת ה-PCR ומה הם עקרונותיה? באילו תחומים נמצאו יישומים לשיטת ה-PCR? אילו תכונות נדרשו לקרי כאדם וכמדען לפיתוח ההמצאה?

(-): גנצ'יק יצא לטיול ובדרך פגש רועה צאן שבכה מכיוון שמתים לו כבשים מסיבה לא ברורה, והוא פוחד שבקרוב לא יישארו לו כבשים כלל.

שמע, אמר לו גנצ'יק, אני ביולוג ואני יכול לעזור לך לגלות למה הכבשים מתים ואחר כך אולי גם לרפא אותם. לרועה לא היה מה להפסיד והוא אמר: יאללה, נלך על זה...

גנצ'יק לקח דגימות דם מכל הכבשים בעדר, העביר אותן למכון המחקר גנטוכון ושם בעזרת אחד החוקרים ביצע PCR שנועד לאפשר לזהות במדויק את גורם המחלה. הפעולה הצליחה מעל למצופה, והוא חזר אל הרועה והעדר עם התרופה המתאימה.

הרועה היה מאושר שהעדר שלו ניצל והרגיש שהוא חייב לגנצ'יק הרבה. הוא הציע לו לקחת כמה כבשים שרק ירצה.

גנצ'יק חייך והחליט שישתפק בכבש אחד.

בחר איזה שתדעה, מצדי את הכי גדול, אמר לו הרועה.

טוב, אמר גנצ'יק, אבחר את זה...

וואלה, אמר הרועה, אתה לא סתם ביולוג, אתה ביולוג מולקולרי...

איך ידעת? אמר גנצ'יק שהיה מופתע מאוד...

מה זאת אומרת "איך"? אמר הרועה, יש לי 252 כבשים בעדר, ואתה בחרת דווקא את הכלב...

## הדרך לפריצת דרך טכנולוגית: הצצה נדירה למוחו של הממציא

השנה היא 1983. עבודתו של קרי כאחראי על הייצור של אוליגו-נוקלאוטידים בחברה ביוטכנולוגית לא דרשה ממנו מאמץ מיוחד. עמד לרשותו זמן פנוי בשפע, והוא החליט לנצל כדי לנסות ולמצוא יישומים חדשים לאוליגו-נוקלאוטידים.

לקרי היה ידע מגוון בביולוגיה מולקולרית. הוא היה מודע לצורך לבדוק נוכחות מוטציות ב-DNA ובמיוחד בגנים שעלולים להיות מעורבים במחלות. איתור מהיר של מוטציות בגנים שכאלה יכול להגביר את הסיכוי להציל חיי חולים. כוונתו של מוליס הייתה לפתח שיטה לאיתור יעיל של מוטציות מסוג של שינוי בנוקלאוטיד אחד (מוטציות נקודתיות). לכן, כמתואר באיור 6.1א, מוליס רצה לקבוע את זהותו של נוקלאוטיד אחד בלבד במיקום ספציפי בגן מסוים ואצל פרט מסוים. את זהותו של הנוקלאוטיד תכנן לקבוע באמצעות ניצול העקרונות לקביעת הרצף של סנגר (פרק 5).

כפי שהעיד על עצמו, לא הרפו ממנו מחשבותיו גם כשנסע לחופשת סוף שבוע בקליפורניה. באותה נסיעה הגדיר קרי כי השיטה לזיהוי נוקלאוטיד צריכה להיות מהירה וללא צורך בשיבוט. לכן תכנן להשתמש בכלל ה-DNA הגנומי (ולא במקטע משובט) ובתחל שייצמד ל-DNA בסמיכות לנוקלאוטיד שאת זהותו רוצים לקבוע. כמתואר באיור 6.1א, הוא התכוון להשתמש ב-DNA כתבנית, בתחל

□ קרי הגדיר שקצה 3' של התחל יהיה קרוב לנוקלאוטיד שאת זהותו רוצים לקבוע.

וב-DNA פולימראז. הכוונה הייתה לאפשר סינתזה מוגבלת במערך של 4 מבחנות שבכל אחת מהן רק אחד מארבעת הנוקלאוטידים המסיימים מטיפוס הדי-דאוקסי (ddNTP) (פרק 5), כשהם מסומנים רדיואקטיבית. כמתואר באיור 6.1ב, התחל אמור להתארך רק במבחנה שבה הנוקלאוטיד המסיים שסופק יכול להשלים את

הנוקלאוטיד שאת זהותו רוצים לקבוע. כשיתווסף נוקלאוטיד רדיואקטיבי מטיפוס הדי-דאוקסי לתחל על-ידי האנזים DNA פולימראז, לא תתאפשר עוד הארכה של גדיל ה-DNA, ויתקבל אוליגו-נוקלאוטיד רדיואקטיבי קצר. בעזרת איתור המבחנה שבה התקבל אוליגו נוקלאוטיד רדיואקטיבי, נוכל לדעת איזה נוקלאוטיד התווסף לתחל ועל-ידי כך לקבוע את זהות הנוקלאוטיד הרצוי. תהליך האיתור של המבחנה שעשויה להכיל את האוליגו-נוקלאוטיד הרדיואקטיבי, מתואר בחלק ג' של איור 6.1, והוא מצריך הפרדה של תוצרי הסינתזה המוגבלת בגל.

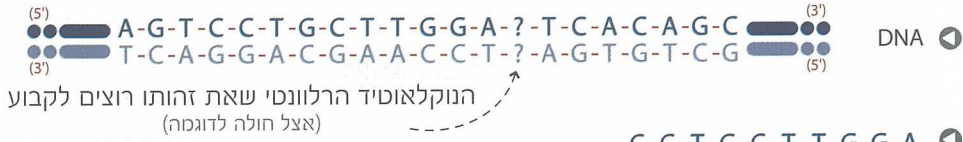
קרי מוליס רצה להשתמש באוליגו-נוקלאוטידים המשמשים כתחלים ובעיקרון קביעת הרצף של סנגר כדי לקבוע את זהותו של נוקלאוטיד אחד במיקום מסוים ב-DNA. למעשה, הוא רצה לאתר מוטציות בגנים אצל פרטים החשודים בנשיאתן. הוא התכוון לעשות זאת באמצעות מערך ניסיוני המתואר באיור 6.1.





א. המרכיבים הדרושים לקביעת זהות נוקלאוטיד במיקום מסוים במערך ניסיוני שבו 4 מבחנות

1. בכל המבחנות



תחל בעל יכולת להיצמד בסמיכות לנוקלאוטיד הרלוונטי

2. במבחנה מסוימת בלבד

נוקלאוטיד מסיים" רדיואקטיבי (מסוג די-דאוקסי)

מבחנה :4 מרכיבי א1 + ddC	מבחנה :3 מרכיבי א1 + ddG	מבחנה :2 מרכיבי א1 + ddA	מבחנה :1 מרכיבי א1 + ddT
-----------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------

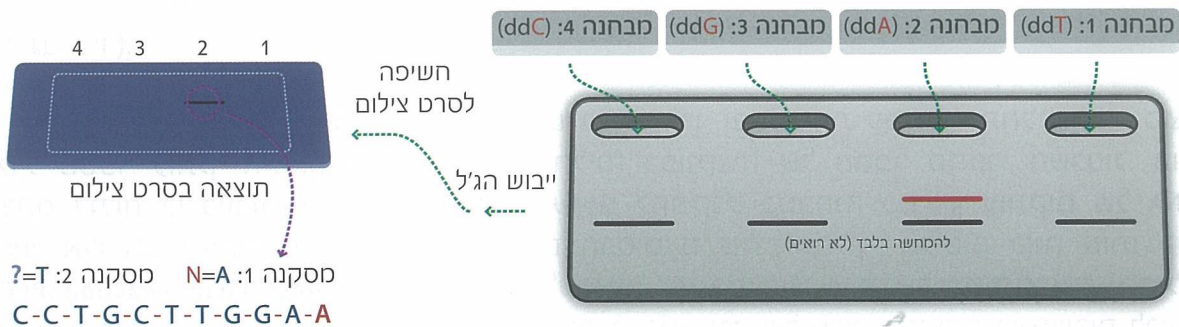
ב. מאפשרים סיתזה מוגבלת והארכת התחל שאמורה להתקיים רק באחת המבחנות

מקיימים הכרדת גדילי ה-DNA על ידי חימום (1), היצמדות התחל (2), הארכת התחל בנוקלאוטיד אחד (3).

תוצאה צפויה



ג. זיהוי הנוקלאוטיד הרלוונטי ב-DNA על פי איתור המבחנה שבה התקבל אוליגו-נוקלאוטיד רדיואקטיבי; לשם כך מקיימים אלקטרופורזה בג'ל



איור 6.1: מערך ניסיוני תאורטי שעליו חשב קרי מוליס שנועד לזיהוי מהיר של מוטציות ללא צורך בשיבוט.

קרי התכוון לאפשר לתחל להיצמד בסמוך לנוקלאוטיד שביקש לזהות ולאפשר הארכה של התחל באמצעות נוקלאוטיד רדיואקטיבי בודד. סוג הנוקלאוטיד שיתווסף לתחל אמור להעיד על זהות הנוקלאוטיד. מערך זה מעולם לא מומש למטרה שלשמה יועד, וחשיבותו היא בכך ששימש "קרב קפיצה" מחשבתית לרעיון חשוב בהרבה ולהמצאת ה-PCR.

כפי שסיפר קרי עצמו, בעת נסיעתו הלילית גרמה לו ספקנותו לשקול אפשרות להגביר את מידת האמינות של השיטה המוצעת. הוא סבר שלמען האמינות יש לבצע גם בדיקה לזיהוי נוקלאוטיד נוסף: הנוקלאוטיד המשלים את זה שזהותו נקבעה. זאת באמצעות תחל נוסף בעל יכולת להיצמד לגדיל המשלים בסמיכות לנוקלאוטיד הנוסף. בעודו ממשיך בנסיעתו כשהוא חושב על DNA, 2 תחלים, 4 נוקלאוטידים ו-DNA פולימראז - בזמן שחברתו ישנה במושב שלידו - הוא היה על סף המצאה מהפכנית! אבל נותרה דרך מחשבתית ארוכה עד לפיתוח שאותו אפילו לא שיער. בשלב זה החל קרי לחשוב על הבעיות העוללות לצוץ במהלך היישום. בעיקר הטרידה אותו האפשרות שה-DNA הגנומי שיעמוד לרשותו, לא יהיה נקי מספיק ושהוא עלול להכיל גם שאריות נוקלאוטידים מהטיפוס הרגיל (dNTP). במקרה כזה סביר להניח ששיטתו לקביעת זהותו של נוקלאוטיד במיקום ספציפי לא תצלח. התחלים יתארכו וייווצרו גדילי DNA משלימים ארוכים שהם חסרי ערך למימוש השיטה.

קרי לא התייאש. מסוקרן ממסקנותיו ניסה כיוון מחשבתי חדש. הוא ניסה לצפות מה יקרה אם ישמיט את הנוקלאוטידים מהטיפוס ddNTP ויספק נוקלאוטידים מטיפוס dNTP בלבד. ויותר מזה, הוא ניסה להעריך מה יקרה אם אתרי ההיצמדות של שני התחלים ימצאו מרוחקים כמה מאות בסיסים זה מזה. ומה צפוי לקרות לאחר שמאפשרים תהליך תלת-שלבי של הפרדת גדילי ה-DNA, של היצמדות התחלים ושל הארכת התחלים על ידי הפולימראז? הוא שיער שבמקרה זה יתרחש שכפול מלא של מקטע DNA קצר. גבולותיו של מקטע ה-DNA שעתידי לעבור שכפול מלא יהיו קצוות התחלים.

בשעה שמרבית המדענים היו נוטשים את משימתם בשל התרחקות מהמטרה המקורית, המשיך קרי ושאל את עצמו שאלה אחת נוספת, קריטית, שנבעה מהיכרותו עם תוכנות מחשב ועם הלולאות שבהן: מה יקרה אם יחזור יותר מפעם אחת על תהליך השכפול? ממולקולת DNA אחת ולאחר תהליך תלת-שלבי אחד יתקבלו (תאורטית, שכן בשלב זה "ניסה" זאת קרי רק במוחו) שני עותקים מלאים של DNA דו-גדילי; ואילו לאחר שני תהליכים תלת-שלביים (שני מחזורי שכפול) יתקבלו ארבעה עותקים כאלה (ודאו זאת בעצמכם על גבי נייר).

□ המקטע שגבולותיו בין התחלים, יעבור שכפול מלא (משני גדילים ייווצרו ארבעה). לעומת זאת, במקטעים משני עברי נקודות הקישור של התחלים יתקבל גדיל אחד נוסף בלבד, תוצר של הארכת תחל, ומשמעות הדבר היא שכפול חלקי בלבד (ודאו זאת בעצמכם על גבי נייר).

מופתע מאוד מהגילוי, עצר קרי את מכוניתו בצד הדרך ובאמצעות עט ונייר החל מחשב כיצד יגדל מספר עותקי ה-DNA הרצוי (שבין התחלים) כפונקציה של מספר מחזורי השכפול. הוא נדהם לגלות כי כעבור 20 מחזורי שכפול עשויים להתקבל במבחנה כמיליון עותקים של DNA רצוי. אלו הם העקרונות הרעיוניים והטכניים הבסיסיים של התהליך, שלימים כינה אותו קרי **Polymerase Chain Reaction (PCR)**; ובתרגום לעברית: "תגובת השרשרת של הפולימראז" (המילה שרשרת מתייחסת לשרשרת מחזורי שכפול). ייחודה המהפכני של גישת קרי הוא באפשרות לריבוי ניכר (הגברה) של מקטע DNA מוגדר במבחנה, ומבחינות רבות זהו שיבוט שאינו מצריך שימוש בספריות ובחידקים. בשלב זה עוד לא הפנים קרי את המשמעות והפוטנציאל הגלומים ביישום ה-PCR. הוא כלל לא שיער שהוא עתיד לגרום לשינוי דרמטי בהרגלי העבודה של העוסקים בביולוגיה מולקולרית, שינוי שיביא לקיצור משך הזמן הדרוש לשיבוט. הוא גם לא שיער את שלל היישומים הנוספים שיצוצו, ביניהם אבחון רפואי וגנטי מהיר ויעיל.

בניסיונו להציע פתרונות לבעיות שעוללות לצוץ במהלך מימוש רעיונותיו כפי שהוצגו באיור 6.1, קרי מדמיין בשלב מסוים מערך ניסיוני חדש. המרכיבים במערך זה הם 2 תחלים בעלי יכולת להיצמד לכל אחד משני גדילי DNA משלימים, נוקלאוטידים ו-DNA פולימראז. הוא העריך שאם יאפשר בנוכחות מרכיבים אלה תהליך תלת-שלבי של הפרדת גדילים, של היצמדות תחלים ושל סינתזת DNA תלוית פולימראז, הוא יקבל במבחנה שכפול מקטע DNA קצר.

קרי שב למקום עבודתו, וכפי שקורה לעתים בעקבות רעיון חדשני, הטילו חבריו לעבודה ספק בהמצאתו. חודשים ארוכים עברו עד שהצליח להוכיח באופן ניסיוני שה-PCR אכן ניתן לביצוע. כשהיו בידיו ההוכחות הניסיוניות הדרושות, הוא זכה לברכת הממונים עליו, הפטנט נרשם והפיתוח הוצג בפני מדענים בכירים. בשלב הבא הוקם צוות מדענים בחברה שבה עבד. הצוות שקד על שכלול השיטה ועל מציאת תנאים אופטימליים ליישומה. לבסוף, כשלא זו בלבד שהוכח שה-PCR הוא בר ביצוע אלא גם מעשי מאוד, היו מדענים שתמחו: "אז איך זה שלא חשבתי על זה בעצמי?" בשנת 1993, זמן קצר יחסית לאחר פריצת הדרך של קרי מוליס, הוא נקרא לשטוקהולם לקבל מידי מלך שוודיה את פרס הנובל לכימיה. כיום לא ניתן לתאר עבודה במעבדה העוסקת בביולוגיה מולקולרית או עבודה בבית חולים - ואפילו במעבדה לזיהוי פלילי - ללא PCR, כפי שאפשר ללמוד מיישומיה הרבים של שיטה זו.

## ה-PCR - עקרונות ומהות

תהליך ה-PCR משמש לייצור הרבה עותקים של מקטע DNA רצוי במבחנה. ייצור מספר רב של עותקי DNA רצוי מתאפשר על ידי **שכפול חוזר ונשנה** של מקטע DNA ומכונה לעתים גם **הגברה** של מקטע DNA. במהלך PCR טיפוסים יש ריבוי ניכר של המקטע הרצוי שבמהלכו מיוצרות במבחנה כמיליארד מולקולות DNA חדשות בתוך שעות ספורות. מה הם המרכיבים והתנאים הנחוצים לשכפול DNA במבחנה? במה שונה שכפול DNA במבחנה משכפול DNA בתא? התשובות לשאלות אלו מצויות בטבלה 6.1.

מרכיבים ומאפיינים	שכפול DNA בתא	שכפול DNA במבחנה
חומר מוצא	DNA זי-גדילי	DNA זי-גדילי
דרישה להתחלת השכפול	תחלים שהם אוליגו-נוקלאוטידים (טבעיים בתא)	תחלים שהם אוליגו-נוקלאוטידים (סינתטיים)
מרכיבים הכרחיים נוספים	DNA פולימראז, נוקלאוטידים מטיפוס dNTP ויוני מגנזיום	DNA פולימראז, נוקלאוטידים מטיפוס dNTP ויוני מגנזיום
הפרדת גדילים לצורך שכפול	באמצעות אנזימים וחלבונים אחרים	באמצעות שינוי טמפרטורה (95°C)
שכפול	כל ה-DNA של התא משוכפל פעם אחת	משוכפל רק מקטע מוגדר, קטן יחסית, מספר רב של פעמים
תיקון טעויות בזמן שכפול	תיקון יעיל מאוד	רק לחלק מאנזימי ה-DNA פולימראז הנמצאים בשימוש, יש יכולת מוגבלת לתיקון טעויות

**טבלה 6.1: הדומה והשונה בין שכפול DNA בתא ובין שכפול DNA במבחנה באמצעות PCR.**

בטבלה 6.1 ובאיור 6.2 אפשר לראות כי **לשכפול DNA במבחנה נדרשים** המרכיבים האלה:

1. **DNA מטרה:** לעתים מכונה DNA זה גם "DNA מקור". זהו DNA ממקור מסוים הכולל את המקטע המיועד להגברה המכונה גם "המקטע הרצוי".
2. **זוג תחלים** בעלי רצף ייחודי הנצמדים לכל אחד מהגדילים המשלימים של ה-DNA באתרים ייחודיים. התחלים קובעים איזה מקטע DNA ישוכפל ויוגבר, והם נדרשים בכמות גדולה.
3. **נוקלאוטידים** מטיפוס dNTP, אבני הבניין של ה-DNA העתיד להיווצר במהלך השכפול.
4. **האנזים DNA פולימראז** המאריך תחלים באמצעות הוספת נוקלאוטידים.

**א. מרכיבי ה-PCR**

◀ DNA ובו המקטע המיועד להגברה

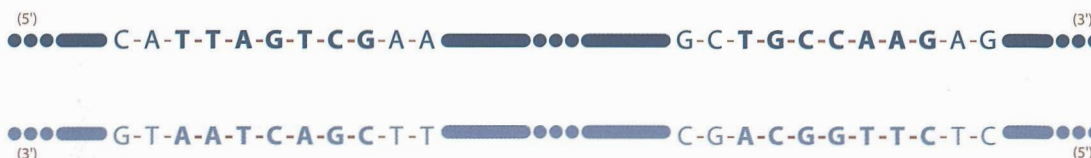


◀ תחל 1: A-C-G-G-T-T-C (3')      ▶ תחל 2: T-T-A-G-T-C-G (5')  
 התחלים כאן הם להמחשה בלבד; בפועל אורכם כ-20 נוקלאוטידים כל אחד

◀ נוקלאוטידים: dATP(A), dTTP(T), dCTP(C), dGTP(G)      ▶ האנזים DNA פולימראז:

**ב. שלושת השלבים של מחזור שכפול טיפוס**

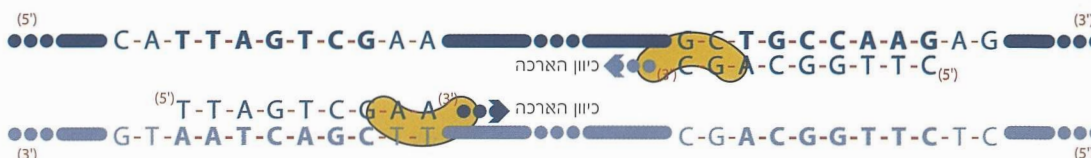
1. הפרדת גדילים (ב-95°C)



2. היצמדות תחלים (ב-65°C-50°C)



3. הארכת תחלים וסינתזת DNA (ב-72°C)

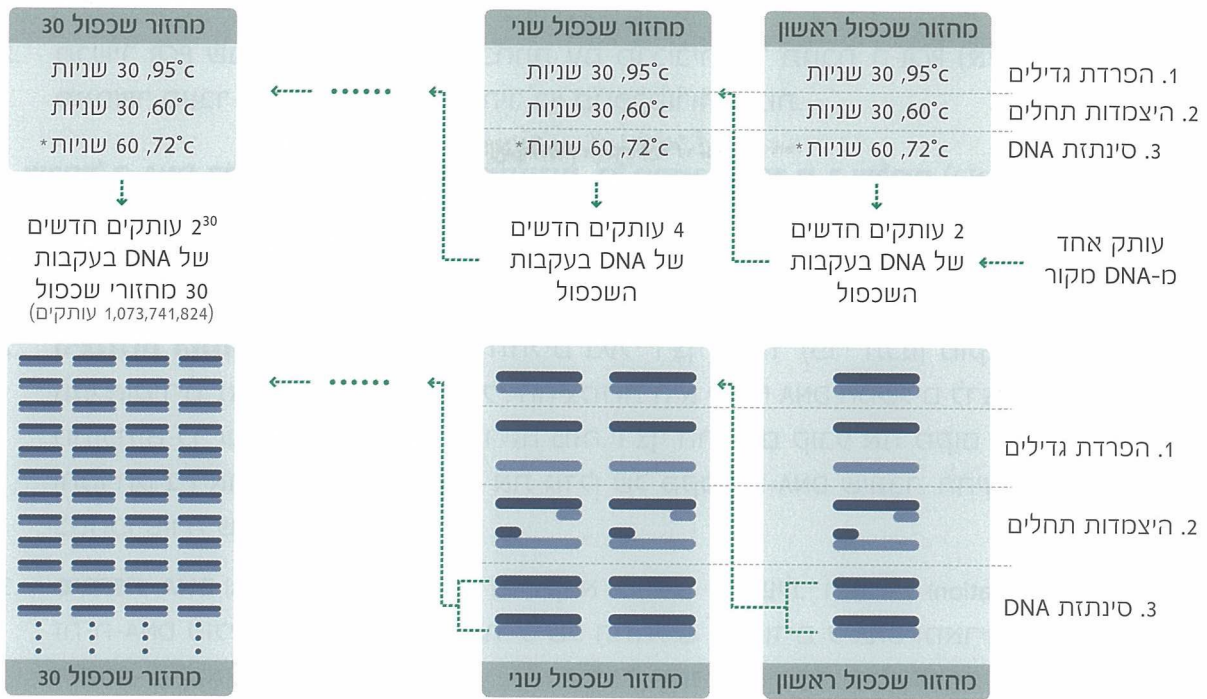


**איור 6.2: תגובת השרשרת של הפולימראז (PCR).**

א'-ב'. מרכיבים ושלבים של מחזור שכפול אחד. **המשך האיור בעמוד הבא.**

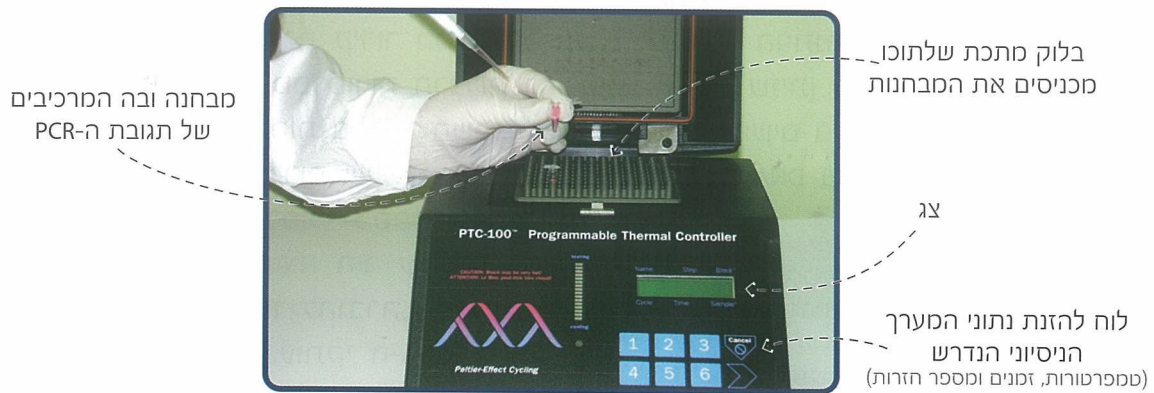
המרכיבים העיקריים הנחוצים במבחנה לקיום PCR לצורך שכפול והגברה של מקטע DNA רצוי מצוינים באיור 6.2. מרכיבים הכרחיים נוספים הם יוני מגנזיום ובופר מתאים הנדרשים לפעילות אופטימלית של ה-DNA פולימראז. שלושת השלבים הנחוצים לקיום מחזור שכפול אחד של DNA במבחנה מתוארים בחלק ב' של איור 6.2.

ג. הגברה באמצעות מחזורי שכפול בשרשרת



\* כושר סינתזת ה-DNA תלוי באורך המקטע המיועד להגברה

ד. מכשיר PCR



איור 6.2 המשך: תגובת השרשרת של הפולימראז (PCR).

- ג. הגברה באמצעות מחזורי שכפול בשרשרת. מתואר מערך הגברה של 30 מחזורי שכפול.
- ד. מכשיר PCR המאפשר מעבר מהיר ואוטומטי בין טמפרטורות על פי המערך הניסיוני הנדרש.

לשכפול DNA במבחנה דרושים גם המרכיבים והכלים הבאים:

1. בוכר המכיל יוני מגנזיום הנדרשים לפעילות הפולימראז.
2. מכשיר PCR שבו מסקמים את המבחנות עם מרכיביה של תגובת ה-PCR (איור 6.2ד'). המכשיר מאפשר מעבר מתזמן, אוטומטי ומהיר בין טמפרטורות שונות.

**שכפול ה-DNA במהלך ה-PCR נעשה במחזורים. כל מחזור מורכב מ-3 שלבים** (ראו איור 6.2ב' ו-ג').

1. **הפרדת גדילים** (Denaturation): ההפרדה נעשית ב-95°C. הפרדת הגדילים מאפשרת למולקולות DNA דו-גדילי להיפרד ל-2 מולקולות DNA חד-גדילי.
2. **היצמדות התחלים** (Annealing): שני תחלים בעלי רצף מוגדר (פרי תכנון מוקדם) שאורכם כ-20 נוקלאוטידים, נצמדים ל-DNA חד-גדילי. ההיצמדות היא לרצף המשלים לרצף התחל. התחלים מתכננים כך שייצמדו במרחק מוגדר זה מזה. רצף התחלים קובע את מקום ההיצמדות ל-DNA, והמרחק בין אתרי ההיצמדות קובע את גודלו של מקטע ה-DNA שיוגבר. ההיצמדות מתאפשרת בטמפרטורה שבין 50°C ל-65°C.
3. **סינתזת DNA** (DNA synthesis): שלב זה נקרא לעתים גם שלב הארכה (Elongation), שכן בשלב זה ה-DNA פולימראז מזהה את קצה ה-3' של התחלים הצמודים ל-DNA ומאריך אותם באמצעות הוספת נוקלאוטידים ועל פי המידע המצוי בכל אחד מהגדילים המשלימים של ה-DNA המטרה. סינתזת ה-DNA נעשית בטמפרטורה שבין 68°C ל-72°C ובסיומה מתקבלים עותקים חדשים של DNA משוכפל.

מתיאור השלבים עולה כי בכל מחזור שכפול יש צורך בשינוי הטמפרטורה בין שלב לשלב. לכן המבחנה ובה מרכיבי ה-PCR מוכנסת למכשיר PCR שצילום שלו ניתן לראות באיור 6.2ד'. מכשיר זה מצויד בגופי חימום ומערכת קירור המבוקרים על ידי מערכת הניתנת לתכנות. המכשיר מאפשר מעברים מהירים בין הטמפרטורות הרצויות לפי מערך ניסיוני שניתן להגדירו מראש. כמו כן בשל הצורך בטמפרטורות גבוהות במהלך השכפול במבחנה, משתמשים באנזים DNA פולימראז העמיד לחום. לקבלת כמויות ניכרות של DNA רצוי באמצעות שכפול DNA במבחנה, חוזרים על התהליך התלת-שלבי (מחזור שכפול) מספר פעמים.

□ האנזים DNA פולימראז העמיד לחום מופק מחיידקים הגדלים במעיינות מים חמים שהטמפרטורה שלהם היא בסביבות 75°C. האנזים העמיד לחום הראשון שהוכנס לשימוש לצורך הגברה של DNA במבחנה היה ה-DNA פולימראז שהופק מהחיידק *Thermus aquaticus* ושזכה לכינוי *Taq polymerase*. הטמפרטורה האופטימלית לפעילות אנזים זה היא 72°C והאנזים יכול לשמר רמת פעילות ניכרת גם לאחר שהות קצרה ולא רצופה ב-95°C. כעבור שנים מספר הוכנסו סוגים נוספים של DNA פולימראז עמידים לחום (Pow, Supertherm ואחרים), שחלקם בעלי תכונות דומות לתכונות ה-*Taq* וחלקם בעלי תכונות משופרות כגון יכולת טובה לתקן טעויות בזמן השכפול. קיומו של אנזים DNA פולימראז עמיד לחום היה אחד הגורמים העיקריים שאפשרו את האוטומציה של תהליך ה-PCR.

לדוגמה, אם בחומר המוצא היה עותק אחד בלבד של ה-DNA המיועד להגברה, הרי שקל לחשב מה יהיה מספר עותקי ה-DNA הרצוי לאחר כל מחזור שכפול (איור 6.2ג'). כך, לאחר המחזור הראשון יתקבלו שני עותקים של ה-DNA, לאחר שני מחזורים יתקבלו 4 עותקים, ולאחר שלושה מחזורים יתקבלו 8 עותקים. אם נמשיך בצורת הישוב זו נמצא כי לאחר 30 מחזורי שכפול עשויים להתקבל בתנאים אופטימליים למעלה ממיליארד עותקים. מספר העותקים שיתקבל בתנאים אופטימליים לאחר

n מחזורים הוא <sup>2</sup>. מספר החזרות על מחזור שכפול (n) נקבע עלי ידי הכמות הסופית הרצויה של המקטע המוגבר אגב התחשבות בכמות DNA המקור. למעשה, מספר העותקים של מקטע ה-DNA הרצוי שיתקבל בסוף תהליך ההגברה תלוי הן בכמות DNA המקור והן במספר מחזורי השכפול.

בשל יתרונותיו של תהליך ה-PCR על פני חלופות אחרות, אומצה טכנולוגיה זו במהירות בתחומים רבים. ניתן לציין בקצרה 3 יתרונות בולטים לשימוש בתהליך ה-PCR, ואלה הם:

1. **שיבוט במהירות ובפשטות:** לחיידקים יש אמנם יכולת טובה להגביר DNA באמצעות שכפול של פלסמידים בתוכם, אך גם באמצעות PCR ניתן לקבל קטע DNA רצוי בכמויות ניכרות (הגברה) למגוון מטרות. יתרה מזו, ההגברה תלויה ה-PCR מאפשרת ריבוי של מקטע DNA מוגדר, שבעקבותיו כמות ה-DNA ההטרוגני המקורי שהוכנס למבחנה נעשית זניחה. לפיכך מתקיים במבחנה גם בידוד של המקטע המוגדר שעבר הגברה. בידוד וריבוי אלה באמצעות PCR הם למעשה שיבוט שניתן להגשימו בשעות ספורות. למעשה, PCR מאפשר בהרבה מקרים לותר על שיבוט באמצעות ספריות וגלאים, הדורש מיומנות גבוהה במיוחד והמצריך חודשי עבודה רבים! יתרון זה של ה-PCR מומחש בתת-פרק "השימושים ל-PCR" שבפרק זה.

2. **רגישות:** PCR מאפשר הגברה של מקטע DNA מכמויות זעירות של DNA מקור ואפילו מ-DNA שמקורו בתא אחד. בשל כך ניתן לשבט גנים ממקורות שאינם מאפשרים שיבוט באמצעות ספריות.

3. **עוצמתיות:** אפשר לקיים PCR גם אם DNA המטרה שממנו מבקשים להגביר מקטע DNA ספציפי הוא בדרגת ניקיון נמוכה או באיכות גרועה (לדוגמה, DNA ללא קצוות הנחוצים לשיבוץ בנשא). עובדה זו מאפשרת לקיים מחקר במגוון תחומים שיכולים להציע דגימות DNA השמישות רק ב-PCR, כמו מחקר המתבסס על שרידי רקמות מחולים שנפטרו ואפילו מחקר המתבסס על שרידי מאובנים בני מיליוני שנה.

הרגישות והעוצמתיות של ה-PCR אפשרו לפתח יישומים בתחומים רבים ומגוונים כגון חוק ומשפט, אבחון רפואי ועוד, כפי שמודגם בהמשך.

למרות הפופולריות של תהליך ה-PCR, יש לשיטה גם **מגבלות** מסוימות ואלה הן:

1. **יש צורך במידע מוקדם אודות ה-DNA המיועד להגברה:** רצף ה-DNA המיועד להגברה צריך להיות ידוע לפחות בחלקו כדי לאפשר יצירת תחלים. עם זאת, לאחר שנקבע בשלמותו רצף ה-DNA בגנום של אורגניזמים רבים (בפרוייקטי גנום), יש שפע של מידע מוקדם אודות רצפי DNA.

2. **מגבלת גודלו של המקטע הניתן להגברה:** לא ניתן להגביר בעילות מקטע DNA שגודלו עולה על מספר אלפי בסיסים בודדים.

3. **הצטברות טעויות:** בשכפול DNA בתאים מידת הדיוק גבוהה ביותר, משום שקיימות בהם מערכות אנזימים האחראיות לתיקון טעויות. אחד המקרים שבהם מערכות תיקון מופעלות מתרחש לאחר שה-DNA פולימראז ממקם נוקלאוטיד שגוי ב-DNA ובכך גורם לחוסר התאמה בין בסיסים הממוקמים זה מול זה על שני הגדילים. למעשה, שיעור הטעות (שיעור המוטציות) לאחר שכפול של DNA **בתא**, הוא בסדר גודל של בסיס אחד לכל 3 מיליארדי בסיסים בלבד! לעומת זאת, במהלך

שכפול במבחנה האנזים היחיד שעשוי לתקן טעויות הוא ה-DNA פולימראז עצמו. לא כל האנזימים המשמשים ב-PCR הם בעלי יכולת תיקון טעויות. אנזים בעל יכולת תיקון טובה מבטיח שמספר הטעויות לא יעלה על 1 ל-6000 נוקלאוטידים. שיעור מוטציות זה עדיין גבוה מאוד בהשוואה לשיעור המוטציות בתא.

4. **תוצרי הגברה לא רצויים** (בעיות אפשריות בספציפיות ההגברה): למעט מקרים מיוחדים, התחלים עבור הגברת מקטע DNA מסוים מתוכננים בקפדנות כך שתהיה התאמה מוחלטת בין רצף התחל לבין רצף אחד ויחיד ב-DNA המקור ובו הרצף המשלים לתחל. תכנון שכזה מאפשר במרבית המקרים, למעט הטעויות האפשריות שאוזכרו בסעיף 3, קבלת תוצר PCR אחד, שהוא התוצר הרצוי. אולם לעתים נוצרת היצמדות בין התחלים לבין יותר מזוג רצפים ב-DNA המקור. בדרך כלל

אירועי ההיצמדות הנוספים הם מטיפוס של "היצמדות חלקית" שבה מעורבים רק מקצת הנוקלאוטידים שבתחל. אירועים אלה מתקיימים באתרים שונים מאלה שהיו אמורים להשתתף בהיצמדות תקנית ומלאה. היצמדות חלקית לרצפים לא רצויים עלולה לאפשר יצירתם של תוצר או תוצרי הגברה לא רצויים, והללו עלולים להתקבל בנוסף לתוצר הרצוי או במקומו. לפיכך מקפידים לבדוק את תוצרי ההגברה באמצעות גלים, כדי לוודא אם התקבל מקטע DNA רצוי ובגודל הצפוי. לעתים אין מסתפקים באפיון גודל ומוודאים קבלת התוצר הרצוי על פי קביעת רצף ה-DNA שלו.

□ תחלים עלולים לעבור "היצמדות חלקית" שבה נצמדים רק מקצת הבסיסים של התחלים ל-DNA המקור (בהיצמדות כזו מעורבים כ-60% מהבסיסים בתחל). היצמדות חלקית כזו מתאפיינת ביציבות נמוכה יחסית. אך למרות זאת היא עלולה לאפשר לעתים קבלת תוצר PCR בלתי רצוי. כדי לצמצם ככל האפשר את הסיכויים לאירועי היצמדות חלקיים ולא רצויים, מקפידים לקיים היצמדות תחלים בטמפרטורה גבוהה יחסית המותאמת לאורכו של התחל. ככל שהתחל ארוך יותר, ניתן ורצוי להעלות את הטמפרטורה שבה מקיימים את ההיצמדות, וזאת כדי למנוע אירועי היצמדות לא רצויים. כמו כן נמנעים מלהשתמש בתחלים הקצרים מ-17 נוקלאוטידים, שעלולים לאפשר אירועי היצמדות ותוצרי הגברה לא רצויים.

## שאלה 6.1

מה הן לדעתכם התכונות של קרי מוליס כאדם וכמדען שאפשרו לו להגיע להישג מדעי מרשים בפיתוח ה-PCR, שיטה מולקולרית מהפכנית?

## שאלה 6.2

הניחו כי בהליך PCR מסוים חומר המוצא הוא 4 עותקים של DNA המיועד להגברה. כמה עותקי DNA רצוי אנו מצפים לקבל בתנאי הגברה אופטימליים לאחר 12 מחזורי הכפלה?

## שאלה 6.3

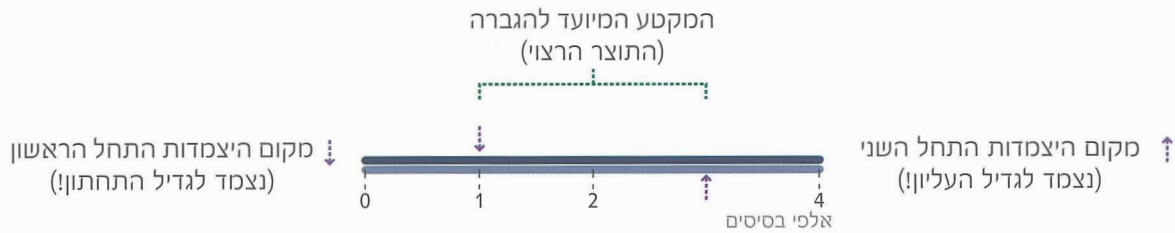
- שכפול DNA בתא של יונק נעשה בטמפרטורה של  $37^{\circ}\text{C}$ , ואילו שכפול DNA במבחנה מצריך טמפרטורות גבוהות ואפילו  $95^{\circ}\text{C}$ . הסבירו את הצורך בטמפרטורות גבוהות במהלך שכפול במבחנה וצינו גורמים בתא שמאפשרים שכפול בטמפרטורות נמוכות בהרבה.
- בעת פיתוח תהליך ה-PCR ובתקופה הראשונה לשימוש ב-PCR היה צורך להוסיף מנה טרייה של אנזים לאחר כל מחזור שכפול. מה לדעתכם הייתה הסיבה לכך?

**מגבלה** נוספת שיש לשימוש ב-PCR היא הופעתם לעתים של תוצרי הגברה לא רצויים. תוצרים אלה מקורם באירועי היצמדות בלתי מתוכננים של התחלים לאתרים לא רצויים ב-DNA המקור. בהיצמדות הלא רצויה של תחלים משתתפים רק מקצת הנוקלאוטידים בתחל. ניתן להימנע ממרבית התוצרים הלא רצויים על ידי שימוש בתחלים ארוכים יחסית ושימוש בטמפרטורה גבוהה יחסית בעת ההיצמדות.



3. תהליך ה-PCR נכנס לשימוש נרחב רק כשהשתכלל ונעשה אוטומטי. מה לדעתכם היו הגורמים שאפשרו שכלול ואוטומציה?

## שאלה 6.4



### איור ש'-6.4: תיאור סכמטי של מקטע DNA שת-מקטע מתוכו מיועד להגברה.

תהליך ה-PCR מאפשר להגביר ולשבט מקטע קטן מתוך מקטע גדול יותר. במהלך הסינתזה ה-DNA פולימראז יכול לעתים לייצר DNA גם מעבר למקטע הרצוי. האם סינתזה עודפת ולא רצויה זו היא משמעותית? הניחו שלרשותכם עותק אחד של מקטע DNA בן 4,000 נוקלאוטידים/בסיסים. כמתואר באיור ש'-6.4, מטרתכם היא להגביר מקטע שגודלו 2,000 בסיסים, מבסיס שמספרו 1,000 ועד בסיס 3,000. לרשותכם 2 תחלים מתאימים להשגת מטרה זו. ציירו את תוצרי השכפול בכל אחד מארבעת מחזורי השכפול הראשונים. ציירו את תוצרי השכפול לאחר המחזור הראשון ואחר כך ציירו רק את התוצרים שיתקבלו מאחד משני התוצרים שהתקבלו לאחר מחזור השכפול הראשון.

א. כמה תוצרים רצויים בגודל 2,000 זוגות בסיסים וללא "זנב" של DNA חד-גדילי יתקבלו לאחר מחזור השכפול השני?

ב. כמה תוצרים רצויים, ולהבדיל לא רצויים, יתקבלו לאחר מחזורי השכפול הרביעי והחמישי?

## שאלה 6.5

בשאלה 4 בפרק 5 דווח כיצד החוקרת הנדסית שיבטה מחדש גנים מצמחים בעלי פרות קטנים שבהם היא איתרה מוטציות. החוקרת שבה לשדה השיחים ואיתרה צמחים שהפרי שלהם גדול מהממוצע, ומיד רצתה לשבט מחדש את גנים שעשויים להיות רלוונטיים למופע הפרות הגדולים. הפעם החליטה לשבט מחדש את הגנים העשויים להיות רלוונטיים באמצעות PCR. גם הפעם רצתה לדעת אם בגנים שתשבט תמצאנה מוטציות. על אילו מהכלים והתהליכים הבאים היא תוכל לוותר ומדוע?

- |                              |                           |
|------------------------------|---------------------------|
| 1. הפקת DNA או RNA           | 2. ספריית בקטריופאגים     |
| 3. גלאי רדיואקטיבי           | 4. DNA פולימראז           |
| 5. סינתזת אוליגו-נוקלאוטידים | 6. קביעת רצף המקטע המשובט |
| 7. פלסמידים וחיידקים         | 8. תחלים ונוקלאוטידים.    |

## שימושים ל-PCR

האם פרט מסוים הוא נשא של מוטציות שעלולות לבשר התפתחותה של מחלה? האם הורים נשאים למוטציה בגן המעורב במחלה יכולים להביא לעולם בבטחה צאצא בריא? האם צמחים ובעלי חיים שהונדסו אכן נושאים את השינוי הגנטי הרצוי? האם ניתן להפיל בוודאות את החשוד בביצוע הכשע? כדי לקבל תשובה מהירה ומדויקת לשאלות אלה משתמשים ב-PCR. למעשה, קשה להבין לעומק את חיינו בעולם מתקדם בכל הנוגע למדע, רפואה, חוק ומשפט, ואפילו בכל הנוגע לטיב האוכל שאנו אוכלים בלי להכיר את עקרונותיו ושימושיו של ה-PCR.

מתוארים כאן מקצת שימושי ה-PCR הנפוצים, נכון לכתיבת שורות אלה, שמתוכם אפשר להעריך את חשיבותם ואת מגוון האפשרויות הטמונות בהם. אבל לפני שניציג את השימושים "הפיקנטיים", כדאי לבחון את האופן שבו ה-PCR מקל את עבודת החקר המבוססת על הנדסה גנטית.

## RT-PCR

מרגע ששיטת ה-PCR נכנסה לשימוש נרחב במעבדות מחקר, התייעלו גישות ניסיוניות רבות ולעתים התקצר הזמן הנחוץ למימושן בכמה סדרי גודל, משבועות וחודשים לשעות. רבות מהגישות שהתייעלו מתבססות על תהליך דו-שלבי הקרוי RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR). בשלב הראשון של תהליך זה מפיקים RNA ולאחר מכן מייצרים ממנו DNA משלים באמצעות האנזים המתעתק במהופך (Reverse Transcriptase) (כפי שמתואר בפרק 4) (שלב ה-RT). בשלב השני משתמשים ב-DNA המשלים ההטרוגני שהתקבל לצורך הגברת מקטע DNA רצוי באמצעות PCR.

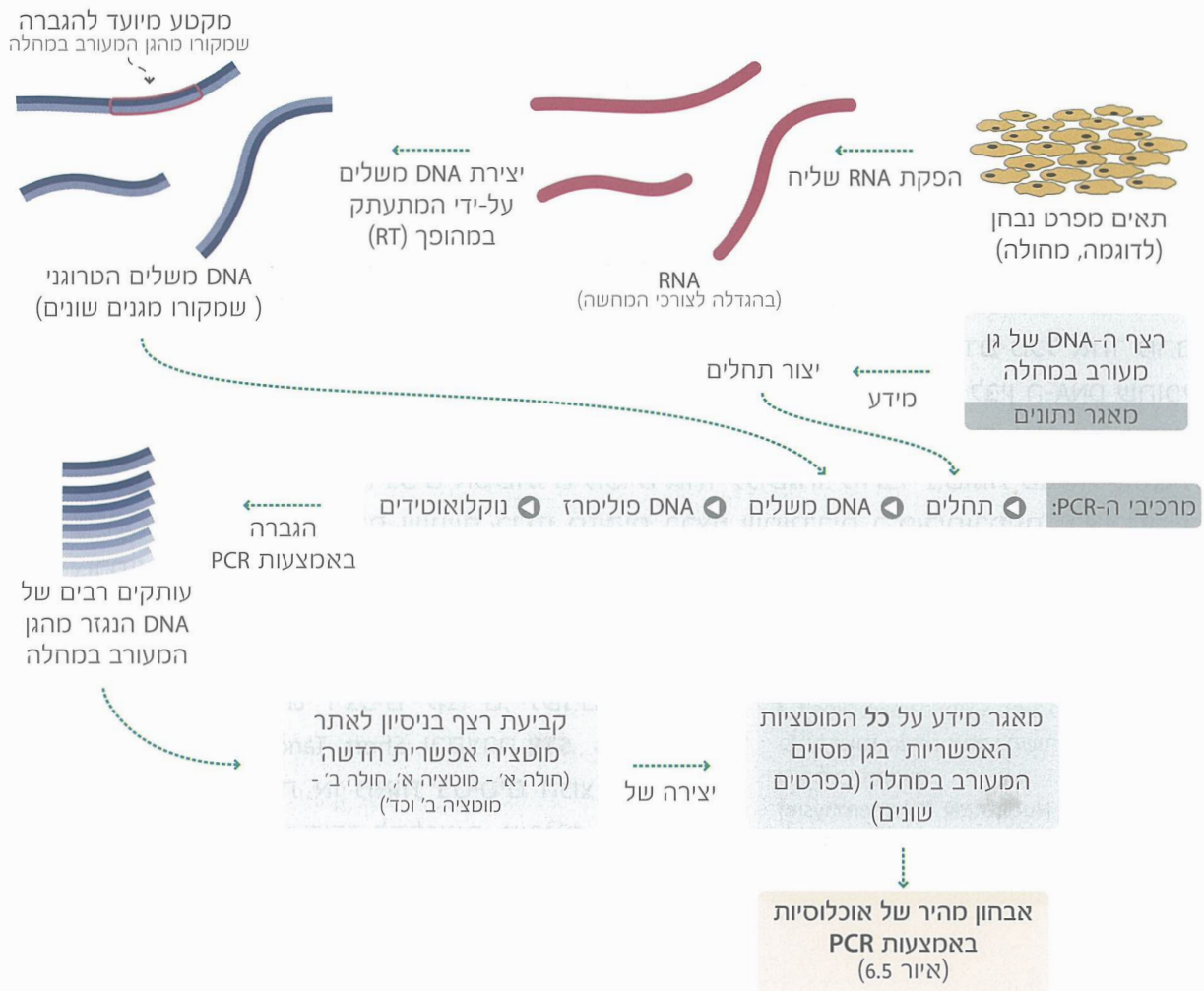
## שימושי ה-RT-PCR:

1. **שיבוט מחדש לאיתור מוטציות:** לעתים קיים שוני בין רצף הבסיסים של גן מסוים בפרטים בריאים לבין הרצף של אותו הגן בפרטים חולים. כדי לאתר מוטציות שניתן לסווגן כאחראיות למחלה, מקיימים את תהליך ה-RT-PCR כדי לשבט מחדש DNA משלים שמקורו בפרטים חולים (איור 6.3). השיבוט מחדש נעשה בניסיון לזהות מוטציה חדשה בפרט מסוים מכיוון שאצל חולים שונים ייתכנו מוטציות שונות באותו הגן. למעשה, משבטים את ה-DNA המשלים הרצוי מהרבה חולים, כדי לאתר את מגוון המוטציות האפשריות בגן זה באוכלוסייה. איתור מוטציות ראשוני שכזה עשוי לעזור בהבנת תפקידי הגן התקין ולספק מידע לעריכת מבחני אבחון ממוקדים באוכלוסייה הכללית (על כך בהמשך).
2. **שיבוט מחדש לצורך ביטוי חלבון:** כפי שיובהר בפרק 8, ניתן לנצל RT-PCR כדי לשבט DNA משלים רצוי למטרת שיבוצו בנשא לצורך ביטוי החלבון שאותו מקודד ה-DNA המשלים. את המידע על התחלים המתאימים ניתן לאתר במאגרי מידע שבהם מרוכזים רצפי כלל הגנים של אורגניזמים רבים (מאגרים תוצרי פרויקטי גנום).

ל-PCR שימושים במגוון תחומים ובין היתר ברפואה ובזיהוי פלילי. בנוסף PCR מייצל עבודת חקר של הביולוגים המולקולריים. רבות מגישות החקר המעבדתיות שהתייעלו מבוססות על תהליך דו-שלבי הקרוי **RT-PCR**. בשלב הראשון מקבלים DNA משלים באמצעות המתעתק במהופך (RT) ואחר כך מגבירים את המקטע הרצוי. כפי שיובהר בפרקים 7 ו-8, RT-PCR משמש בין היתר לשיבוט לצורך ביטוי חלבון ולאפיון איכות וכמות יחסית של RNA.

3. **אפיון כמות ואיכות RNA מסוים בתא:** ה-RT-PCR מסייע באיתור התאים שבהם נוצר ה-RNA של גן מסוים, בקביעת העיתוי שבו נוצר ה-RNA ובאפיון הכמות והאיכות של ה-RNA. למידע כזה על ביטוי RNA של גן יש חשיבות בקביעת תפקודי הגן הנחקר. פירוט נוסף על תהליכים אלה אפשר למצוא בפרק 7.

שימושים נוספים ל-PCR שלא באמצעות RT יוזכרו בפרק זה ובפרקים אחרים.



**איור 6.3: שיבוט מחדש באמצעות RT-PCR לצורך איתור מוטציות.**

שיבוט מחדש של DNA שמקורו בגן שיש חשד למעורבותו במחלה, נעשה באמצעות RT-PCR. חוזרים על שיבוט זה מספר רב של פעמים בנוכחות DNA מפרטים שונים כדי לאתר מוטציות חדשות בפרטים שונים ("פרטים נבחנים") וכדי לצבור מידע על כל המוטציות האפשריות באוכלוסייה.

**RT-PCR** משמש לאיתור מוטציות בפרטים נבחנים שיש חשד שהם נושאים מוטציות בגנים מסוימים (איור 6.5). איתור מוטציה אצל חשוד כנשא באמצעות RT-PCR מצריך מידע על הגן הנבחן לצורך הכנת תחלים. לאחר ההגברה קובעים את רצף ה-DNA שמקורו בגן הנבחן. המידע המתקבל מפרטים שונים מאפשר לאפיין את מגוון המוטציות שקיימות באוכלוסייה. מידע זה מייצל את תהליך איתורן של מוטציות בעלות אופי ידוע בפרטים חדשים (ראו בהמשך).

## PCR במשפט וברפואה

כמעט מהיום שבו הומצא, יצא השימוש ב-PCR אל מחוץ לגבולות מעבדתו של המדען. זאת בעיקר בשל רגישותה הגבוהה של השיטה ומשום שאין היא מחייבת שימוש ב-DNA נקי ובכמויות גדולות. למעשה, די בכמות זעירה של DNA כמו זו הקיימת בכתמי דם, בטיפות רוק או בשורש של שיערה כדי להגביר DNA באמצעות PCR ולהפיק ממנו מידע. מידע זה עשוי, לדוגמה, לסלול את הדרך להפללת או לזיכוי השוד בביצוע פשע. די אף בתא בודד שנלקח מעובר בן שמונה תאים שנוצר בהפריית מבחנה, כדי לבדוק באמצעות PCR נוכחות גנים בעלי מוטציה בגנום העובר. מידע אבחוני זה יכול לסייע בקבלת ההחלטה אם להשתיל את העובר ברחמה של אישה. אלה הם רק מקצת היישומים שנמצאו ל-PCR.

## יישומים בזיהוי גנטי ופילי

המקום הוא זירת פשע שלאחר מאבק שאליה מגיעים חוקרים מהמעבדה לזיהוי פלילי. מה הן הבעיות שבפניהן ניצבים החוקרים? החוקרים אוספים שיערה חשודה. פעילות מאומצת מאפשרת להם לאתר חשודים בביצוע הפשע ומומחי הרפואה המשפטית לוקחים דגימת דם מכל אחד מהם. כעת אפשר להשוות בין ה-DNA שמקורו בשורש השיערה שנמצאה בזירת הפשע לבין ה-DNA שהופק מדמם של החשודים (יישום השוואתי). הנחת העבודה היא שלצד הדמיון ברצף ה-DNA של אנשים שונים, קיימים ב-DNA אי אילו רצפים המשתנים מפרט אחד למשנהו. מדובר בשונות טבעית שנוצרה במהלך הדורות שמאפייניה הם שינויים בלתי מזיקים ברצף שמוגדרים כ"פולימורפיזם" באוכלוסייה ("רב-צורתיות" של ה-DNA). איתור מהיר של השונות בין הרצפים אצל פרטים שונים והשוואתה למאפייני הרצף של הראיה המשפטית, הם הבסיס ליישומים בתחום החוק והמשפט. בפועל מתמקדים בשונות הקיימת בין פרטים ברצפים קצרים החוזרים זה בעקבות זה בסמיכות מקום וקרויים רצפים קצרים, נשנים ועוקבים, ובאנגלית Short Tandem Repeats ובקצרה **STR**. ה-STR הם רצפים עם כמה עשרות או מאות בסיסים המצויים בחלק הארי של הגנום שאינו מקודד לחלבונים. מובאת כאן דוגמה של רצף מסוים, רצף שלשם המחשה מצוי בכרומוזום 13 של אדם מסוים (פרט a):

□ בפולימורפיזם נפוץ 1 מתוך כ-1200 בסיסים בגנום שונה מאדם אחד למשנהו. שונות כזו נקראת: SNP (Single Nucleotide Polymorphism). לרוב אין מתמקדים ברפואה משפטית בשונות מסוג זה.

CCG TAAATCCCT **AATCAATCAATCAATCAATCAATC** TTGGCATGA

רצף זה יכונה רצף א'. הרצף החוזר על עצמו הוא AATC. רצף ה-STR מודגש וזהו STR שבו  $n=6$ , כאשר  $n$  הוא מספר החזרות. רצף א' מצוי על כרומוזום 13 במיקום מסוים המוגדר על ידי הרצפים משני צדי הרצף החוזר על עצמו.

רצף ב' המצוי אף הוא באותו אדם אך בכרומוזום 13 השני שבתא, כלומר בכרומוזום ההומולוגי, נראה כך:

CCG TAAATCCCT **AATCAATCAATCAATC** TTGGCATGA

ל-PCR מגוון יישומים ברפואה, בזיהוי גנטי (קביעת אבהות, לדוגמה) ובזיהוי פלילי. בזיהוי גנטי ובכלל זה בזיהוי פלילי של פרטים נבחנים משתמשים ב-PCR כדי להגביר מקטעי DNA המכילים STR. הם רצפים קצרים, נשנים ועוקבים כמודגם בעמוד זה לגבי הרצף החוזר AATC.

ה-STR מודגש והוא מאותו טיפוס של ה-STR המצוי ברצף א' אבל  $n=4$ . ברצף ב', מימין ומשמאל ל-STR קיימת זהות לרצף א'. בשל הדמיון בין רצף א' לרצף ב' ובשל העובדה שהם נמצאים באותו מקום על כרומוזומים הומולוגיים, רצפים א' ו-ב' הם אלליים (רצף א' יוגדר כאלל 1 ורצף ב' יוגדר כאלל 2).

**אללים** מוגדרים כגרסאות חלופיות של מקטע DNA או גן. ניתן לראות באלל "גרסה של DNA". בתא לכל גן שני אללים (שתי גרסאות) הממוקמים בכל אחד משני כרומוזומים הומולוגיים (דומים). אחד מהכרומוזומים התקבל מהאב והאחר מהאם. באותו אופן גם ל-DNA אחר בתא, כולל DNA שבו STR, יש שני אללים (גרסאות) הממוקמים בכל אחד מהכרומוזומים הומולוגיים. ברוב המקרים יש שוני קל בין שני האללים של גן או בין אללים של DNA אחר בתא. למקטע DNA או גן מסוים ייתכנו באוכלוסייה אללים רבים.

מובאים כאן רצפים ג' ו-ד' מאדם אחר (פרט b) המצויים אף הם בכרומוזום 13 ובאותו מיקום:

רצף ג':

CCGTAAATCCCTAATCAATCAATCTTGGCATGA

רצף ד':

CCGTAAATCCCTAATCAATCAATCAATCTTGGCATGA

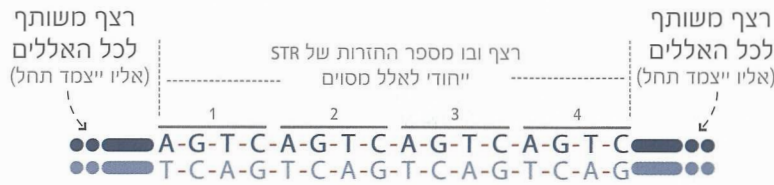
רצפים ג' ו-ד' בפרט b מוגדרים שני אללים נוספים (אללים 3 ו-4). ואכן, לגבי STR מסוים ייתכנו באוכלוסייה אללים רבים!

המטרה בזיהוי גנטי של פרט נבחן היא לנצל את ה-PCR לאפיון סוג האללים של STR שיש לפרט הנבחן. בזיהוי פלילי מאפיינים אללים של STR אצל חשוד ומשווים תוצאת אפיון זו ל-STR שבראיה משפטית. השוואה זו היא הבסיס להסקת מסקנות משפטיות. כיצד כל זה מתבצע? כמותואר באיור 6.4, תהליך זיהוי פרט נבחן על פי האללים של STR שלו מורכב מ-3 שלבים עיקריים. ראשית, יש להגדיר סוג ה-STR שבו רוצים להתמקד ולדעת את זהות הרצפים משני צדי הרצף החוזר על עצמו (6.4א'). שנית, יש לבצע הגברה של מקטע המכיל STR וזאת באמצעות PCR (6.4ב') ולבסוף לבחון את תוצרי ה-PCR בג'ל (6.4ג'). בזיהוי פלילי חוקרים את דגם תוצרי ה-PCR שהתקבל בג'ל באמצעות השוואה בין דגם פסים שמקורו ב-DNA של פרטים נבחים (חשודים) לבין דגם הפסים שמקורו בראיה המשפטית.

להרחבה וסיכום, הפעולות המתבקשות לאפיון גנטי של פרטים (ולא רק חשודים בביצוע פשעים) באמצעות אפיון STR הן אלה (היעזרו באיור 6.4):

1. תכנון וסינתזה כימית של תחלים שנגזרים מהאזורים שמשני צדי ה-STR. לדוגמה, כדי לאפשר קבלת מקטע DNA בגודל מינימלי של 150 נוקלאוטידים, יש לייצר תחל אחד על פי רצף המצוי כ-75 בסיסים מימין ל-STR ותחל אחר על פי רצף המצוי כ-75 משמאל ל-STR.

**א. מונון האללים של STR מטיפוס AGTC באוכלוסיית פרטים (מערך דמויני להמחשה בלבד)**



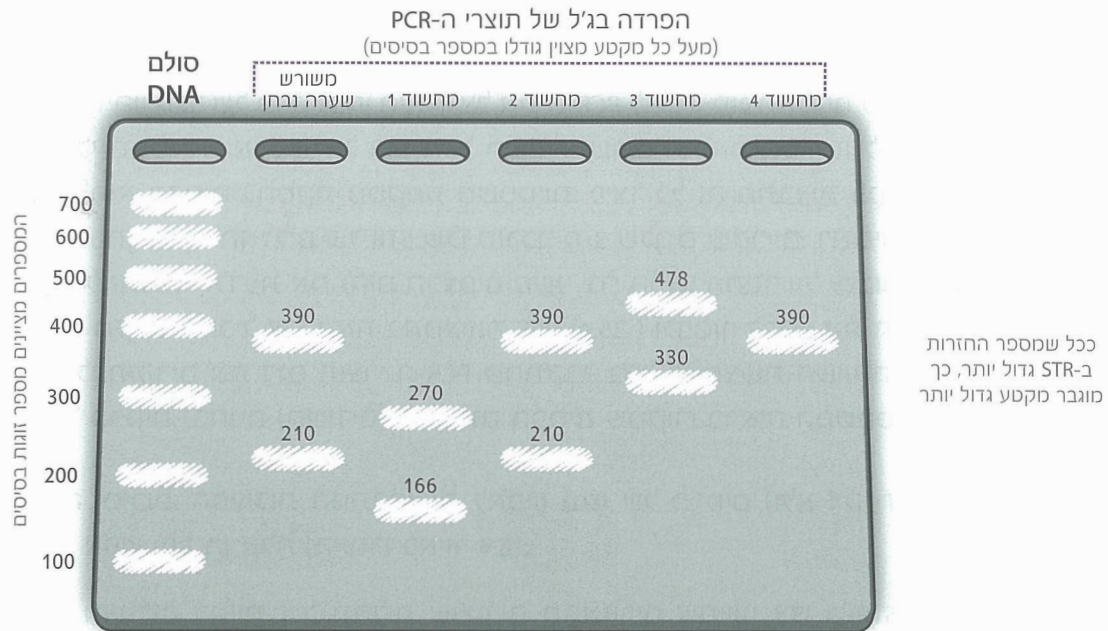
**אלל 1:**  
STR מטיפוס AGTC (הרצף החוזר)  
n=4 (הרצף חוזר 4 פעמים במיקום הספציפי בגנום)

- אלל 6: n=82
- אלל 5: n=60
- אלל 4: n=45
- אלל 3: n=30
- אלל 2: n=15

**ב. מערך ניסוי לזיהוי פרטים על פי סוג ה-STR שלהם**



**ג. תוצאות מבחן STR השוואתי לפרטים השוואתי ולראיה משפטית**



**איור 6.4: הגברה של מקטעי DNA מכילי STR לצרכים של זיהוי פלילי.**

כל פרט הוא בעל שני אללים (זהים או שונים) של STR מטיפוס מסוים מתוך מספר אללים אפשריים. כדי לאפיין גנטית פרט מסוים, יש צורך להגביר את האללים של STR מסוים ולהשוות את דגם הפסים שהתקבל בג'ל לדגם הפסים שמקורו בראיה המשפטית.

איור 6.4 מדגים זיהוי גנטי באמצעות PCR של מקטעי DNA המכילים STR. מפרטים שונים עשויים להתקבל מקטעי DNA בעלי גדלים שונים בשל מספר שונה של חזרות של STR. ראיה משפטית (שארית רוק, כתם דם או שערה) משמשת אף היא להגברה של מקטעי DNA מכילי STR. בזיהוי הפלילי משווים את גודלם של מקטעי ה-DNA שמקורם בחשודים לגודלם של מקטעי ה-DNA שמקורם בראיה המשפטית.

2. ביצוע תגובות PCR נפרדות ובהן דגימות DNA מכל אחד מהפרטים הנבחנים; במקרה של זיהוי משפטי גם תגובת PCR ובה DNA מהראיה המשפטית.
3. הפרדה בג'ל של תוצרי ה-PCR שהתקבלו לאחר שלב ב'. אם נערך מבחן לסוג אחד בלבד של STR, מתקבלים שני תוצרי DNA עיקריים (הנראים בג'ל כשני פסים), אחד מכל אלל, או תוצר אחד כאשר שני האללים זהים. ככל שמקטע DNA מסוים שהתקבל גדול יותר - פירושו שיש בו יותר חזרות של STR.
4. השוואה בין גדלים של תוצרי PCR שמקורם בפרטים הנבחנים השונים (השוואת דגם הפסים). בזיהוי פלילי משווים את התוצרים מפרטים חשודים לתוצרים שהתקבלו מהראיה המשפטית.
5. הסקה של מסקנות משפטיות או אחרות.

## שאלה 6.6

למרות העוצמתיות של ה-PCR ישנם מצבים שבהם ההגברה אינה אוכטימלית. אילו מהגורמים הבאים עלולים להפחית את מספר העותקים של ה-DNA הרצוי שעשוי להתקבל באמצעות PCR?

1. DNA המקור נלקח ממומיה כבת 2500 שנה.
2. מקטע ה-DNA הרצוי להגברה הוא כבן 15,000 בסיסים.
3. למבחנה הוכנסו יוני מוגנזיום בכמות כפולה מזו הנחוצה לפולימראז לשכפול המקטע הרצוי.
4. התחלים שבשימוש יכולים להיצמד היצמדות לא מלאה למספר אתרים ב-DNA המקור.

נמקו את תשובותיכם.

## שאלה 6.7

מי ביצע את הפשע? באיור 6.4 מוצג מקרה פרטי ובו קיימים בכלל האוכלוסייה 6 אללים שבהם רצף ה-STR החוזר על עצמו הוא AGTC. מימין ומשמאל לרצף החוזר על עצמו קיימים רצפים ייחודיים זהים בקרב האללים השונים. לכל פרט (חשוד) שני אללים מתוך ששת האללים האפשריים, שיכולים להיות שונים זה מזה או זהים זה לזה. אתם מעוניינים להגביר מקטעי DNA שמקורם באללים בכל חשוד וכן להגביר DNA שמקורו באללים המצויים בשערה המשמשת כראיה המשפטית. לאחר השוואה מולקולרית זו ייתכן ויתאפשר לכם לקבוע מי ביצע את הפשע.

הניחו כי משתמשים בתחל שקצה 5' שלו מצוי 70 בסיסים משמאל למקבץ ה-STR ובתחל שקצה 5' שלו 80 בסיסים מימין למקבץ ה-STR.

קבעו לפי איור 6.4

1. מי מבין ארבעת החשודים בביצוע הפשע זכאי מכל אשמה?
2. קבעו על פי גודל המקטע שהתקבל מכל חשוד כמה חזרות של רצף ה-STR מהטיפוס AGTC יש בכל אחד מהאללים שלו.

התשובה שלכם לשאלה 6.7 זיכתה 3 מבין החשודים מכל אשמה. החשוד שהאשמה הוטלה עליו טען כי למרות ממצאי הבדיקה הגנטית הוא חף מפשע, ואף נקב בשמו של חשוד נוסף שטרם נעצר. כשנערכה בדיקת ה-STR גם לחשוד הנוסף, התגלה כי דגם ה-STR שלו זהה אף הוא ל-STR של הראיה המשפטית. על פי מידע זה שמקורו בטיפוס אחד בלבד של STR לא ניתן היה לקבוע מי משני החשודים אשם בביצוע הפשע. השופט רגז מאוד על אנשי המעבדה לזיהוי פלילי על שהסתפקו במבחן ל-STR מטיפוס אחד בלבד בגנום, והורה לערוך לשני החשודים מבחן השוואתי חוזר של 3 טיפוסים שונים ב-3 אתרים שונים בגנום.

בהנחה שכל פרט הוא הטרוזיגוט (בעל שני אללים שונים, שלא כהומוזיגוט שיש לו שני אללים זהים) בכל אחד משלושת ה-STR ובהנחה כי מטעינים באותה באר בג'ל את תוצרי ההגברה של שלושת ה-STR של פרט מסוים, כמה פסים רלוונטיים של DNA יתקבלו בכל עמודת ג'ל טיפוסית שבה DNA של חשוד?

ציירו סכמטית את תוצאות המבחן ההשוואתי של שני החשודים ושל הראיה המשפטית, מבחן שעל פיו הופלל החשוד הנוסף וזוכה החשוד המערער. על המבחן ההשוואתי לכלול מידע מ-3 אתרי STR.

### יישומים בתחום הרפואי

היישומים בתחום הרפואי נחלקים לשניים: זיהוי בתחום המחלות הזיהומיות וזיהוי בתחום המחלות הגנטיות. בתחום המחלות הזיהומיות העיקרון המנחה הוא לזהות באמצעות PCR וירוס ספציפי או חיידק ספציפי מחולל מחלה. אצל חולים, לדוגמה, משתדלים לזהות מהו הגורם שאחראי למחלה. לעומת זאת כשקיים חשד לגבי מזון מקולקל, מנסים לזהות גורמי מחלה במזון - באמצעות PCR, כדי לדעת אם יש להימנע משימוש במזון. לצורך כך משתמשים בתחלים ספציפיים למחולל מחלה אפשרי בניסיון להגביר DNA באמצעות PCR שיעיד על קיום מחולל מחלה. האבחון בצורה זו הוא מהיר ועשוי להשפיע על סוג הטיפול שיינתן לחולה. אחת הדוגמאות מתייחסת לאיתור נשאים של וירוס ה-HIV, הוירוס המחולל איידס. ניתן לקחת דגימת דם של הנבדק ולקיים תגובת RT-PCR באמצעות תחלים המשלימים רצפים והנמצאים רק בוירוס ה-HIV. DNA תוצר PCR יתקבל רק אם בדמו של הנבדק קיים וירוס ה-HIV.

□ בהרבה מקרים מקובל לקיים מבחן אימונולוגי להימצאות נוגדנים כנגד וירוס ה-HIV בדמם של נבדקים. נוכחות נוגדנים בדם מעידה על קיום הוירוס. מאידך, לעתים מעדיפים אבחון באמצעות PCR על פני אבחון אימונולוגי מכיוון שמבחן אימונולוגי ל-HIV אינו ישים בחודשים הראשונים לאחר ההדבקה, שכן המערכת האימונית לא הספיקה לייצר נוגדנים. יתרה מכך, כיום ידועים עשרות זנים של וירוס ה-HIV שתורפות מסוימות יעילות כנגד אחדים מהם אך לא כנגד אחרים. הזנים השונים נבדלים ברצף ה-RNA שלהם, ולכן ניתן להשתמש בתחלים שנועדו לזהות קיומו של זן זה או אחר. לפיכך, RT-PCR יכול לשמש לאבחון זן ה-HIV המצוי בדמו של נבדק ולאפשר התאמת תרופה מסוימת לחולה הנבדק.

בתחום המחלות הגנטיות שמור ל-PCR תפקיד חשוב בבדיקה גנטית-רפואית של פרטים. היישום נועד לאפשר לדעת אם פרט מסוים הוא נשא של מוטציה המעורבת במחלה תורשתית, אם הורה הורישי לצאצאיו עותק מוטנטי של גן ואם העובר עתיד לחלות בשל "מוטציות שקיבל מהוריו". מובן שהמבחנים הגנטיים מתבססים על מידע מוקדם המשתנה ממחלה למחלה.



## אבחון גנטי באמצעות "הגברה מותנית מוטציות"

מה הם הנתונים והשיטות העומדות לרשות המאבחנים הגנטיים? נתמקד במקרה הפרטי של מחלת הסיסטיק פיברוזיס (Cystic Fibrosis: CF), לייפית כסייתית. החולים במחלה סובלים מהפרשות ריריות בדרכי הנשימה ומקשיי נשימה. המחלה מתאפיינת בכך שהיא מתפתחת אצל אלה שיש להם מוטציה בכל אחד משני האללים (מחלה רצסיבית) של גן הקרוי **CFTR**. נמצא כי בכל אחד משני האללים אצל

□ סיסטיק פיברוזיס היא אחת המחלות הגנטיות הנפוצות ביותר ובאוקלוסיות מסוימות כ-1 מ-2,500 אנשים חולה במחלה. הורשת המחלה היא בדגם רצסיבי: המחלה מתקיימת אצל אלה שיש להם מוטציה בכל אחד משני האללים של הגן המעורב במחלה. הגן **CFTR** המעורב במחלה מקודד לחלבון ה-**CFTR** הממוקם בקרום התא. חלבון ה-**CFTR** אחראי על מעבר יוני כלוריד וחשוב לתפקודם התקין של התאים. העדר של צורה תקינה שלו משבשת במיוחד את תפקודם של תאים המרפדים את צינורות הריאה. משום כך מצטברת שכבת ליחה עבה בריאות של חולי סיסטיק פיברוזיס הסובלים בשל כך מקשיי נשימה. בנוכחות הליחה מתרבים בקלות חיידקים דבר שגורם לזיהומים תכופים בריאה.

החולים במחלה יש מוטציה נקודתית (מוטציה נקודתית פירושה הבדל של בסיס אחד בין אלל לא תקין לאלל תקין). מוטציה כזו אחראית ליצירת חלבון **CFTR** סגום. לאחר שנים רבות של מחקר שבמהלכן נבדקו מאות חולים, אותרו באוקלוסייה 29 סוגים של מוטציות נקודתיות בגן זה. כך לכל נשא של המחלה - שהוא בעצם בריא מהבחינה הקלינית - יש באלל של הגן ל-**CFTR** אחת מ-29 מוטציות מאופיינות אפשריות. האלל השני תקין אצל מי שמוגדר נשא. יעוץ גנטי יעיל הוא כזה שמסוגל לקבוע אם אחד מבני הזוג הוא נשא של אלל מוטנטי. אם שני בני הזוג הם נשאים, על היעוץ הגנטי ליעוץ לבני הזוג לערוך בדיקה גנטית לעובר בשלבי ההיריון המוקדמים. במסגרת הבדיקה

ייערך מבחן לייטכנות שני אללים מוטנטיים בעובר. במקרים שבהם תוצאת מבחן זה חיובית, נהוג לשקול הפסקת היריון.

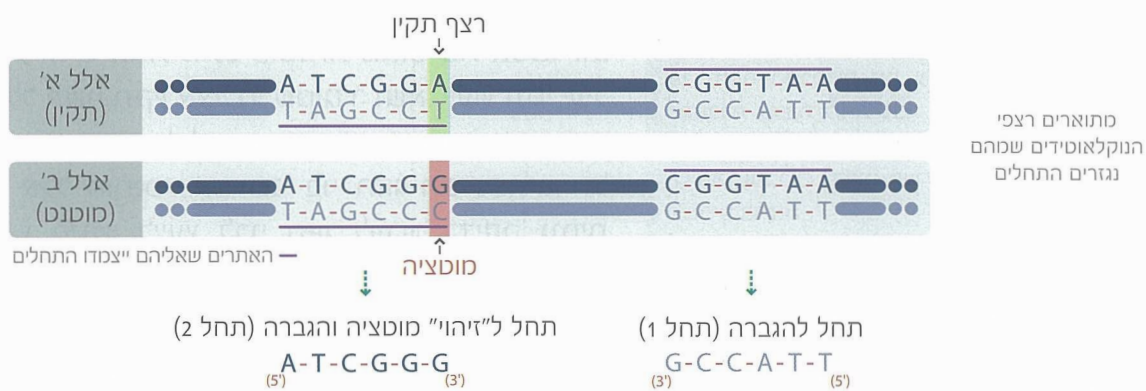
מה הם ההיבטים הטכניים לעריכת מבחן לייטכנות מוטציה באללים של הגן המעורב בסיסטיק פיברוזיס? נתמקד כאן באחת השיטות המהירות העושה שימוש ב-PCR ושפותחה לזיהוי מוטציות נקודתיות בעלות אופי ידוע מראש באתרים ספציפיים. שיטה זו מאפשרת את הגברת ה-DNA רק במקרים שבהם יש מוטציה. הגברה זו נקראת בשם **הגברה מותנית מוטציות**. סיכום עקרונות השיטה מובא באיור 6.5. לצורך ההגברה המותנית משתמשים בתחל מיוחד בעל רצף שקיים באלל המוטנט. כך משתמשים בתחל שבקצה '3 שלו מצוי הבסיס הייחודי למוטנט. התחל האחר נגזר מרצף תקין, וההגדרה של רצף תקין היא רצף שמעולם לא אופיינה בו מוטציה אצל חולים במחלה. בדוגמה שבאיור 6.5, לפרט הנבחן אלל תקין ביחס למוטציה הנבדקת ואלל מוטנטי. הפרט הוא אם כן "נשא". תוצר PCR יתקבל רק מ-DNA שמקורו באלל המוטנטי, שכן למרות שהתחל שנועד לזהות אלל מוטנטי יעבור היצמדות גם לאלל התקין, היצמדות זו לא תהיה מלאה וה-DNA פולימראז לא יוכל "לתפוס" את קצה '3 של התחל ולהאריכו, וזאת מכיוון שקצה חשוב זה אינו נצמד לגדיל ה-DNA (איור 6.5).

מה צריך לעשות על פי השיטה הנ"ל כדי לענות לשאלה: האם אדם מסוים נושא אלל מוטנט, כלומר הוא נשא של מחלת הסיסטיק פיברוזיס? בשיטה להגברה מותנית מוטציות יש להשתמש ב-29 זוגות תחלים שכל אחד מהם נועד לבחון ייתכנות מוטציה מסוימת באתר מסוים. אך האם יש לבצע 29 תגובות PCR נפרדות כשמשתמשים ב-DNA שהופק מפרט מסוים? התשובה לכך היא לא. ניתן בהחלט להכניס לתוך מבחנה אחת יותר מזוג אחד של תחלים שנועדו לזהות מוטציה ובמקרה שכזה נקרא

ה-PCR בשם **Multiplex PCR** שעשוי לאפשר הגברה בו זמנית של יותר ממקטע DNA אחד במבחנה אחת). לאבחון ייתכנות של מוטציה ב-CFTR משתמשים ב-4 תגובות (ב-4 מבחנות). בכל מבחנה יש תת-קבוצה של 29 זוגות התחלים (לדוגמה, 7 זוגות תחלים שנועדו לזהות ייתכנות של אחת מ-7 מוטציות אפשריות שונות במבחנה אחת, 8 זוגות כאלה במבחנה שנייה וכו').

בהיעדר תוצרי הגברה של פרט מסוים ייחשב הפרט בריא שאינו נשא. אולם תוצאה זו מוטלת בספק כל עוד אין מידע ודאי שה-PCR "עבד" כנדרש, כלומר, שהיה מספיק DNA מהפרט הנבדק, שהאנזים היה תקין וכו'. כדי לוודא תקינות ה-PCR מבצעים ביקורת חיובית. מכניסים לכל מבחנה זוג תחלים האמורים להגביר מקטע, בין אם האלל מוטנטי ובין אם הוא תקין, שכן לקבלת מקטע שכזה משתמשים בתחלים שנגזרו מאזורים שבהם מעולם לא אובחנה מוטציה.

**א. אלל תקין ואלל מוטנטי בפרט נבחן**



מבצעים PCR עם תחלים א' ו-ב'

**ב. PCR לאיתור מוטציה מסוימת**



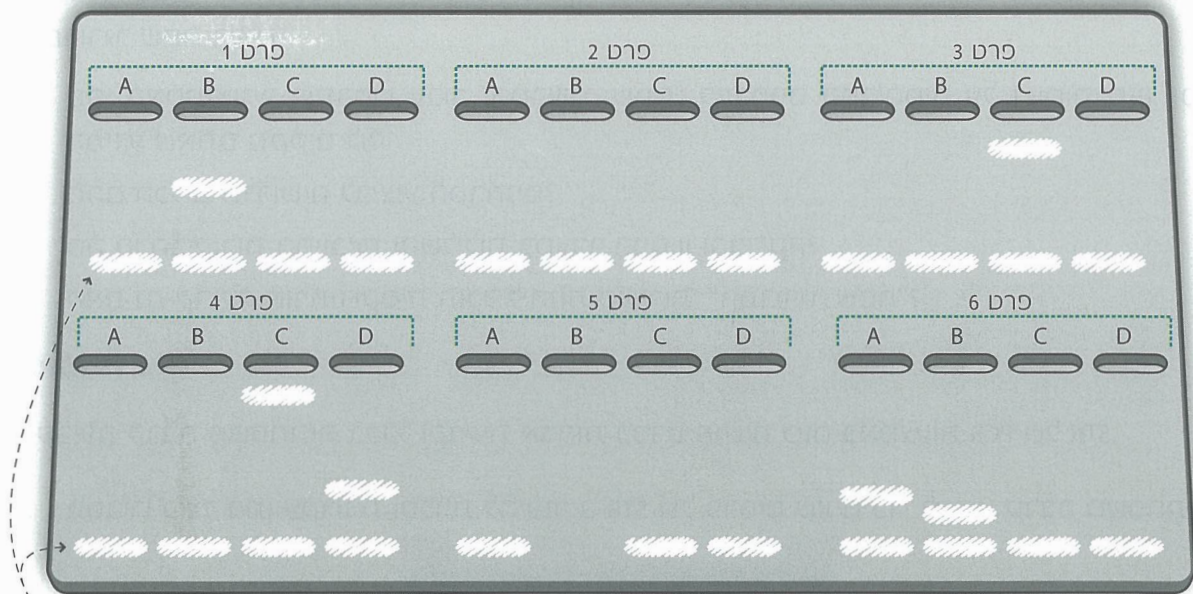
**איור 6.5: זיהוי מוטציות אפשריות באמצעות PCR שנועד להגברה מותנית בנוכחות מוטציות.**

השיטה להגברה המותנית בנוכחות מוטציות מאפשרת להגביר DNA באמצעות PCR רק אם ה-DNA מכיל מוטציה שחושדים בקיומה. לצורך כך משתמשים בתחל שבקצה 3' שלו בסיס משלים לבסיס באלל המוטנטי. המשך האיור בעמוד הבא.

כמתואר באיור 6.5, הגברה מותנית מוטציות מאפשרת לקבל תוצר PCR רק אם פרט מסוים הוא נשא למוטציה הנבדקת. הגברה כזו מצריכה תחלים מיוחדים שבהם רצף המצוי רק באלל המוטנטי. להגברה מותנית לאבחון נשאי מוטציות ב-CFTR משתמשים ב-29 זוגות תחלים שונים המחולקים בין 4 מבחנות שונות. תוצר הגברה מותנית בג'ל מעיד על קיומה של מוטציה (איור 6.5).

כך לכל פרט נבחן מפרידים בג'ל את תוצרי ה-PCR בארבעה טורי הפרדה. בכל טור הפרדה בג'ל יש למצוא לפחות פס DNA אחד, תוצר ה-PCR שנועד לביקורת ושלא נועד לזהות מוטציה. פס DNA נוסף תוצר ה-PCR המתגלה בטור הפרדה כלשהו, משמש עדות לקיומה של מוטציה מסוימת באחד מהאללים. התחלים שבאותה מבחנה, ושנועדו לזהות מוטציה תוכננו כך שכל זוג תחלים יאפשר קבלת מקטע DNA ייחודי בגודל מסוים. למקטע שכזה, המייצג מוטציה ספציפית, מרחק נדידה ייחודי בג'ל. על פי מרחק הנדידה של תוצר ה-PCR ניתן להסיק את אופי המוטציה.

### ג. תוצרי PCR שנגזרים מהגן המקודד ל-CFTR ושמוקדם בהגברה ובהגברה מותנית מוטציות



מייצג מקטע DNA תוצר הגברת ביקורת

### איור 6.5 המשך: זיהוי מוטציות אפשריות בגן המקודד ל-CFTR אצל פרטים שונים באמצעות הגברה מותנית.

DNA מפרטים שונים הופק לצורך זיהוי מוטציות אפשריות בגן המקודד ל-CFTR. ארבע מנות DNA מפרט נבחן שמשו להגברה באמצעות PCR ב-4 מבחנות שונות. לכל מבחנת PCR (A, B, C, D) הוכנסו 8-9 זוגות תחלים לכל מטרות: להגברת ביקורת ולהגברה תלוית מוטציות. לשם כך נעשה שימוש בזוג אחד של תחלים המאפשר קבלת מקטע DNA ללא קשר לנוכחות מוטציה (הגברת ביקורת). שאר זוגות התחלים שבמבחנה (7-8) הם ייחודיים ואינם נמצאים במבחנות אחרות. הם נועדו לאפשר הגברה רק אם יש מוטציה מתוך 7 או 8 מוטציות שאת נוכחותן בוחנים במבחנה אחת. PCR בנוכחות יותר מזוג תחלים אחד נקרא Multiplex PCR. תוצרי ה-PCR מופרדים בג'ל כמתואר באיור. מערך מיוחד זה של 4 תגובות Multiplex PCR במקביל נועד לבחון אם פרטים שונים נושאים אחת או שתי מוטציות (מסוימות) ב-CFTR מתוך 29 מוטציות שונות באוכלוסייה. לדוגמה, פרט 1 הוא בעל מוטציה באלל אחד כפי שניתן להסיק מקיום תוצר הגברה מותנית במבחנה B.

## שאלה 6.9

מבחן לייתכנות מוטציה באללים של הגן המעורב בסיסטיק פיברוזיס נערך בקרב מספר אנשים. טכנאי המעבדה השתמשו בתחלים שנועדו לזהות מוטציות ואפשרו הגברה באמצעות PCR. היעזרו באיור 6.5 כדי לסווג את הפרטים הנבדקים לבריאים, לנשאים ולחולים. כמה מוטציות שונות אותרו במבחן שתוצאותיו מוצגות באיור זה?

## שאלה 6.10

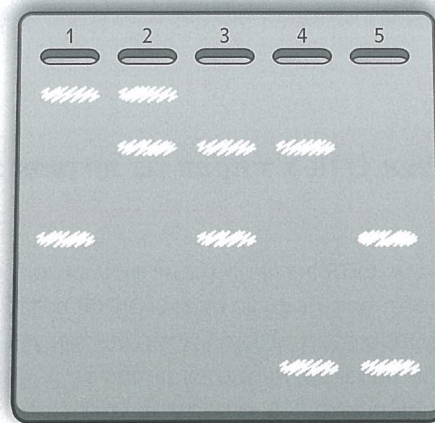
סיימתם את לימודיכם בהנדסה גנטית ואתם יוצאים לטיול באחת ממדינות דרום אמריקה. בפגישה שנזדמנה לכם עם אחד מראשיהן של קהילה יהודית מקומית הוא מתלונן שאנשי הקהילה נמנעים מאכילת המבורגרים במסעדות המקומיות בשל החשש שהוא מכיל בשר של חיות לא-כשרות. לאחר מחשבה קצרה אתם מציעים לראש הקהילה למסור לו מידע אמין ויומיומי על המקומות שבהם מוגש המבורגר מבשר חיות כשרות. הוא נענה בהתלהבות להצעתכם, ואתם ממהרים להקים את חברת "המבורגר שמח בע"מ".

1. מהי האסטרטגיה שתבחרו עבור "המבורגר שמח" למבחנים המבוססים על דגימות מזון, ומהו המידע שאתם נזקקים לו?
2. מהם הכלים הדרושים לביצוע המבחנים?
3. מה הן הביקורות החיוביות והשליליות במערך הניסיון והבדיקה?
4. האם גם קהילה אורתודוקסית תוכל ליהנות משירותי "המבורגר שמח"?

## שאלה 6.11

קביעת קרבה משפחתית בכלל וקביעת אבהות בפרט נעשית כיום באמצעות PCR של STR.

1. הסבירו כיצד ניתן עקרונית וטכנית להיעזר ב-STR של פרטים שונים כדי לקבוע קרבה משפחתית.



איור ש'-6.11: ג'ל ובו מקטעי DNA תוצרי PCR המכילים STR.

2. באיור ש'-6.11 מתוארת תוצאת הבדיקה של STR מסוים במשפחה מסוימת. האיור מתאר ג'ל ובו מקטעי DNA שהתקבלו לאחר הגברת DNA באמצעות PCR. באיור רואים תוצאת מבחן STR שנערך לאם וארבעת ילדיה. באילו עמודות מיוצגים אללים של הילדים ובאיזו עמודה מיוצגים האללים של האם? הסבירו.
3. ציירו לצד איור ש'-6.11 עמודה ובה ייוצגו האללים שיתקבלו ב-PCR של STR שנערך אגב שימוש ב-DNA מהאב. הסבירו כיצד קבעתם זאת.

### שאלה 6.12:

ישנם הורים שאלל של גן מסוים בהם לוקה במוטציה ("אלל מוטנטי, אלל פגום"). אם אלל שכזה נכלל בתא הזרע ו/או בתא הביצית, הוא עלול להכתיב במקרים מסוימים מחלה בצאצא. כיום ניתן להימנע בחלק מהמקרים מלידת תינוקות חולים וזאת בעזרת הפריית מבחנה ובדיקה באמצעות PCR. ואכן ניתן לבצע הפריית מבחנה שבעקבותיה נקבל במבחנה עובר בן 8 תאים. ניתן להסיר מעובר זה תא אחד לצורך הגברה באמצעות PCR לאיתור מוטציות ולהחליט על פי התוצאות אם להשריש את העובר בן שבעת התאים ברחם. יש להבהיר כי במצב זה הקטר בתא אחד אינו מפריע להתפתחות העוברית. מכאן עולה כי אם לאם בריאה יש אלל פגום של גן מסוים על אחד מכרומוזומי ה-X שלה, מומלץ לערוך בדיקה של מין העובר, מכיוון שאם העובר הוא זכר (XY), ייוולד תינוק חולה. את בדיקת מין העובר רצוי לערוך מוקדם ככל האפשר, ואפשר גם לאחר הפריית מבחנה ולפני השרשת העובר ברחם. עושים זאת באמצעות PCR העושה שימוש בתחלים שנגזרים מרצפים ייחודיים הנמצאים רק על כרומוזום Y. כך ניתן לזהות את העוברים הזכרים, שבמקרה פרטי זה עתידים לפתח מחלה. על מחלה כזו נהוג לומר שהיא בתאחיזה לכרומוזום ה-X.

1. ציינו את המידע והחומרים הייחודיים הנחוצים לבדיקה המיועדת לאיתור העוברים, שיש להם פוטנציאל לפתח מחלה שהיא בתאחיזה לכרומוזום X.
2. מה הם השלבים למבחן התכנות מוטציה בתאחיזה לכרומוזום X בעובר בן 8 תאים שנוצר מביצית של אם נשאית? במילים אחרות, מה הם השלבים לזיהוי עובר בן שמונה תאים ממין זכר?
3. אב לשמונה בנות מאוד רוצה בבן – האם תספקו לו שירות אבחון מין טרום השרשתי להבטחת לידת בן? העלו שיקולים רפואיים, מוסריים וכסיכולוגיים (...) בעד ונגד אבחון מסוג זה.



## עיקרי הפרק

## עקרונות

- שכפול חוזר ונשנה במבחנה
- שיבוט במבחנה ללא צורך בספריות
- היצמדות תחלים תלוית השלמה בין בסיסים

## שמות ומונחים

- STR
- Multiplex PCR
- וירוס ה-HIV מחולל האיידס
- מחלת הסיסטיק פיברוזיס
- הגן CFTR

## יישומים

- שיבוט באמצעות PCR במהירות ובפשטות
- PCR לשיבוט מחדש לאיתור מוטציות
- PCR לשיבוט לצורך ביטוי חלבון
- PCR לאפיון איכות וכמות RNA
- PCR של STR לאבחון גנטי ובכלל זה זיהוי פלילי
- PCR לזיהוי גורמי מחלה ספציפיים
- PCR לזיהוי מהיר של מוטציות טיפוסיות באמצעות הגברה מותנית מוטציות (ARMS - Amplification Refractory Mutation System)
- PCR לאבחון גנטי של עוברים לפני ההרשה ברחם

## כלים ב"ארגז הכלים"

- DNA פולימראז עמיד לחום
- אוליגו-נוקלאוטידים המשמשים כתחלים
- DNA
- מכשיר PCR

## תהליכים ושיטות

- הפרדת גדילים
- היצמדות תחלים
- סינתזת DNA על ידי ה-DNA פולימראז
- שלושת שלבי מחזור שכפול
- PCR
- התהליך הדו-שלבי RT-PCR
- הגברה תלוית מוטציות

## חומרים

- נוקלאוטידים
- יוני מגנזיום ובופר

## מושגים

- מחזור שכפול
- הגברה (Amplification)
- אלל (Allele)
- נשא (של אלל פגום)



חשיפת תאים לקרינת השמש גורמת לתגובות מולקולריות תוך-תאיות. כך, בעקבות הקרינה נוצר בתא אות (Signal) ראשוני, הסולח להפעלה של גורמי תעתוק. גורמי התעתוק הרלוונטיים סופרים לתא לייצר RNA וחלבונים מסוימים הנחוצים לתא להתמודדות עם המצב החדש שבו הוא נתון. שינוי זה בביטוי גנים עשוי במקרים מסוימים לאפשר הגנה מפני נזקי קרינה. לעומת זאת, אם התא ניזוק באופן ניכר, עולה הביטוי של גנים אחרים אשר תוצריהם גורמים למוות של התא.

שיבוט של גן הוא שלב הכרחי כדי לשייך לגן תפקיד או תפקידים. לעתים תהליכי האיתור של תפקידי הגן הם ארוכים. בפרק 5 הודגם כיצד מקובל כיום להתחיל בביצוע תהליכים להגדרת תפקידי הגן. כאמור שם, אם נמצא דמיון בין חלק מרצף הגן המשובט לחלק מרצף גן אחר בעל תפקיד ידוע, ניתן לעתים לשער את מקצת תפקידיו של הגן הנחקר. כמו כן מוטציות בגן האחראיות לשינוי בתא ובאורגניזם, כמו במקרה של הגן המעורב בסיסטיק פיברוזיס, תורמות אף הן להבנת תפקידי הגן. אולם בגנים רבים לא אותו מוטציות הגורמות למחלה, והשוואת הרצף שלהם לזה של אחרים אינה מסייעת בחיזוי תפקידיהם האפשריים. במקרים כאלה חשוב להיעזר באפיון ביטוי הגן כדי לנסות לשייך לגן תפקיד ראשוני.

אומרים על גן שהוא מתבטא כאשר נוצר ממנו RNA בתא. **ביטוי גן** מקודד לחלבון מוגדר כמצב שבו נוצרים בתא RNA וחלבון של הגן.

העניין הרב שמעורר האפיון של ביטוי גנים נובע מכך שהביטוי של גן עשוי להתקיים רק בחלק מהתאים של האורגניזם ולעתים רק בעיתוי מוגדר. לצורך אפיון ביטוי גן חשוב לחקור באילו תאים מתבטאים RNA וחלבון של הגן המסוים ולקבוע מתי או בתגובה למה מתבטא הגן. לבסוף שואלים באיזו עוצמה מתבטא הגן. מענה לשאלות אלה מאפשר להבין מקצת תפקידי הגן.

□ עוצמת הביטוי של גן מוגדרת ככמות היחסית של תוצר גן הנוצרת ברגע נתון בתא. עיתוי הביטוי של גן ועוצמת הביטוי עשויים להשתנות בתגובה לשינויים מסוימים בסביבת התא ובתוכו.

כך לדוגמה, במטרה להבין את תפקידיו של גן מסוים בצמחים נשאלה השאלה היכן הוא מתבטא: האם רק בשורשי הצמח או אולי גם בעלים? כמו כן התקיים מחקר בשאלה כיצד עשויה להשתנות עוצמת הביטוי של הגן בתנאי יובש בהשוואה למצב שבו אין מחסור במים (שאלת עיתוי הביטוי). כשנמצא שרמת הביטוי של הגן המסוים עולה בתנאי יובש, ניתן היה לשער כי הגן

מקודד לחלבון שתפקידיו מקנים לצמח עמידות ליובש. לגבי גן אחר מיונקים נשאלה השאלה אם הוא מתבטא רק בסוג מסוים של תאים (לדוגמה, אם ביטויו מוגבל לתאי דם, כבד או לבלב) וכן, אם ביטוי הגן עולה כשרמת הסוכר בסביבת התא עולה. באופן דומה, אם נמצא שגן מסוים מתבטא רק ברגע שהתאים מתחילים להתמייין לתאי שריר, קיימת סבירות גבוהה שיש לגן זה תפקיד בהתמיינות תאים לתאי שריר.

מהאמור כאן עולה כי אפיון ביטוי גן ובין היתר אפיון של מיקום, עיתוי ועוצמת הביטוי עשויים להקנות מידע בסיסי על תפקידו האפשריים של הגן בתא ובאורגניזם.

לפעמים במקום מידע מפורט על **גן אחד**, נדרש מידע השוואתי על **ביטוי גנים רבים** במקביל. לדוגמה, אם בוחנים תא סרטני מסוים, צריך לשאול: ביטויים של אילו גנים בתא הסרטני עלה או ירד בהשוואה לתא נורמלי? מידע השוואתי על שינוי בביטוי גנים רבים יכול ללמד משהו על התהליך הסרטני ועל הגנים שמעורבים בו. דוגמה נוספת, לוקחים תאים, חושפים אותם לקרינת UV (כזו המצויה בקרני השמש) ושואלים: מי הם הגנים שביטויים השתנה בעקבות החשיפה לקרינה? ניתן לשער כי חלק מהגנים שביטויים השתנה בעקבות קרינה, נחוצים לתא כדי להתמודד עם מצב העקה (Stress) שהתרחש לאחר החשיפה לקרינה. גן שביטוי בתא מותנה בחשיפה לקרינה עשוי להיות "גן חשוב", ומחקר אודותיו עשוי לתרום להבנת מנגנונים המקנים עמידות בפני קרינה. בעקבות מידע שמקורו באפיון מקביל של ביטוי גנים רבים, ניתן להתמקד בביטוי גן מסוים ולקיים מחקר נוסף שעשוי להביא למציאת רבים מתפקידיו הנוספים של הגן בתא ובאורגניזם (פרק 8).

פרק זה עוסק במחקר שנועד לאפיין ביטוי גנים. אפיון הביטוי מצריך הבנה של תהליכי בקרת ביטוי (פרק 1). בקצה, בקרה על ביטוי גן מסוים מכתובה כמה RNA, אם בכלל, ייווצר בתנאים מסוימים מהגן המסוים. מנגנוני בקרה נוספים מכתובים מה יעלה בגורל ה-RNA שנוצר ובמיוחד מה יהיה קצב פירוקו וכן אם החלבון שיווצר ישרוד זמן רב בתא או יפורק במהירות.

הפרק מדגיש את העקרונות והשיטות המשמשות לאפיון ביטוי גנים, כלומר את האופן שבו נקבעת הכמות היחסית של RNA וחלבון בתא מסוים ובמצב מסוים. הפרק ממחיש כי **ההנדסה הגנטית** חיונית לחקר בקרת הביטוי ולאפיון ביטוי גנים ותוצריהם, וכי לאפיון הביטוי עשויות להיות השלכות מחקריות, רפואיות וביוטכנולוגיות חשובות.

## אפיון ביטוי גנים ברמת ה-DNA

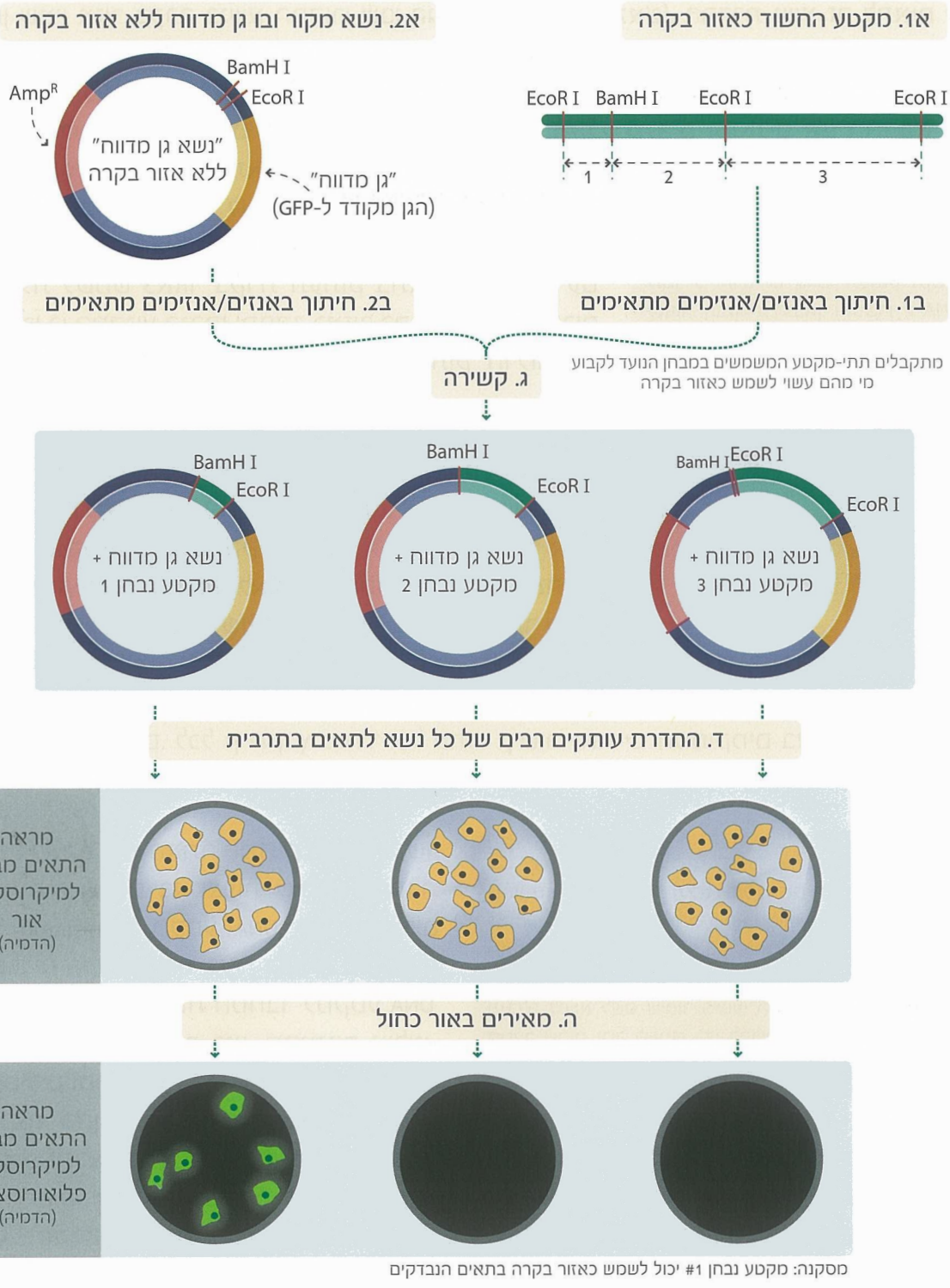
ביטוי גן מצריך תהליך רב-שלבי והתעתוק הוא השלב הראשון. לכל גן יש **אזור בקרה** ייחודי לו ובו אתרי קישור לגורמי תעתוק ייחודיים. קישור של גורם תעתוק ייחודי לאתר קישור מסוים באזור הבקרה של גן עשוי לאפשר את ביטויו, כלומר לאפשר תעתוק שלו שבעקבותיו נוצר RNA (פרק 1). גורם תעתוק ייחודי יכול להימצא רק בסוגים מסוימים של תאים ורק בעיתוי מסוים. נתונים אלה בעלי חשיבות לשאלות אם יתקיים תעתוק של הגן הנחקר וייווצר ממנו RNA ואם כן - באיזה תא ובאיזה עיתוי (שאלות היכן ומתי). כדי להבין למה, היכן ומתי מתבטא גן, יש לקבוע, בין היתר, את זהותם של גורמי התעתוק הנקשרים לאזור הבקרה של הגן. לשם כך יש קודם כול לקבוע היכן ב-DNA מתחיל אזור הבקרה והיכן הוא נגמר.

כדי להגדיר גבולות של אזור בקרה, משתמשים בשיטות של הנדסה גנטית לצורך שיבוט מקטעים קטנים מאזור החשוך כאזור בקרה. בשלב הבא שואלים איזה מבין המקטעים הקטנים מאזור הבקרה המשוער יכול לאפשר תעתוק של גן? למוענה ישיר לשאלה זו ניתן להשתמש בנשא שבו "גן מדווח" (Reporter gene). **גן מדווח** שנועד לאפיון ביטוי הוא גן ללא אזור בקרה משלו ותפקידו "לדווח" אם מקטע שמוקם בסמיכות לו מתפקד כאזור בקרה (איור 7.1). גן מדווח טיפוסי הוא מקטע ה-DNA המקודד לחלבון בעל יכולת להקנות צבע לתא שבו הוא מתבטא. גן מדווח לדוגמה הוא מקטע ה-DNA המקודד ל-GFP (Green Fluorescent Protein) ואם יתבטא ה-GFP בתא, יזהר התא הזה בצבע ירוק.

גורם תעתוק הוא חלבון הנקשר למקטע DNA בגן המתפקד כאזור בקרה. גורם תעתוק מאפשר ל-RNA פולימראז לתעתק את הגן (לייצר RNA שלו). כדי לקבוע איזה מאזורי הגן מתפקד כאזור בקרה, משתמשים במקטעים שונים מהגן ומשבצים כל אחד מהם בנפרד בנשא שבו **גן מדווח** (איור 7.1). אם מתקיים ביטוי הגן המדווח, מתקבל בתאים חלבון בעל צבע, ואז ניתן להגדיר את מקטע ה-DNA הנבחן כאזור בקרה (איור 7.1).







**איור 7.1: השימוש ב"גן מדווח" לאיתור מקטע DNA המשמש כאזור בקרה.**  
 "גן מדווח" מדווח על נוכחות אזור בקרה פעיל מכיוון שאזור הבקרה מאפשר תעתוק של הגן המדווח. לאחר התעתוק נוצר "חלבון זוהר" שאותו מקודד הגן המדווח. חלבון זה מקנה צבע ייחודי לתא. הגן המדווח באיור זה הוא מקטע DNA המקודד לחלבון GFP (Green Fluorescent Protein) שנוכחותו בתא גורמת לתאים שהוארו באור כחול לזהור בצבע ירוק.

מכיוון שאין אזור בקרה בנשא המקורי שבו הגן המדווח (איור 7.1א'), החדרת נשא זה לתאים לא תביא לביטוי הגן המדווח, ותאים אלה יוותרו חסרי צבע. כמתואר באיור 7.1, כדי לאתר מקטע DNA שעשוי לשמש כאזור בקרת תעתוק, ניתן לשבץ מקטעי DNA נבחנים לתוך הנשא המקורי בסמיכות לגן המדווח. בשלב הבא מחדירים כל פלסמיד רקומביננטי שהתקבל לתאים ושואלים אם התבטא הגן המדווח. אם הגן מתבטא והתאים זוהרים בצבע ירוק, אזי המקטע הנבחן אכן מתפקד כאזור בקרת תעתוק בתאים הנבדקים. לעומת זאת, אם אין הגן המדווח מתבטא והתאים נותרים חסרי צבע, הרי שהמקטע ששובץ הוא חסר יכולת לשמש כאזור בקרת תעתוק בתאים הנבחנים. עם זאת, ייתכן כי המקטע הנבחן יתפקד כאזור בקרה בתאים אחרים או בתנאים אחרים שבהם קיימים גורמי תעתוק הרלוונטיים לתפקודו.

□ במקרה של ביטוי הגן המדווח ניתן לומר כי גורם או גורמי תעתוק נקשרו לאזור הבקרה הנבחן ואפשרו ל-RNA פולימראז לייצר RNA של הגן המדווח.

□ חשוב להעריך כי אזורי בקרה מתפקדים רק בתאים מסוימים של האורגניזם. אחת הסיבות לכך היא כי לא בכל תא יש גורמי תעתוק הנחוצים לתפקוד אזור בקרה מסוים. לכן אפשר להבין כי אזור בקרה שמקומו בתא אדם לא יתפקד בתא חיידק ולהפך.

במקטע DNA המתפקד כאזור בקרה כמו מקטע נבחן 1 באיור 7.1 קיים גם מקטע קטן עוד יותר, המקטע שאליו נקשר גורם התעתוק והנקרא גם "אתר הקישור". כדי להגדיר מהו רצף אתר הקישור, בודקים אילו הם הנוקלאוטידים שהחלפה שלהם באחרים תגרום לאובדן יכולת הביטוי של הגן המדווח? כמודגם באיור 7.2א',

סביר להניח שנוקלאוטיד קריטי שכזה מהווה חלק מאתר קישור של גורם תעתוק. **אתר קישור** כזה לגורם תעתוק **ייחודי** הוא רצף DNA **ייחודי** של כ-6-20 נוקלאוטידים. ראוי לציין כי בתא טיפוסית יש מאות גורמי תעתוק ייחודיים. לכל גן מקבץ מוגדר של אתרי קישור ייחודיים הממוקמים באזור הבקרה שלו והקושרים גורמי תעתוק ייחודיים (ראו איור **ש-7.7**).

□ מייצרים מקהבר על-ידי צימוד שני אוליגו-נוקלאוטידים שסונתזו באופן כימי (ללא פולימראז) ואת זהות הרצף שמסונתז קובעים על פי הצרכים הניסיוניים הספציפיים. ככלל, מקהבר לצורכי הנדסה גנטית נועד להחדיר לתוך נשא רצף קצר רצוי במקום הרצוי. מקהברים משמשים גם לצורך הוספת אתרי הגבלה לנשא לשם שיפור ביצועי הנשא. נשא שלתוכו שובץ מחבר שכזה יכול לשמש כדי לקלוט DNA שבקצותיו אתרי הגבלה הנמצאים במחבר.

מקובל לאמת את האתר המדויק שאליו נקשר גורם תעתוק מסוים באמצעות שימוש במקהבר. **מקהבר** (linker) הוא מקטע DNA קצר שיוצרים משני אוליגו-נוקלאוטידים בעלי רצפים משלימים (איור 7.2). ניתן לקשור את המחבר למקטע DNA אחר. לצרכים המתוארים כאן, מסנתזים אוליגו-נוקלאוטידים ומרכיבים מהם מחבר שיש בו עותק של הרצף החשוד כמאפשר קישור של גורם

תעתוק. כמתואר באיור 7.2ב', משבצים מחבר שכזה ליד הגן המדווח המקודד ל-GFP. מחדירים את הנשא הרקומביננטי לתאים ובוחנים אם הרצף שסופק על ידי המחבר מאפשר הופעתו של צבע ירוק בתאים. במקרה שכן, מסיקים כי במחבר יש רצף DNA המשמש כאתר קישור לגורם תעתוק.

**אתר הקישור** לגורם תעתוק הוא רצף מסוים וקצר של נוקלאוטידים (6-20 נוקלאוטידים אורכו) שאליו נקשר גורם תעתוק **ייחודי**. באזור בקרה טיפוסית יש מספר רב של אתרי קישור לגורמי תעתוק שונים. כדי למצוא אתר קישור, נעזרים בתהליך לייצור מוטציות ב-DNA באזור שעשוי להיות אתר קישור (איור 7.2א') ובוחנים את ההשלכות של המוטציות על תפקוד מקטע ה-DNA.

**א. איתור הנוקלאוטידים ששייכים לאתר קישור של גורם תעתוק**

נוקלאוטיד שהחלפתו באחר משבשת פעילות אזור הבקרה



מקטע DNA המשמש כאזור בקרה פעיל

T-T-T-A-G-C-C-C  
A-A-A-T-C-G-G-G

מסיקים מה עשוי להיות אתר הקישור לגורם תעתוק: (צריך להוכיח)

**ב. הכנת סִתָּאִים ובו אתר הקישור המשוער וכן קצוות מדורגים EcoR I**

מסנתזים כימית שני אוליגו-נוקלאוטידים

קצה מדורג EcoR I

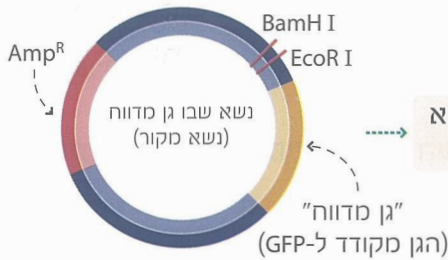
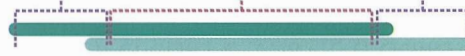
1: אוליגו-נוקלאוטיד :A-A-T-T-C-T-T-T-A-G-C-C-C-G

2: אוליגו-נוקלאוטיד :G-A-A-A-T-C-G-G-G-C-T-T-A-A

קצה מדורג EcoR I עותק של אתר קישור משוער

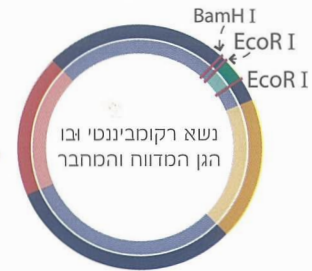
מאפשרים היצמדות האוליגו-נוקלאוטידים זה לזה ליצירת גדיל כפול

קצה מדורג EcoR I עותק של אתר קישור משוער קצה מדורג EcoR I



ג. חיתוך הנשא EcoR I-ב

ד. קשירה של הקוֹבֵר לנשא



**איור 7.2: אימות נוכחותו של אתר קישור לגורם תעתוק באמצעות שימוש במחבר מתאים בסמיכות ל"גן מדווח".**

א. כאשר חוקרים אזור בקרה מסוים, ניתן לגרום למוטציות בנוקלאוטידים שעל פי ההשערה הם חיוניים לקישור גורם תעתוק. כך ניתן להתחיל בתהליך שנועד לקבוע מהו האתר המדויק שאליו נקשר גורם תעתוק.

ב. כאשר רוצים לבדוק אם רצף מסוים עשוי לשמש אתר קישור לגורם תעתוק, ניתן לייצר מחבר מתאים ובו רצף אתר הקישור המשוער. בשלב הראשון משתמשים בשני אוליגו-נוקלאוטידים ליצירת מחבר. למחבר באיור זה קצוות דביקים של EcoR I המאפשרים שיבוץ בנשא עם הגן המדווח. ניתן לבחון אם המחבר עם אתר הקישור המשוער מאפשר ביטוי של הגן המדווח בתאים. אם אכן כך, מדובר באתר קישור מוכח.

עד כה הובהר כי כדי שגן יתועתק יש צורך בקישור גורם תעתוק ל-DNA שבאזור הבקרה של הגן. אך תא אינו מכיל את כל גורמי התעתוק שהגנום יכול לקודד, ולכן לא כל הגנים מתבטאים בתא. בנוסף גם אם קיים בתא גורם תעתוק רלוונטי, אין הכרח שהוא יפעיל את התעתוק של גנים שלאזור הבקרה שלהם הוא יכול להיקשר. ישנם גורמי תעתוק הפועלים באופן מותנה (Conditional), כלומר, בתנאים מסוימים בלבד. כך ישנם גורמי תעתוק מסוימים בתא שכדי שיפעילו תעתוק של גנים מסוימים, יש צורך שהם עצמם יופעלו בתנאים מסוימים על ידי **מסלול להולכת אותות (Signal transduction pathway)**. מסלול כזה תחילתו ב"גורם ראשוני" כלשהו המצוי בתא או בסביבתו החיצונית (לדוגמה, הורמון). הגורם הראשוני מייצר "אות ראשוני" המועבר דרך חלבונים רבים שתפקידם להוליך אותות לגורם תעתוק. האותות מביאים בסופו של דבר לקישור גורם תעתוק פעיל לאתרי הקישור שלו באזורי בקרה של גנים רלוונטיים ולתעתוק שבמהלכו נוצר RNA של אותם גנים. ביטויים של הגנים האלו מאפשר שינוי בתכונות התא המותנה "בגורם הראשוני".

## אפיון ביטוי RNA

ביטוי של גן תלוי בסוג התא ובתנאים השוררים בסביבת התא. לדוגמה, גנים המקודדים לנוגדנים מתבטאים רק בתאים של מערכת החיסון. מידע על ביטוי של גן, ובמיוחד על המקום והעיתוי שבהם הוא מתבטא עשוי לעזור בזיהוי תפקידו. לדוגמה, גן שמכונה נוצר RNA בעת שתאים מתחילים להתחלק, עשוי להיות מעורב בהוצאה לפועל של חלוקת תאים.

כשמאפיינים ביטוי גן, ראשית חשוב לאפיין את ביטוי ה-RNA שלו, כלומר לאפיין את כמותו, איכותו ואת עיתוי ביטוי. עם זאת חשוב להבין כי כמות ה-RNA של גן מסוים תלויה בגורמים נוספים מלבד קצב התעתוק. כך שלא כ-DNA שנשמר בשלמותו במהלך חיי התא ואף מתוקן בעת הצורך, ה-RNA הנוצר מגנים שונים בתא מתקיים רק לפרק זמן מוגבל. זמן מחצית החיים של RNA של גנים שונים נע בין כמה דקות ועד למספר ימים, והוא נקבע על ידי גורמים שונים (פרק 1). זמן מחצית החיים עשוי להשתנות עם השינוי בסביבת התא ובתוכו.

בתת-פרק זה מצוי מידע אודות השיטות המאפשרות לאפיין ביטוי של RNA.

## אפיון ביטוי RNA באמצעות תספיג צפוני

ניתן לאפיין את איכותו וכמותו של RNA מסוים באמצעות גלאי חומצת גרעין מסומן ועל פי עקרונות ההיברידיזציה כמפורט בפרק 4. כדי לאפשר היברידיזציה זו יש להעביר את ה-RNA לפילטר בתהליך שבו מיוצר תספיג הנקרא **תספיג צפוני** (Northern blot). השיטה העושה שימוש בתספיג הצפוני היא השיטה הבסיסית לאפיון נוכחות וכמות של RNA בתא. על פי שיטה זו וכמתואר באיור 7.3, קודם מפיקים RNA מתאים ומפרידים את המולקולות השונות על פי גודלן בג'ל אגרוז. ככל שהמולקולה גדולה (ארוכה) יותר,

□ הראשון שפיתה שיטה להעברת DNA מג'ל לפילטר באמצעות תספיג היה המדען Southern ושמו בתרגום לעברית הוא "דרומי". הייתה זו מעין בדיחה לקרוא לשיטה להעברת RNA לפילטר, שפותחה מאוחר יותר, בשם "Northern" (בעברית "צפוני").

במהלך ביטוי של גן נוצרים RNA וחלבון שלו. אפיון ראשוני של ביטוי גן נועד לקבוע את כמות ה-RNA שנוצרה ממנו ואת העיתוי שבו נוצר ה-RNA. כמות ה-RNA של גן בתא נקבעת לא רק על ידי קצב התעתוק. לקצב הפירוק של ה-RNA יש גם חשיבות. כדי לאפיין את כמות, איכות ועיתוי הביטוי של RNA מסוים בתא, ניתן לעשות שימוש ב"תספיג צפוני".

יהיה מרחק נדידתה בג'ל קטן יחסית, ואילו המולקולות הקטנות ינועו למרחק רב יחסית. לאחר מכן מעבירים את ה-RNA לפילטר, ומתקבל תספיג צפוני (RNA מהג'ל נספג לפילטר). כדי לגלות אם בין מולקולות ה-RNA שעל הפילטר ישנה מולקולת RNA ספציפית, משתמשים בגלאי חומצת גרעין מסומן (בדרך כלל גלאי DNA מסומן). הגלאי שחומם ושגדיליו הופרדו נצמד למולקולת RNA רצויה. ככל שיש

יותר RNA בתספיג, כך נצמד יותר גלאי מסומן, ולכן יושחר יותר סרט הצילום שהוצמד לתספיג. לכן מידת השחרת סרט הצילום משמשת מדד לכמות היחסית של מולקולת ה-RNA שמקורה בתאים.

□ גלאי DNA לשימוש בהיברידיזציה לתספיג צפוני הוא רצף DNA המשלים את רצף RNA המטרה. ניתן להכין גלאי באמצעות PCR. במקרה כזה משתמשים בתחלים שמשבטים (מגבירים) מקטע DNA מגן רצוי שאת ה-RNA שלו רוצים לזהות. מסמנים את תוצר ה-PCR באיזוטופ רדיואקטיבי שהופך אותו לגלאי יעיל. גלאים שונים מאפשרים לאתר כמויות יחסיות של מולקולות RNA שונות.

□ ידוע כי ניתן למצוא ביטוי של אינסולין (יצירת RNA וחלבון שלו) בתאי לבלב בלבד. לאינסולין תפקידי מפתח רבים ובין היתר הוא אחראי על שמירה של רמת גלוקוז תקינה בדם.

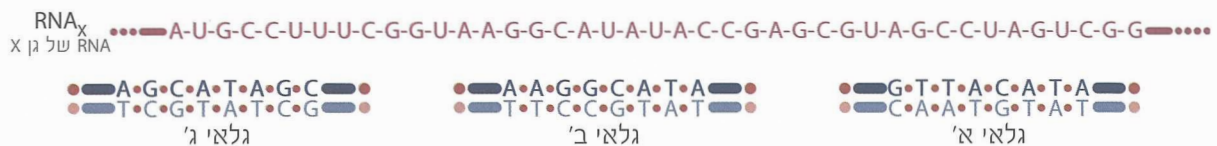
□ חשוב לציין כי השיטה העושה שימוש בתספיג צפוני, מיושמת כדי לאתר ולאפיין שינויים בביטוי גנים רק אם קיימת השערה מוקדמת שביטויים של גנים מסוימים עשוי להשתנות. מגבלה נוספת היא כי לשיטה שלבים רבים שכדי להוציאם לפועל נדרשים מספר ימים.

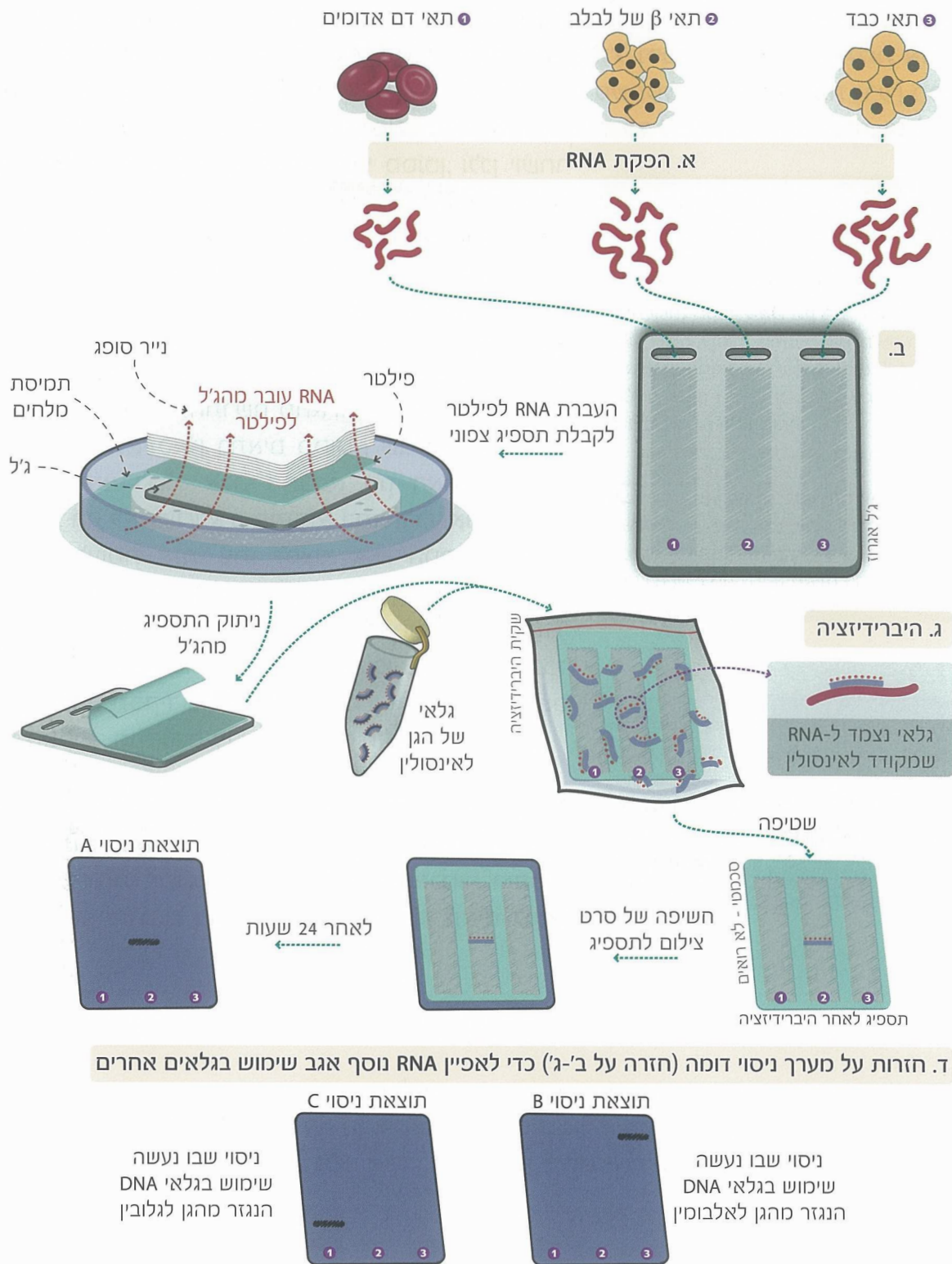
תוצאת אפיון הביטוי שמוצגת באיור 7.3 מלמדת כי מולקולות RNA שליה מסוימות אינן מתבטאות בכל סוגי התאים. כפי שניתן להתרשם מהאיור, ניתן למצוא RNA של הגן המקודד לאינסולין בתאים מסוג  $\beta$  שבלבלב, ולכן נהוג לומר שבתאי לבלב אלה מתבטא הגן האחראי לייצור אינסולין. הגן לאינסולין אינו מתבטא בתאי כבד או בתאי דם אדומים. לעומת זאת, ניתן למצוא RNA המקודד לגלובין (חלבון ששמור לו תפקיד בהולכת חמצן בדם) בתאי דם אדומים ולא בתאי לבלב או תאי כבד. ולבסוף, RNA המקודד לאלבומין (Serum Albumin) מתבטא באופן בלעדי בתאי כבד ששמור להם תפקיד באספקה של חלבון זה לזרם הדם, שם הוא מאפשר תפקוד תקין של מערכת הדם.

השיטה העושה שימוש בתספיג צפוני מאפשרת בין היתר **אפיון כמותי יחסי של RNA** בעקבות שינוי בסביבת התא ובתוכו. לדוגמה, ניתן לשאול אם השתנתה הכמות היחסית של ה-RNA של גנים מסוימים לאחר חשיפת תאים לגורם חלוקה.

**7.1 שאלה**

לפניכם רצף RNA שנוצר מגן X. ברצונכם לאפיין את כמותו בתאים באמצעות השיטה העושה שימוש בתספיג צפוני. כמו כן, לפניכם רצף הבסיסים ב-3 גלאים שונים. רק אחד מהם יתאים לאפיון כמות ה-RNA שהוא תוצר הגן X. באיזה גלאי מדובר? ציירו את מראה הגלאי שעבר היברידיזציה ל-RNA של X.





**איור 7.3: ראו ניתוב לאיור זה בעמוד ממול.**

תוצאות אפיון הביטוי של RNA מסוים בתאים שונים מתוארות באיור 7.3. ניתן לראות כי מולקולות RNA ייחודיות מתבטאות בתאים מסוימים בלבד. כך הגן המקודד לאינסולין מתבטא רק בתאי  $\beta$  של הבלב, שם נוצר RNA שלו המתורגם לחלבון.

באיור 7.4 מתואר השימוש בתספיג צפוני לאפיין הכמויות היחסיות של RNA של גנים מוגדרים לאחר שהתאים הנבחנו נחשפו לגורם החלוקה PDGF לפרקי זמן שונים. כמתואר באיור זה, בתאים שנחשפו ל-PDGF ושבהם הופעל מסלול הולכת אותות, רמת ה-RNA של הגן Fos היתה גבוהה מאוד כבר חצי שעה לאחר חשיפת התאים ל-PDGF. כמויות של ה-RNA של Fos פחתה ככל שחלף הזמן מרגע החשיפה הראשוני לגורם החלוקה. כך, כעבור 24 שעות לא ניתן היה לראות עדות להימצאותו של RNA של Fos בתא. לעומת זאת, RNA של הגן Myc הופיע רק כשעה לאחר הוספת גורם החלוקה PDGF. למרות שרמת ה-RNA של Myc בתא פחתה לאחר 3 שעות, נותרה רמה ניתנת לזיהוי גם 24 שעות לאחר הוספת גורם החלוקה, זמן שבו תאים רבים הספיקו להתחלק. מחקרים נוספים הראו ש-Myc-Fos אינן נחוצים לחלוקת תאים.

□ חלבוני Fos ו-Myc הם גורמי תעתוק ייחודיים האחראיים כל אחד לביטוי של קבוצת גנים אחרת, ותוצריהם החלבוניים של גנים אלה נחוצים לחלוקת תאים. כיום ידוע כי ל-Fos תפקיד שנועד להכנה של תאים לקראת חלוקה בעיתוי מוקדם. לעומתו Myc הוא בעל תפקיד מתמשך בהוצאה לפועל של חלוקת תאים.

### אפיין ביטוי RNA באמצעות RT-PCR

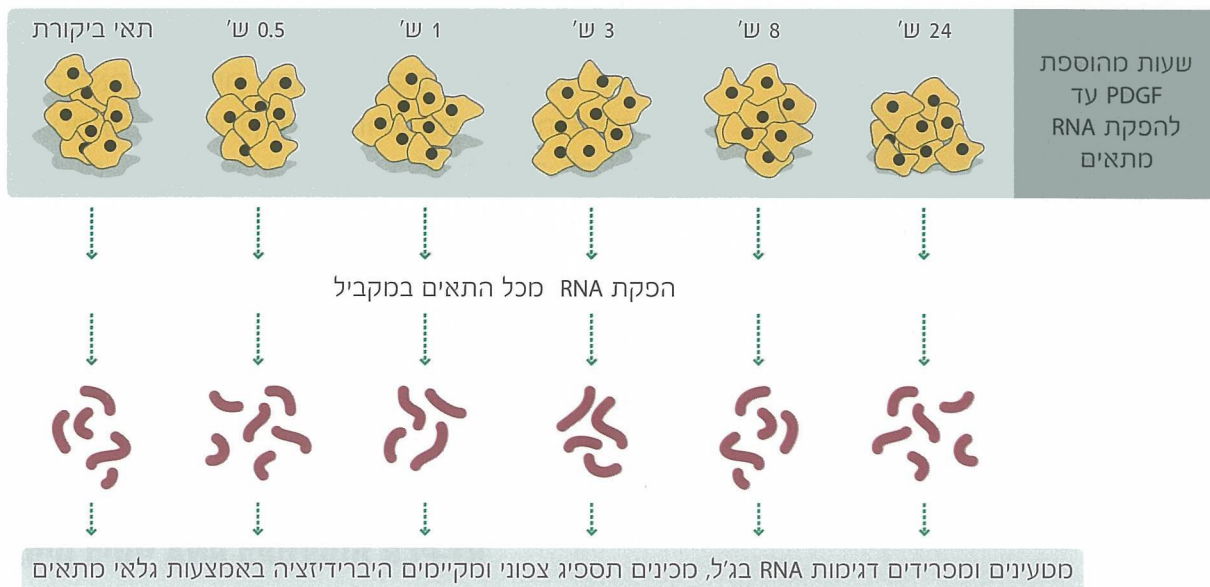
רגישות השיטה העושה שימוש בתספיג צפוני היא מוגבלת. לכן אם לא ניתן להבחין בפס המייצג RNA מסוים, לא ניתן לשלול את האפשרות שבתא קיימת בכל זאת כמות קטנה של RNA של הגן הנבחן. למקרה כזה ישנה חלופה המנצלת את שיטת ה-RT-PCR. כמתואר באיור 7.5, לצורך איתור RNA מוגדר וקביעת כמותו באמצעות RT-PCR, בשלב הראשון מסיקים RNA מתאים ומייצרים מונו-DNA-משלים באמצעות המתעתק במהופך (RT). DNA-משלים זה, יחד עם תחלים הנגזרים מהגן שאת ה-RNA שלו מעוניינים לאפיין, משמש להגברה באמצעות PCR. כמות ה-DNA שתתקבל בתהליך ה-PCR עומדת ביחס ישר לכמות ה-RNA של הגן הנבחן, ולכן ההבדל בכמויות תוצרי ההגברה לאחר RT-PCR מעיד על הבדל בכמויות מסוים בתאים השונים (איור 7.5). המחשה לשימוש בשיטה לאפיין **כמותי ואיכותי** של RNA באמצעות RT-PCR מקבלים מחקר הגן Myc כשמשווים את המידע באיור 7.4 למידע באיור 7.5.

□ השיטה לאפיין RNA באמצעות RT-PCR היא שיטה רגישה ומהירה יחסית (שעות עבודה ספורות בלבד). גם שיטה זו, כמו השיטה העושה שימוש בתספיג צפוני, דורשת השערות לגבי זהותם של גנים שביטויים עשוי להשתנות בתנאים ניסיוניים מסוימים, ובזה מסוים הסרונה.

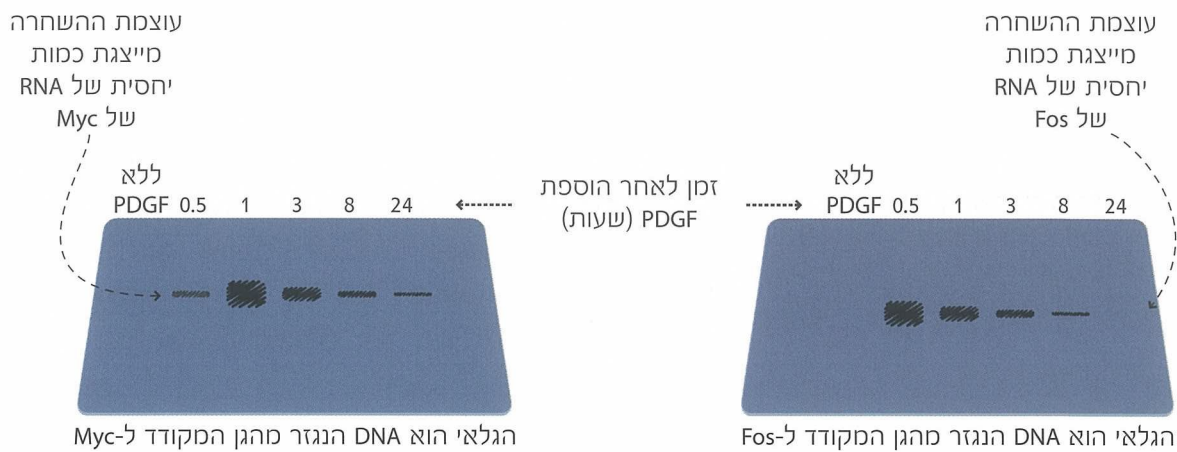
#### איור 7.3: אפיין ביטוי RNA בתאים שונים אגב שימוש בתספיג צפוני.

- הפקת RNA מתאים מרקמות שונות של אותו יצור.
- הפרדת RNA בגל אגרוז, העברתו לפילטר וקבלת תספיג הנקרא "תספיג צפוני".
- היברידיזציה בנוכחות תספיג וגלאי מסומן שנועד לגלות RNA מסוים (לדוגמה, גלאי הנגזר מהגן לאינסולין). חשיפת סרט צילום לתספיג שאליה ספוח גלאי מסומן. בחלק זה של האיור ניתן לראות את תוצאות ההיברידיזציה של גלאי הנגזר מהגן לאינסולין ל-RNA מתאי לבלב, תאי כבד ותאי דם אדומים.
- שימוש בגלאים הנגזרים מהגן לאלבומין ומהגן לגלובין, כדי לקבוע את הנוכחות והכמות היחסית של RNA של גנים אלה בתאים שונים של אותו יצור.

א. הפקת RNA לצורך תספיג צפוני והיברידיזציה



ב. השיפה של סרט צילום לתספיג שעבר היברידיזציה עם גלאי מתאים



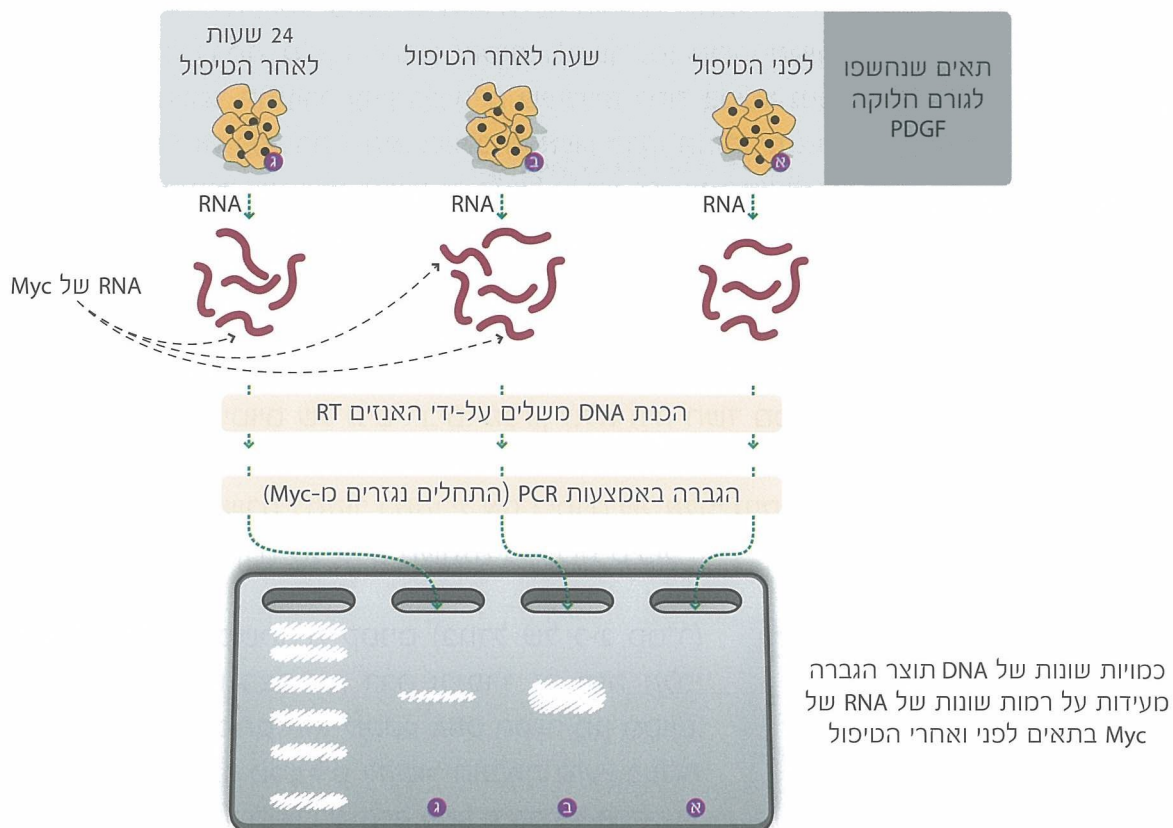
**איור 7.4: ניצול השיטה לקביעת נוכחות וכמות RNA באמצעות תספיג צפוני לצורך אפיון התגובה לשינוי בסביבת התא.**

האיור מדגים כי ניתן לאפיין שינוי כמותי יחסי ב-RNA של גנים מסוימים כתוצאה משינוי בתנאי הגידול של התאים. כך, תאים בתרבות שגודלו בהיעדר גורמי חלוקה ואשר נחשפו ברגע מסוים לגורם החלוקה PDGF, מגיבים בהעלאה מיידי של כמות ה-RNA של Fos. מהתוצאות עולה כי כעבור 24 שעות אחרי מתן PDGF כבר לא ניתן למצוא עדות ל-RNA של Fos בתאים. גם Myc הוא גן שביטוי מושפע מנוכחות PDGF בסביבת התא, אך בשונה מ-Fos ניתן למצוא RNA שלו גם 24 שעות לאחר מתן PDGF.

ניתן לאפיין את כמות ה-RNA ועיתוי הביטוי שלו בתאים שונים גם באמצעות RT-PCR. לצורך כך, כמודגם באיור 7.5, מפיקים RNA ומשתמשים באנזים המתעתק במהופך ליצירת DNA משלים. משתמשים ב-DNA המשלים כדי להגביר מקטע הנגזר מהגן שאת ה-RNA שלו רוצים לאפיין. ההבדל בכמות היחסית של תוצרי ההגברה לאחר RT-PCR מעיד על הבדל בכמות ה-RNA בתאים השונים (איור 7.5).



## אפיון רמות RNA של Myc בתאים לפני ואחרי הטיפול ב-PDGF באמצעות RT-PCR

**איור 7.5: RT-PCR לאפיון כמויות יחסיות של RNA בתא כשיטה חלופית לתספיג צפוני והיברידיזציה.**

לאפיון איכותו וכמותו היחסית של RNA של גן מסוים ניתן להיעזר ב-RT-PCR. כך, מפיקים מהתאים RNA, מייצרים DNA משלים ואחר כך מגבירים מקטע DNA באמצעות PCR. למעשה, מגבירים מקטע DNA המייצג RNA של גן מסוים. הגברה כזו מצריכה זוג תחלים בעלי רצף המצוי בגן שאת ביטוי חוקרים. הכמות היחסית של ה-DNA תוצר הגברה מלמדת על הכמות היחסית של ה-RNA של הגן הנבחן בתא הנבחן.

**אפיון ביטוי RNA באמצעות שבני DNA**

אפיון ביטוי RNA באמצעים שתוארו עד כה מאפשר לחקור רק ביטוי RNA שנגזר ממספר מצומצם של גנים מוכרים. כך למרות מספרם הרב של הגנים המתבטאים בתא בו זמנית, השיטות שתוארו עד כה אינן מאפשרות לבחון בו-זמנית ביטוי של מאות ואף אלפי גנים. כדי להתמודד עם אתגר זה, נהוג להשתמש בשיטה מתקדמת המאפשרת חקר בו זמני של ביטוי גנים רבים, מבלי צורך בהשערות מוקדמות באשר לאופן ביטויים. חקר בו זמני של ביטוי גנים רבים עשוי להיות רלוונטי להבנת תרומתם של הגנים להתנהגות של תאים שונים במצבים שונים.

סיפור המקרה הבא מדגים את הצורך בשימוש באמצעים מתקדמים לאפיון ביטוי גנים. כך, כדי לשפר את יכולות הטיפול במצבים סוכרתיים, נשאלה השאלה כיצד מתנהגים תאי  $\beta$  של הבלבל כשהם חשופים לרמת גלוקוז גבוהה יחסית ולמשך זמן ארוך יחסית (24 שעות). במיוחד התעורר עניין בשינויים שעשויים לחול בביטוי גנים כתוצאה משינוי זה בסביבת התא. בשלב הראשון בדקו החוקרים את האפשרות שבתאים שנחשפו לריכוז גבוה של גלוקוז (תאים מטופלים) קיים ביטוי מוגבר של ה-RNA המקודד לאינסולין. ואכן, כשביצעו אפיון של ה-RNA בתספיג צפוני, נמצא כי כמות ה-RNA המקודד לאינסולין הייתה גדולה פי 1.5 בתאים המטופלים בהשוואה לכמותו בתאים שגדלו בסביבה עם ריכוז גלוקוז נורמלי. ממצא זה תאם את ההשערה הניסיונית, אך עובדה ידועה היא כי שינוי בסביבת התא מוליך לשינוי בביטוי של יותר מגן אחד ולמעשה לשינוי בביטוי של גנים רבים. מכיוון שלא היה חשד ממוקד לגבי שינויים אפשריים נוספים בביטוי גנים בתנאים ניסיוניים אלה, התעורר הצורך להשתמש בשיטה מתקדמת העושה שימוש בשבבי DNA. שיטה זו מאפשרת לחקור במקביל את ביטויים של אלפי גנים. השיטה מתאימה לחקר ביטוי גנים, גם אם אין חשד מוקדם שביטויים משתנה בעקבות טיפול.

□ כאשר מתרחשת עליה בריכוז הגלוקוז בסביבתם של תאי  $\beta$  של הבלבל, התאים מגיבים בסינתזה והפרשה מוגברים של אינסולין.

□ שבבי DNA, שפותחו לראשונה לקראת שנות ה-2000 ונמצאים בשימוש נרחב מאז, נקראו במקור DNA Chips או DNA microarrays וסוגים מסוימים שלהם מיוצרים בתהליכים תעשייתיים הדומים לאלו של יצור שבבי מחשב ומכאן מקור כינויים.

**שבבי DNA** הם משטחים קטנים (בגודל של כ-2 סמ"ר) שעליהם ממוקמים בצפיפות רבה ובנפרד זה מזה אלפי גלאים, שכל אחד מהם הוא מקטע DNA הנגזר מגן מסוים. הגלאים שעל השבב מסוגלים לקשור חומצות גרעין בעלות רצף משלים בתהליך ההיברידיזציה (ראו תיבה 4.6 בפרק 4). שבבי DNA מאפשרים, בין השאר, לבדוק במקביל שינויים בביטוי גנים רבים, כמתואר באיור 7.6. למימוש מטרה זו מפיקים RNA מתאי ביקורת ומתאים מטופלים. מה-RNA מסנתזים DNA משלים מסומן בעזרת נוקלאוטידים זוהרים מתאימים. בשלב הבא בודקים לאילו גלאים שעל השבב נצמד ה-DNA המשלים המסומן, ומה מקורו של DNA משלים זה (מתאי ביקורת או מתאים מטופלים). לכן השבב מאפשר לגלות שינויים בביטוי גנים רבים בתא המטופל.

### השלב האופייניים למבחן ביטוי RNA באמצעות שבבי DNA הם אלה (איור 7.6):

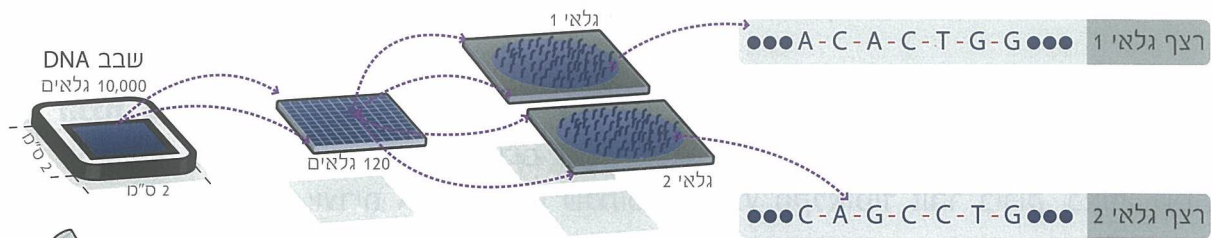
1. **הכנת שבב DNA** - שבב DNA מכיל אלפי "גלאים" לא מסומנים הממוקמים על השבב בנפרד זה מזה. הגלאים הם למעשה מולקולות DNA בעלות רצף ייחודי המייצגות אלפי גנים שונים. חוקרי הסוכרת ששאלו מה מתרחש ברמת ה-RNA בתאים מבלבל עכבר שנחשפו לרמה גבוהה של גלוקוז השתמשו בשבבי DNA שהכילו אלפי גלאים שהרצף שלהם נגזר מגנים של עכבר.

#### **איור 7.6: איתור השינוי בכמויות RNA של גנים רבים בתאים מטופלים בהשוואה לתאי ביקורת באמצעות השיטה העושה שימוש בשבבי DNA.**

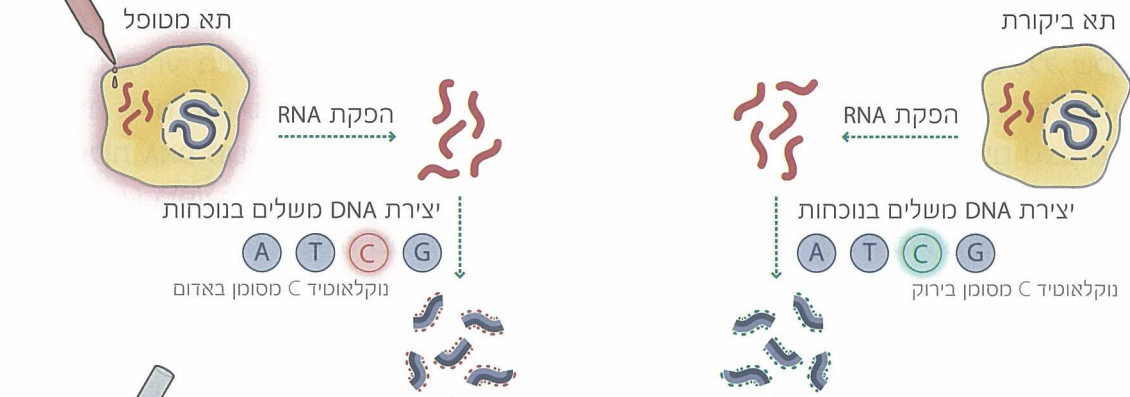
לאחר הפקת RNA ויצירת DNA משלים מסומן מתאי ביקורת ומתאים מטופלים, מקיימים היברידיזציה של DNA מסומן לגלאים שעל שבב ה-DNA. היברידיזציה תתקיים רק באותם גלאים הנגזרים מגנים שה-RNA שלהם מתבטא באחד מסוגי התאים. ההבדלים בביטוי גן מסוים בתאים השונים ניתנים לחיזוי על פי צבע ועוצמת הסימון בנקודה מסוימת בשבב.

**שבבי DNA** הם משטחים שעליהם ממוקמים גלאים רבים (אלפים), והם משמשים, בין השאר, כדי לבדוק בתאים שונים בו זמנית, שינוי בביטוי מולקולות RNA שונות. השלבים (1-5) הנחוצים לשימוש בשבבים לצורך אפיון של ביטוי גנים מפורטים בעמוד זה, בעמודים הבאים ובאיור 7.6.

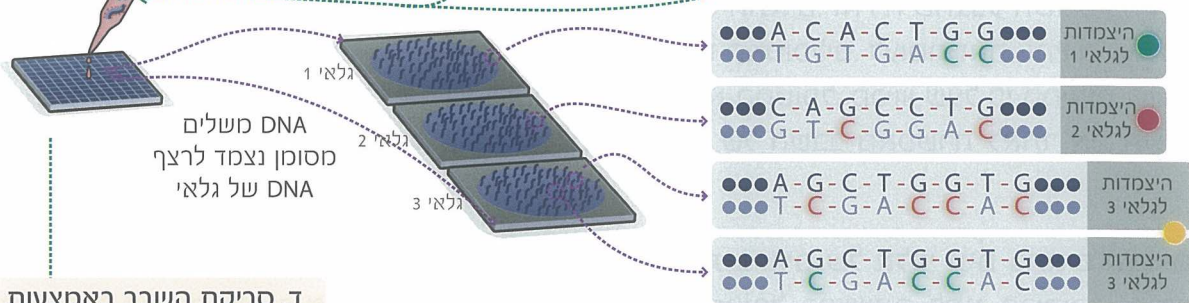
**א. מערך גלאים צפוף על גבי שבב DNA**



**ב. טיפול בתאים ויצירת DNA משלים מסומן**



**ג. היברידיזציה של ה-DNA המשלים המסומן לגלאים על השבב**



**ד. סריקת השבב באמצעות סורק אופטי ממוחשב**



- עיקר ההיברידיזציה היא של DNA משלים מהתא המטופל; ביטוי מוגבר של הגן בתאים המטופלים
- אין היברידיזציה; הגן אינו פעיל באף אחד מהתאים
- עיקר ההיברידיזציה שווה של DNA משלים משני התאים; ביטוי זהה של הגן בתאים המטופלים ובתאי הביקורת
- עיקר ההיברידיזציה היא של DNA משלים מתא ביקורת; ביטוי מופחת של הגן בתאים המטופלים

**איור 7.6: דאו כיתוב לאיור זה בעמוד ממול.**

אפיון של ביטוי RNA באמצעות שבבי DNA מצריך הפקת RNA מתאי ביקורת ומתאים מטופלים. מייצרים מ-RNA זה DNA משלים מסומן (צבע שונה ל-RNA ממקור שונה). בשלב הבא מאפשרים ההיברידיזציה של DNA משלים מסומן לגלאים שעל השבב. ייתכנו שלושה סוגים של אידועי היצמדות שמומרים לאותות אדום, ירוק או צהוב (כמודגם באיור 7.6). לרוב מגלים כי בעקבות טיפול טיפוסבי ביטוי של 1%-3% מהגנים שבתא משתנה.

2. **הפקת RNA משני סוגי תאים** שאת הנעשה באחד מהם רוצים להשוות לנעשה באחר. לעתים בוחרים בתאים מסוימים שעברו טיפול, כדוגמת השיפה לגלוקוז, ובתאים אחרים שלא טופלו הנקראים תאי ביקורת.
3. **הכנת DNA משלים מסומן** - מוסיפים ל-RNA שהופק מכל אחד משני סוגי התאים אנזים RT המתעתק במהופך ויוצרים DNA משלים שלתוכו מאפשרים שיבוץ נוקלאוטיד זוהר. כך, בנוכחות RNA מתאי ביקורת יוצרים DNA משלים שלתוכו משתבץ נוקלאוטיד זוהר בירוק. באופן דומה, בנוכחות RNA מתאים מטופלים מייצרים DNA משלים שיזהר באדום.
4. **קיום היברידיזציה** - מאפשרים היברידיזציה של שני סוגי ה-DNA המשלים המסומנים בירוק או באדום לגלאים שעל השבב. רק אם יש בדגימות DNA מסומן בעל רצף משלים לרצף הגלאי, יתקבלו אירוועי היצמדות שאותם ניתן לגלות. לחלק מהגלאים לא נצמד DNA משלים כלל, שכן חלק מהגנים אינם מתבטאים באף אחד מסוגי התאים. לחלק אחר מהגלאים נצמדות כמויות שוות של מולקולות DNA משלים שמקורן בשני סוגי התאים הנבחנים. מקרים כאלה מייצגים מצב שבו לא היה שינוי בביטוי גנים אלה בתאים המטופלים. לעומת זאת ישנם גלאים שבהם מאתרים היצמדות משמעותית של DNA משלים שמקורו רק באחד מהתאים. מקרים כאלה מגלים את הגנים שבהם היה שינוי בביטוי ה-RNA בתא המטופל.
5. **עיבוד נתונים** - באמצעות הארה מתוך סורק שבבים בוחנים את עוצמת הזהירה מאזורים שונים בשבב שעליהם ממוקמים הגלאים. המחשב מעבד ומשקלל את מיקום ואת עוצמת הזהירה. זהירה בעצמה זהה בירוק ובאדום באותה נקודה מעובדת על ידי המחשב לאות צהוב. פירושה של זהירה זו הוא כי גן מסוים מבטא כמויות זהות של RNA בשני סוגי התאים. זהירה שהצבע השליט בה הוא אדום, מלמדת על עלייה בביטוי RNA של גן מסוים בתאים המטופלים. לעומת זאת, זהירה שהצבע השליט בה ירוק, מלמדת על דיכוי של ביטוי גן מסוים בתא המטופל. מכיוון שעל פי המיקום בשבב יודעים לשייך DNA של גלאי מסוים לגן מסוים, הסריקה של השבב מאפשרת לאתר את השינוי בביטוי RNA שמקורו בגנים השונים.

בניסוי שבו משתמשים בשבב טיפוס, מתקבל מידע אודות ביטויים של אלפי גנים בתאים השונים. בדרך כלל ביטויים של כ-1%-3% מהגנים משתנה בתא המטופל בהשוואה לתא הביקורת. חוקרי הסוכרת שהשתמשו בשבבי ה-DNA על מנת לבחון את המתרחש בתאי  $\beta$  של הבלבל בתגובה לריכוז גלוקוז גבוה, מצאו כי ביטויים של 80 גנים השתנה (עלה או ירד) בתאים המטופלים בהשוואה לתאי הביקורת שהיו השופים לרמות נורמליות של גלוקוז. כשהתברר זהותם של הגנים שביטויים השתנה, הסתבר כי חלה עלייה בביטוי גנים המעורבים בתרגום ובקיפול של חלבון האינסולין ובביטוי גנים המעורבים בהפרשה של אינסולין אל מחוץ לתא. מלבד אלה נמצא כי ביטויים של גנים חסרי תפקיד ידוע השתנה גם הוא. אחת מהמסקנות המתבקשות היא כי תא הבלבל מסוגל "לעבד" את המידע על עליית ריכוז הגלוקוז באמצעות חלבונים במסלולים להולכת אותות כדי להביא לשינוי בביטוי גנים ותוצריהם. השינוי נועד להתאים את תפקוד התא למצב החדש על ידי הגברת הפרשת האינסולין הנחוץ בגוף במצבים של עלייה ברמת הגלוקוז. זיהוי השינוי בביטוי גנים שהיו

□ לרוב מניחים כי השינוי ברמת ה-RNA בתא מטופל מביא לשינוי דומה ברמת החלבון. אם רוצים לדייק בקביעות מעין אלה לגבי גנים ספציפיים, יש לבדוק שינויים הן ברמת ה-RNA והן ברמת החלבון.

קודם למבחן הביטוי חסרי תפקיד ידוע, מאפשר לשייך תפקיד ראשוני לגנים שכאלה ולתוצריהם. ניתן לומר שלגנים כאלה יש תפקיד בהסתגלותם של תאים נבחנים לתנאים סביבתיים חדשים (לתנאים בהם מתקיים ריכוז גבוה של גלוקוז).

אפיון השינויים בביטוי גנים הוא הליך מקובל גם בתאים ממקורות שונים במטרה ללמוד על ההבדלים בתהליכי היסוד של התאים השונים. כך, שבבי DNA משמשים גם במחקר של תהליכים בשמרים, בחיידקים וביצורים רבים אחרים. לדוגמה, ניתן לחקור את השינוי בביטוי גנים בשעה ששמרים "מתעוררים מתרדמתם" ומתחילים בתהליכים מטבוליים המאפשרים להם להתפיה בצק. התחקות אחרי שינוי זה עשויה לעזור בשיפור תהליכים תעשייתיים. כמו כן ניתן לבדוק, כיצד באמצעות שינוי בביטוי גנים, מסתגלים חיידקים לנוכחות חומרים שיש להם פוטנציאל לשבש את החלוקה שלהם. יתרה מזו, מדענים ורופאים תולים תקוות רבות בשימוש בשבבים לא רק לצורכי המחקר הבסיסי אלא גם בשימוש בתחום האבחון הרפואי, לדוגמה בתחום אבחון לצורכי ריפוי סרטן השד.

לתאי סרטן השד משלב מוקדם של המחלה מראה היצוני אחיד אצל כל החולות. עם זאת, בעוד שאצל חולות מסוימות הסרת הגידול הראשוני בשלב מוקדם מעלה את סיכויי הריפוי, הרי אצל חולות אחרות תתפתחנה לאחר הסרת הגידול גרורות סרטניות. מכיוון שמראה התאים של גידול ראשוני אינו יכול ללמד על סיכויי הריפוי העתידיים, מקובל לתת לאחר הניתוח להסרת הגידול הראשוני טיפול כימותרפי מונע לכל המנותחות למרות תופעות הלוואי של טיפול זה. לו ניתן היה לקבוע אצל החולה אם הגידול הסרטני הראשוני שבגופה עלול לפתח גרורות סרטניות היה בכך משום תועלת רבה. כך ניתן היה לתת את הטיפולים הכימותרפיים רק לאותן חולות בעלות סיכון גבוה לפתח גרורות.

כדי למנוע טיפול כימותרפי מיותר, התעורר הצורך באפיון יסודי של גידולים בחולות שונות. נקודת המוצא של החוקרים הייתה כי קיימים שני תת-סוגים של המחלה: סרטן שד גרורתי וסרטן שד לא גרורתי שאינם נבדלים במראהם. כמו כן שיערו החוקרים כי כל תת-סוג של סרטן השד מתאפיין בדגם ייחודי של ביטוי גנים הניתן לזיהוי על ידי שבבי DNA. ואכן, השימוש בשבבי DNA אֶפְשָׁר לגלות כי קיימים כ-70 גנים שביטויים בגידולים בגידולים שאינם גרורתיים שונה בהשוואה לביטויים בגידולים הגרורתיים. מכאן הסיקו החוקרים שניתן באמצעות שבבי DNA לנבא כבר בשלב מוקדם את מהלך ההתפתחות העתידית של המחלה. לכן חולה שאפיון הביטוי בשבבי DNA העלה כי היא עתידה לפתח גרורות לאחר הסרת הגידול הראשוני, תקבל טיפול כימותרפי מונע. הטיפול ייחסך מחולה אחרת שעברה, בין השאר, בדיקה באמצעות שבבים שגילתה שסיכוייה לפתח גרורות נמוכים. כך מידע מוקדם על הסוג המדויק של המחלה, כפי שהוא מתקבל ממבחנים של ביטוי גנים המתבצעים בעזרת שבבי DNA, עשוי, במקרים שבהם יש תקציב מתאים, לעזור בבחירת הטיפול הרפואי המתאים.

ניתן להסביר את קיומם של תת-סוג של סרטן השד בכך שתהליך ההתמרה יכול להתרחש עקב מוטציות בגנים שונים, כלומר, לא כל מקרי הסרטן באיבר מסוים מקורם במוטציות באותם גנים. עם זאת ניתן למצוא מוטציות מסוימות בסוגי גידולים שונים.

## תיבה 7.1: איתור מוטציות באמצעות שבבי DNA ובעזרת PCR.

שבבי DNA אינם משמשים רק למבחנים השוואתיים של ביטוי RNA. ישנם שבבים שעליהם גלאים קצרים של DNA שנועדו לאפשר היצמדות של מקטעי DNA רק אם יש בהם מוטציה בהשוואה לרצף המצוי בגן התקין. שבב DNA עם גלאים כאלה משמש כדי לאתר מוטציות אפשריות בפרטים נבחנים. כך לדוגמה, כדי לאתר פרטים נשאי מוטציה בגן CF (ציסטיק פיברוזיס, פרק 6) ניתן למקם על השבב גלאים הנגזרים מהגן ל-CF. רצף כל גלאי על השבב, למעט גלאי ביקורת, יכול אחת מתוך 29 מוטציות אפשריות בגן ל-CF. ניתן לקיים הגברה וסימון של הגן ל-CF מפרט נבחן באמצעות PCR ולערך היברידיזציה על השבב בנוכחות תוצר ההגברה המסומן. מקיימים תנאי היברידיזציה מיוחדים המאפשרים היצמדות מטרה (במקרה זה תוצר ה-PCR) לגלאי רק אם יש השלמה של 100% בין הבסיסים. איתור גלאי בעל מוטציה מסוימת שאליו נצמד תוצר ה-PCR, מאפשר לקבוע את סוג המוטציה בתא.

(-): מנב"ל: למה לא קיבלתם את המועמד החדש למשרת האחראי למכשיר שבבי ה-DNA?

מנהל כוח אדם: אחת מהבדיקות שעשינו מסבירה למה...

מנב"ל: הוא נבשל בריאינונות?

מנהל כוח-אדם: לא, הוא השאיר רושם טוב על כל המדריינים וגם תפקד במבחנים הקבוצתיים.

מנב"ל: אז מה הייתה הבעיה?

מנהל כוח אדם: שמחנו שבמבחני היברידיזציה לשבב DNA התקבלה תוצאה שהראתה שביטוי הגנים שלו, ובמיוחד אלה הקשורים לקצב עבודה, היה תקין. אבל היה לו ביטוי של גנים שמתבטאים אצל עורכי דין...

מנב"ל: אני לא רואה פה שום בעיה.

מנהל כוח אדם: בהתחלה גם אנחנו לא ראינו, אבל אז הצגנו לו את חוזה ההעסקה, ומאז לא ראינו אותו...

## אפיון ביטוי חלבונים

בדומה לאפיון ביטוי RNA, אפיון הימצאותו וכמותו של חלבון מסוים בתא יכול לסייע בקביעת תפקיד הגן המקודד לחלבון ובקביעת תפקיד החלבון בתא. כך לדוגמה, אם הכמות של חלבון מסוים עולה במצב מסוים (לאחר קרינה, לדוגמה), אפשר לשער כי לחלבון המסוים תפקיד בהסתגלות התא למצב החדש שבו הוא נתון. לא תמיד עלייה בתוצר חלבוני נובעת מעלייה ברמת ה-RNA המקודד לחלבון. לעתים האטת קצב פירוק החלבון היא הגורם המשפיע. כיצד קובעים כמה חלבון מסוים יש בתא במצב מסוים? איך קובעים האם חלבון מסוים קשור לחלבון אחר והאם הקישור משפיע על הפעילות? ה**נוגדן** הוא הכלי החשוב ביותר להתמודדות עם שאלות ברמת החלבון (איור 7.7 ותיבה 7.2).

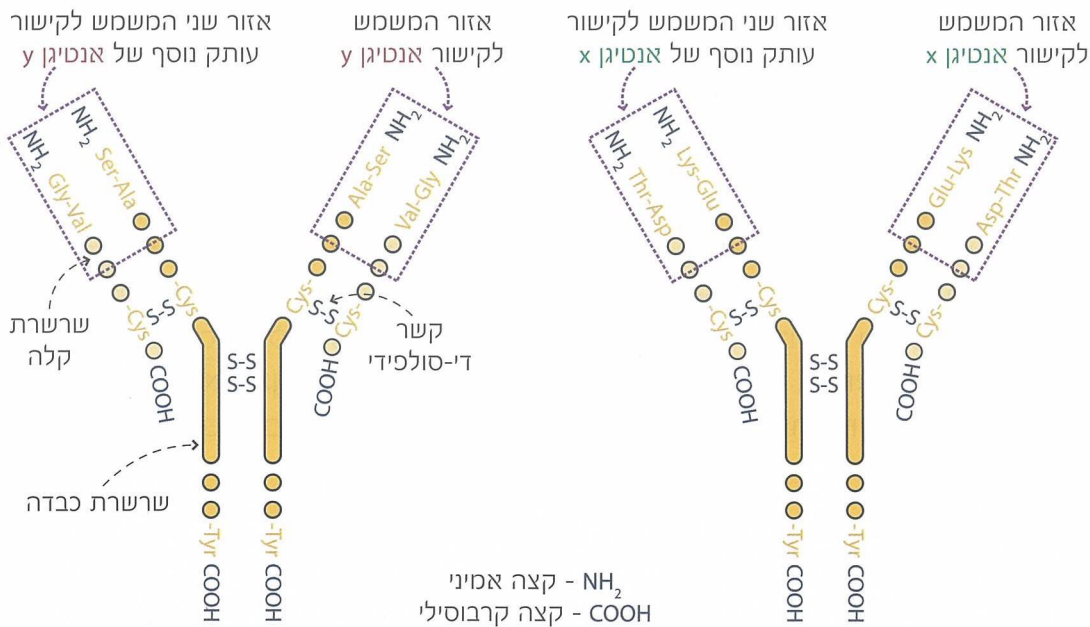
□ אפיון ביטוי של חלבונים אמנם אינו כלול בתחום ההנדסה הגנטית, אך אפיון שכזה נחוץ להבנת תפקודו של הגן המקודד לאותו חלבון. לעתים מאפיון רמת החלבון הנחקר בתנאים שונים ומאפיון חלבונים אחרים שאליהם הוא נקשר, מתפתח מחקר מסועף המצריך שימוש בשיטות של הנדסה גנטית.

**הנוגדן** (איור 7.7) הוא הכלי החשוב ביותר לאפיון כמותו היחסית ואיכותו של חלבון בתא. אפיון כמות יחסית של החלבון הנחקר ואיכותו בעקבות שינוי בסביבת התא או בתוכו, הוא מדד חשוב נוסף שממנו ניתן ללמוד על תפקידיו של הגן הנחקר.

**תיבה 7.2: הנוגדן ככלי לאיתור ולחקר חלבוני התא.**

**נוגדן** מורכב משתי שרשרות חלבוניות ארוכות ושתיים קצרות הקשורות ביניהן בקשרים די-סולפידיים. קשר די-סולפידי הוא קשר קוולנטי בין שני אטומי גופרית, ובחלבונים קשר כזה נוצר בין שתי חומצות אמינו מסוג ציסטאין (איור 7.7). נוגדנים מיוצרים בגוף על ידי תאי B של המערכת החיסונית. קיומם של נוגדנים שונים בגוף מאפשר למערכת החיסון, בין יתר פעולותיה, לקשור פתוגנים (מחוללי מחלה כגון חיידקים ווירוסים) ולסייע בהגנה על הגוף מפניהם. בגופנו מאות אלפי נוגדנים מסוגים שונים שביכולתם לקשור מאות אלפי אנטיגנים שונים, רבים מהם חלבונים. ככלל, אפשר לומר כי לנוגדן זיקה (Affinity) לאנטיגן מסוים ויכולת "לקשור אותו". **אנטיגן** הוא מולקולה - או קטע מסוים של מולקולה - (בהרבה מקרים אנטיגן הוא קטע ייחודי של חלבון מסוים) הנקשרת על ידי נוגדן. למרות הדמיון במבנה הכללי של נוגדנים מסוגים שונים, הם נבדלים זה מזה ביכולתם לקשור אנטיגנים: על פי רוב לכל נוגדן יכולת לקשור ביעילות רק אנטיגן אחד. בשל תכונה זו משמש הנוגדן ככלי לזיהוי ולבידוד חלבון ספציפי, ובין יתר תכונותיו הוא משמש כ"גלאי" יעיל.

ההבדלים התפקודיים בין נוגדנים שונים מקורם בשוני מבני באזור קטן של הנוגדן הנקרא "אזור קושר אנטיגן" (איור 7.7). כדי לאלץ אורגניזם לייצר נוגדנים ייחודיים לחלבון מסוים מזריקים לו את החלבון עצמו. האורגניזמים שמקובל להשתמש בהם כדי לייצר נוגדנים כנגד חלבוני מטרה לצורך מחקר הם ארנבות ועכברים.



**איור 7.7: מבנה מולקולת נוגדן המשמשת לקישור אנטיגן, לדוגמה, חלבון.**

נוגדן מורכב מ-2 שרשרות קלות ו-2 שרשרות כבדות הקשורות אלו לאלו בקשרים די-סולפידיים (S-S), וכל אטום גופרית (S) מקורו בחומצה האמינית ציסטאין. הנוגדנים השונים נוצרים על ידי תאי B של המערכת החיסונית. האזור הקושר את האנטיגן (אנטיגנים רבים הם בעצמם חלבונים) הוא ייחודי לנוגדן מסוים. באיור שני נוגדנים שונים שכל אחד מהם מסוגל לקשור אנטיגן שונה (X או Y).

זמינותו של נוגדן הקושר חלבון מסוים מאפשרת לחקור את תוצר הגן ששובט ולבדוק אם חלבון זה מצוי בתא מסוים ומהי הכמות היחסית של החלבון בתא זה בהשוואה לתאים אחרים. כמו כן ניתן לבדוק כיצד מושפעת כמות החלבון משינוי בסביבת התא או משינוי בתוכו, ואף לבדוק אם החלבון קושר חלבונים אחרים המצויים בתא. איור 7.8 א' מדגים כיצד

□ השקעה באמצעות נוגדנים מכונה Immunoprecipitation שפירושה השקעה (precipitation) באמצעות מרכיב של המערכת החיסונית (Immune) שהוא במקרה זה הנוגדן.

ניתן להשקיע חלבונים באמצעות נוגדן כדי לענות על שאלות אלה. לצורך השקעה ובידוד של חלבון באמצעות נוגדנים, מקבעים את הנוגדן לכדוריות ג'ל זעירות. הדגרת הנוגדן המקובע עם מיצוי תאי של תערובת חלבוני התא השונים מאפשרת לנוגדן לקשור את החלבון הרצוי. לאחר הקישור מאפשרים לכדוריות לשקוע ואתן שוקעים הנוגדן והחלבון הרצוי הקשור אליו, ואחר כך מרחיקים באמצעות שטיפות את החלבונים שלא שקעו. בשלב האחרון מנתקים את החלבון הרצוי מהנוגדן ששקע באמצעות בוכר מתאים. כדי לזהות אם אכן שקע חלבון וכדי לאפיין את כמותו משתמשים בג'לים של אקרילאמיד.

כדי לזהות את החלבון לאחר הפרדה בג'ל ניתן להשתמש במספר שיטות. על פי שיטה אחת,

□ אקרילאמיד הוא פולימר שהמבנה הרשתי שלו מתאים גם להפרדת חלבונים על פי גודל. הגדולים מבין החלבונים ינועו למרחק קצר מהבאר ואילו הקטנים למרחק רב מהבאר.

כמתואר באיור 7.8 א', משתמשים בסימון רדיואקטיבי בשלב הראשון של הניסוי. בשלב זה מגדלים את התאים בנוכחות חומצה אמינית רדיואקטיבית כדי שחלבוני התא שיונתזו יהיו מסומנים רדיואקטיבית. מכאן שגם החלבון שמושקע באמצעות הנוגדן וכן כל חלבון אחר שמושקע בהיותו קשור לחלבון המזוהה על ידי הנוגדן (חלבון מושקע נלווה), יהיו רדיואקטיביים. מכיוון שנוכחות חלבונים רדיואקטיביים בג'ל ניתנת לזיהוי בעקבות חשיפה לסרט צילום, פס שחור בסרט הצילום מייצג חלבון שהושקע באמצעות הנוגדן. מידת ההשחרה של סרט הצילום מאפשרת לקבוע את כמותו היחסית של החלבון.

אחת הדוגמאות הקלאסיות לשימוש בנוגדנים לאפיין חלבונים ניתן למצוא בחקר הסרטן הנגרם על ידי וירוסים. בניסיון להבין את המנגנון שבאמצעותו הוירוס הנקרא sv40 גורם לסרטן בתאים של בעלי-חיים, הוכנו נוגדנים כנגד אחד מחלבוני הוירוס הנקרא אנטיגן T (T antigen). כדי לחקור את האנטיגן T בתאים שהודבקו על ידי הוירוס, גודלו התאים בנוכחות חומצה אמינית רדיואקטיבית ובוצעה השקעת חלבונים באמצעות נוגדן כנגד אנטיגן T. כמתואר באיור 7.8 ב', לאחר ההשקעה באמצעות הנוגדן והפרדה של החלבונים הרדיואקטיביים בג'ל ניתן היה לזהות בסרט הצילום פס שחור שמייצג את האנטיגן T.

**איור 7.8: השקעה באמצעות נוגדן למטרות זיהוי ואפיין חלבונים.**

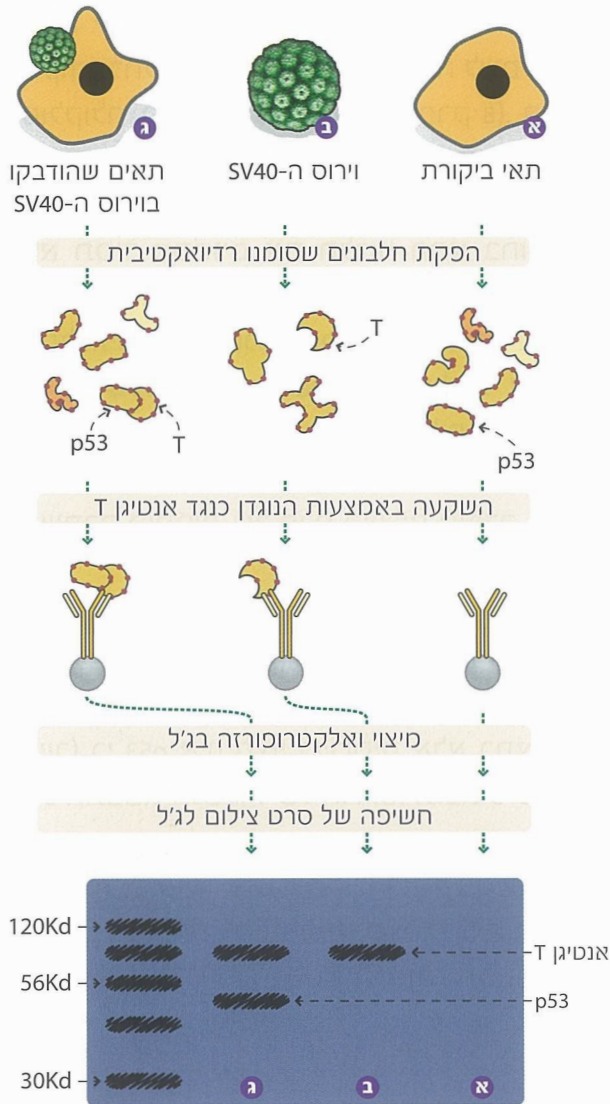
- א. השיטה לאפיין חלבונים באמצעות סימון רדיואקטיבי, נוגדן והפרדה בג'ל. מגדלים תאים בנוכחות חומצה אמינית רדיואקטיבית ומפיקים את החלבונים הרדיואקטיביים. לאפיין חלבון מסוים משקיעים אותו באמצעות נוגדן המזהה אותו ספציפית. בגמר ההשקעה מתקבל חלבון הקשור לנוגדן, ובעזרת בוכר מתאים ניתן למצות (לשחרר) את החלבון הקשור. בשלב הבא מפרידים את החלבון בג'ל כדי לאפיין אותו על פי גודלו. מכיוון שהחלבון רדיואקטיבי, ניתן לחשוף סרט צילום לג'ל ולאמוד גם את כמותו היחסית של החלבון.
- ב. יישום לשיטה לאפיין חלבונים רדיואקטיביים באמצעות נוגדן. באיור מתוארים הליכי בידוד והשקעה של חלבונים רדיואקטיביים ממקורות שונים באמצעות נוגדן כנגד אנטיגן T (שמקורו בוירוס). לאחר הפרדה בג'ל נמצא כי האנטיגן T קושר אליו חלבון תאי שזכה לשם - p53.

כדי לאפיין חלבון ולקבוע את כמותו היחסית ניתן בשלב הראשון להשקיע אותו באמצעות נוגדן (איור 7.8). השקעה באמצעות נוגדן מכונה Immunoprecipitation. לאחר השקעת החלבון באמצעות הנוגדן משתמשים בג'ל כדי לזהות את מקום הנדידה של החלבון ולאמוד את כמותו היחסית (איור 7.8 א').



**ב. היישום:**

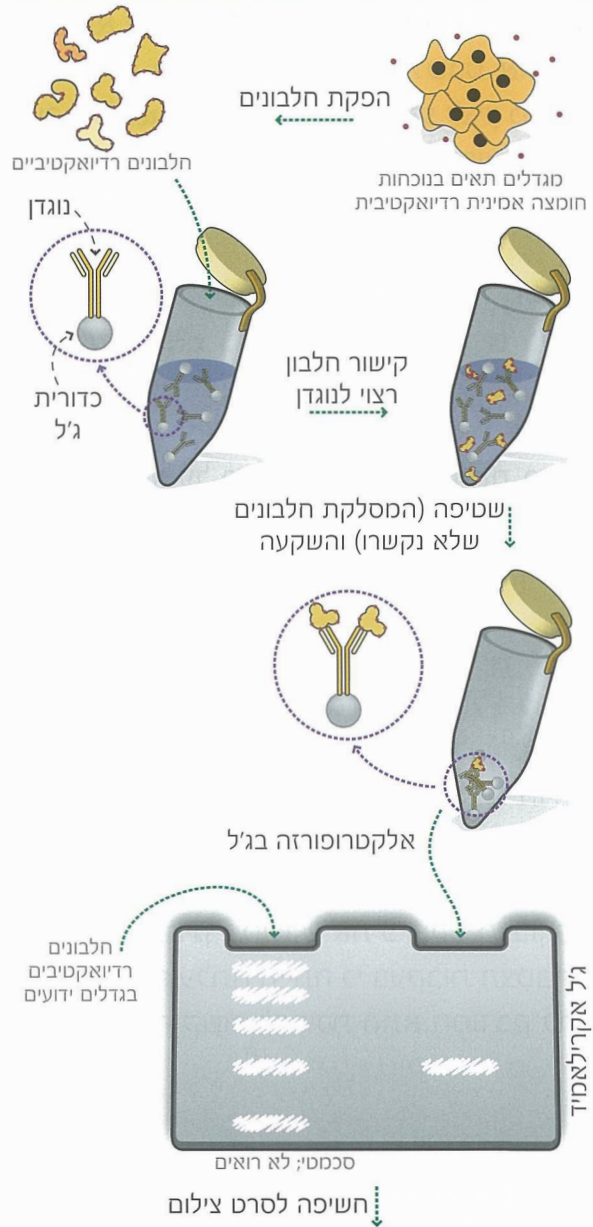
נוגדן כנגד אנטיגן T של הוירוס הקסרקטן משמש להשקעת אנטיגן T וזיהוי החלבון הקשור אליו שנקרא p53



השימוש בנוגדן כנגד האנטיגן T אֶפֶר בשנת 1979 לגלות לראשונה חלבון תאי חדש שנקשר ל-T: החלבון p53. ממצא זה תרם תרומה חשובה לקידום חקר הסרטן

**א. השיטה:**

השקעת חלבונים באמצעות נוגדנים והפרדתם בג'ל



**איור 7.8: ראו כיתוב לאיור זה בעמוד ממול.**

אולם למרבה ההפתעה, ההשקעה עם הנוגדן כנגד  $p53$  אֶפְשָׁרָה לזהות בסרט הצילום פס שחור שמייצג חלבון נוסף שגודלו הנראה לעין הוא 53,000 דלתון (53kd). ניסויים נוספים גילו כי זהו חלבון תאי ולא יוראלי אשר שוקע בעזרת נוגדנים כנגד אנטיגן  $p53$  מכיוון שהוא עצמו קשור לחלבון  $p53$  ולא משום שהוא מזוהה ישירות על ידי הנוגדן. בעקבות ממצא זה היו חוקרים ששמו להם למטרה לשבט את הגן המקודד לחלבון ה-53,000 דלתון שזכה לשם  $p53$  (p קיצור של protein ובעברית חלבון ו-53 לציון משקלו המולקולרי המשוער של החלבון) (פרק 8). החוקרים צפו כי שיבוט הגן המקודד ל- $p53$  יאפשר להבין את תפקידו של  $p53$  בתהליכים המשפיעים על חלוקת תאים וסרטן.

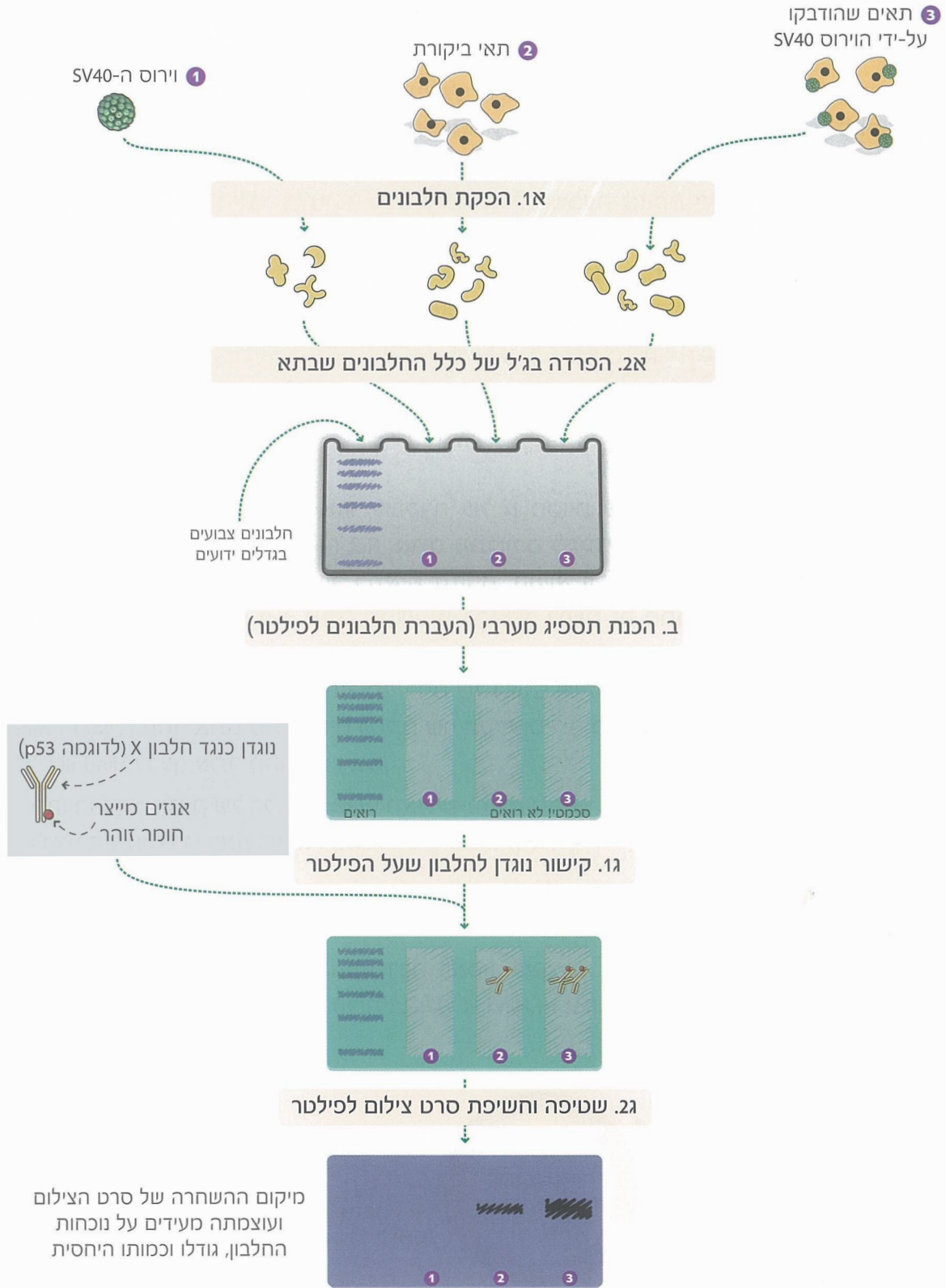
לא תמיד מסמנים את חלבוני התא בחומר רדיואקטיבי כדי לאפשר את זיהוים. בגישה חלופית המתוארת באיור 7.9, ניתן לראות כי כדי לאתר חלבון מסוים ואת כמותו היחסית מפיקים בשלב א' חלבונים לא מסומנים ומפרידים אותם בג'ל. בשלב ב' מבצעים העברת חלבונים לפילטר לקבלת **"תספיג מערבי"** (Western blot). בשלב ג' ניתן להשתמש בנוגדן המזהה באופן ספציפי את החלבון הרצוי המצוי על התספיג. כדי להשלים את תהליך איתור החלבון על התספיג וכדי לאפיין את כמותו היחסית, משתמשים בנוגדן שמוצמד אליו מרכיב זוהר. הזהירה מאפשרת השחרת סרט צילום, ועוצמת ההשחרה היחסית של סרט הצילום מעידה על כמותו היחסית של החלבון בתאים שממנו הופק.

איור 7.9 מדגים ניסוי שבו נעשה שימוש ב"תספיג מערבי" לצורך חקר החלבון  $p53$ . חלבונים הופקו מוירוסים (1), מתאי ביקורת (2) ומתאים שהודבקו על ידי הווירוס SV40 (3). לאחר הפרדה של תערובת חלבונים בג'ל וקבלת "תספיג מערבי" נחשף התספיג לנוגדן הקושר  $p53$ . תוצאות הניסוי גילו (כמתואר באיור) כי  $p53$  אינו מצוי בוירוסים אלא בתאים. כך, היה כבר ידוע כי בתאים שהודבקו על ידי הווירוס SV40 התבטא אנטיגן  $p53$  של הווירוס. נמצא כי בתאים אלה כמות גבוהה יחסית של  $p53$  בהשוואה לתאים שלא הודבקו על ידי הווירוס. המסקנה המתבקשת מהתוצאות המוצגות באיורים 7.8 ו-7.9 היא כי אנטיגן  $p53$  של הווירוס קושר  $p53$  שמקורו בתא. ניסיונות נוספים הראו כי אנטיגן  $p53$  משבש את פירוק החלבון  $p53$  וכי ועקב כך עולה כמותו בתא מעל לרמות הרגילות. ההשערה שהועלתה הייתה כי בעקבות הצטברות  $p53$  בתאים שהודבקו בוירוס השתנה תפקודו של  $p53$  וכי שינוי זה קשור להפיכת התא המודבק לתא סרטני.

### איור 7.9: השיטה העושה שימוש ב"תספיג מערבי" נועדה לאפיין חלבונים מסוימים ולקבוע את כמותם היחסית.

לשם אפיין חלבונים בשיטה זו מפרידים אותם בג'ל ומעבירים אותם לפילטר לקבלת תספיג מערבי. את הגודל והכמות היחסית של החלבון מאפיינים באמצעות שימוש בנוגדן ספציפי הנקשר לחלבון המצוי בתספיג. משתמשים בנוגדן זוהר כדי להשחיר סרט צילום.

במערך הניסוי המתואר באיור זה נעשה שימוש בנוגדנים כנגד החלבון  $p53$  כדי לאפיין את נוכחותו וכמותו של  $p53$  בוירוס SV40 (1), בתאי ביקורת (2) ובתאים שהודבקו על ידי הווירוס (3).



**איור 7.9: ראו ניתוב לאיור זה בעמוד ממול.**

לצורך איתור החלבון הרצוי בתספיג מערבי, מאפשרים קישור ספציפי של נוגדן מסוים אל החלבון הרצוי שעל התספיג. מכיוון שמשותפים גם בנוגדן המכיל מרכיב היכול לייצר תרכובת פולטת אור, סרט הצילום שהוצמד לתספיג יושח. מקום ההשחרה ועוצמתה מעידים על גודלו של החלבון הנחקר וכמותו היחסית. באמצעות שיטה זו ניתן היה לגלות כי כמותו של החלבון p53 בתא עולה בעקבות נוכחותו בתא של אנטיגן T שמקורו בוירוס.

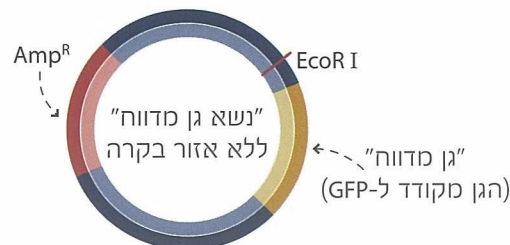
## תיבה 7.3 : נוגדנים ברפואה.

חקר באמצעות נוגדנים מאפשר לעתים ניצולם למטרות רפואיות. כך, בעקבות מחקר בסיסי ניתן להגות יישומים שיאפשרו לטפל במחלה מסוימת באמצעות נוגדן כנגד חלבון המזיק לגוף. טיפול כזה נועד לשבש את תפקודו המזיק של החלבון והוא נקרא **אימונתרפיה פסיבית** (ריפוי באמצעות חיסון סביל). חלבון המיוצר בִּיתר והעלול להיות בעל השפעה מזיקה הוא חלבון ה-Tn, שהצורה הגדולה שלו נמצאת בכמות גדולה בגידולים סרטניים אך לא בסביבת תאים נורמליים. בסביבת תאים נורמליים ניתן למצוא צורה קטנה של Tn שאיננה מזיקה. כיום נבחנת האפשרות להשתמש בנוגדן שמזהה אזור ייחודי בצורה הגדולה של Tn (הנעדר מהצורה הקטנה עקב שחבור חלופי) למטרות ריפוי סרטן. נוגדן שכזה אינו אמור לפגוע בתאים נורמליים.

## שאלה 7.2

נתבקשתם לקבוע את גבולות אזור הבקרה של גן מסוים שאתם חוקרים. בידיכם מקטע DNA שבקצותיו אתרי ההגבלה III Hind ו-I Not. אתם מתכוונים להחדירו לנשא שבו יש גן מדווח כדי לבחון אם הוא משמש כאזור בקרה פעיל בתאים נתונים. הנשא ובו הגן המדווח המתואר באיור **ש'-7.2** אינו מכיל אתרי III Hind ו-I Not. אתם מחליטים להחדיר לנשא זה מחבר ובו אתרי ההגבלה III Hind ו-I Not ולהשתמש באתר ההגבלה I EcoR שבנשא זה כאתר החדרת המחבר. למעשה, אתם נדרשים להכין מחבר שיש לו קצוות מדורגים של I EcoR ושהרצף שלו מכיל את אתרי ההגבלה III Hind ו-I Not. בנוסף אתם מתבקשים למקם שני נוקלאוטידים כלשהם המשמשים כרווח בין רצף אתר הגבלה III Hind לרצף אתר ההגבלה I Not.

1. מהו הרצף המדויק של כל אחד משני האוליגו-נוקלאוטידים שיש לייצר כדי שישמשו בבניית המחבר למטרה המוגדרת כאן? היעזרו בטבלה 2.1 שבפרק 2.
2. תארו את השלבים הנדרשים כדי לשבץ את המחבר לנשא ובו הגן המדווח, ולשבט נשא רקומביננטי רצוי.
3. קיבלתם את הנשא ובו מחבר וגן מדווח כאמור כאן. מה יהיו השלבים הנחוצים כדי לבחון אם המקטע המבודד שבידיכם ושבקצותיו אתרי III Hind ו-I Not, הוא אזור בקרה פעיל?



**איור ש'-7.2: הנשא שמאפשר לבדוק ייתכנות אזור בקרה במקטע DNA נבחן.**

ישנם 3 מקטעים שעל פי ההשערה מתפקדים כאזורי בקרה וכל אחד מהם שובץ בנשא ובו הגן המדווח המקודד ל-GFP. הנשאים הרקומביננטיים השונים הוחדרו לשני סוגי תאים כמתואר בטבלה. התאים ובהם הנשאים השונים הוארו באור כחול, והטבלה מציינת באילו מקרים נצפו תאים זוהרים בירוק.

סוג התאים		נשא ובו גן מדווח ומקטע "חוד"
תאים סרטניים	תאים נורמליים	
תאים ירוקים	אין זהירה בירוק	מקטע 1
תאים ירוקים	תאים ירוקים	מקטע 2
אין זהירה בירוק	אין זהירה בירוק	מקטע 3

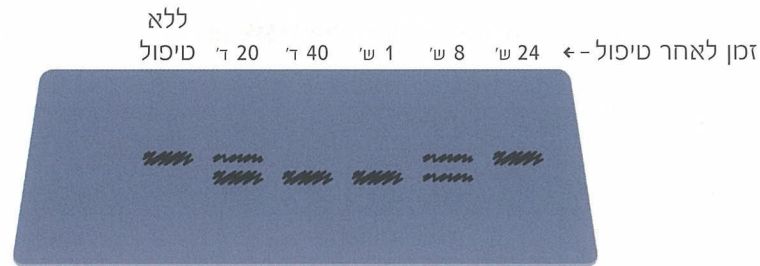
### צינו אילו מבין ההיגדים הבאים נכונים. תקנו את אלה שאינם נכונים.

1. מקטע מס' 1 משמש כאזור בקרה בכל סוגי התאים.
2. מקטע מס' 1 משמש כאזור בקרה בתאים סרטניים שנבחנו.
3. מקטע מס' 3 לעולם אינו יכול לשמש כאזור בקרה.
4. מקטעים מס' 1 ומס' 2 קושרים גורם תעתוק.
5. אין ביכולתו של מקטע מס' 3 לקשור גורם תעתוק.
6. בתאים סרטניים שבהם מקטע מס' 1 מיוצר RNA המקודד לחלבון ה-GFP.
7. גורם התעתוק הקשור למקטע מס' 1 בתאים הסרטניים קשור לרצף המצוי בפלסמיד.
8. גורם התעתוק הקשור למקטע 2 משפעל את ה-RNA פולימראז.
9. לאחר החדרה לתאים של הפלסמיד שבו מקטע 2 מצוי בסמיכות לגן המדווח, ייצרו כל התאים GFP והפיצו אור ירוק.

## שאלה 7.4

7.4

איור ש'-7.4 מתאר סרט צילום שנחשף לתספיג צפוני שעבר היברידיזציה עם גלאי הנגזר מהגן החביב עליכם, הגן X.



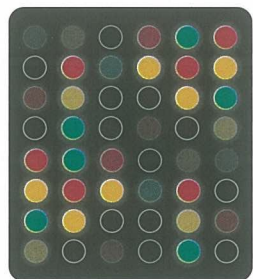
**איור ש'-7.4: תוצאת אפיון ביטוי RNA שמקורו בגן X (סרט צילום לאחר שנחשף לתספיג צפוני).**

### צינו אילו מבין ההיגדים הבאים נכונים. תקנו את אלה שאינם נכונים.

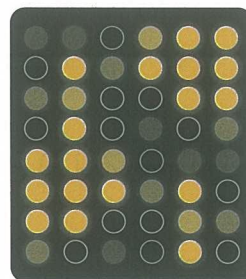
1. הפסים השחורים מייצגים מולקולות RNA שמקורן בגן X.
2. מקור השחרה של סרט הצילום הוא בגלאי DNA אחד שנקשר ל-3 סוגי מולקולות RNA.
3. בתאים ללא טיפול נראה כי מהגן X מיוצר סוג אחד עיקרי של מולקולות RNA.
4. כ-20 דקות לאחר התחלת הטיפול נראה כי בתאים מיוצרים שני סוגי מולקולות RNA שמקורם בגן X.
5. הפס השחור הנמוך מייצג עותקים של RNA שנוצר מן שונה מהגן X בעקבות הטיפול שניתן לתאים.
6. הפס הממוקם במקום הנמוך בסרט הצילום מייצג מולקולות RNA קצרה מזו שמיוצגת על ידי הפס הממוקם במיקום הגבוה.
7. כמות עותקי מולקולת ה-RNA הארוכה בתאים שלא טופלו זהה לזו שבתאים שנבחנו 20 דקות לאחר הטיפול.
8. שני הפסים באותה עמודה עשויים לייצג RNA תוצר שחבור ו-RNA תוצר שחבור חלופי.
9. בהמשך ל-8, מולקולת ה-RNA הקצרה של הגן X היא תוצר שחבור, ואילו מולקולת ה-RNA הארוכה שמקורה בגן X, היא תוצר שחבור חלופי.
10. במולקולת ה-RNA הקצרה שהיא תוצר שחבור חלופי ייתכן שחסר מקטע עם אקסונים קיימים במולקולת ה-RNA הארוכה.
11. בהמשך ל-8-10 הטיפול שנחשפו לו התאים מזרז שחבור חלופי ומונע את השחבור התקני.
12. נראה כי 8 שעות לאחר הטיפול שבו התאים "למסלולם הרגיל" והשפעת הטיפול פגה.

סיימתם את לימודיכם בהנדסה גנטית והתקבלתם לעבודה בחברה שתפקידה לבדוק אם תרופות המיועדות לשימוש בבני אדם הן בעלות תופעות לוואי כתוצאה מרעילות בלתי צפויה. החברה רשמה פטנט על פיתוח שלפיו היא זיהתה כי תרופות בעלות רעילות גורמות לשינוי בביטויים של 22 גנים בתאי כבד הגדלים בתרבית. זאת בהשוואה לביטוי הגנים הללו בתאי כבד שלא נחשפו לאותו החומר. גנים אלה וגנים אחרים מיוצגים באמצעות גלאים על גבי שבב DNA. בשבוע הראשון לעבודתכם נתבקשתם לבחון אם לאשר לשימוש שתי תרופות ניסיוניות.

1. מה הם השלבים בעבודתכם לבדיקת התרופות באמצעות שבבי DNA? תארו את עבודתכם משלב גידול התאים בתרבית ועד לקבלת תוצאה בשבב DNA.
2. בגמר השבוע הראשון לעבודתכם מצאתם כי בניסוי שבו נעשה שימוש בתרופה א' התקבלה התוצאה בשבב DNA כפי שהיא מתוארת בחלק א' של איור ש'-7.5. הסבירו את התוצאה. האם ניתן להשתמש בתרופה בבני אדם? נמקו.
3. מצאתם כי בניסוי שבו נעשה שימוש בתרופה ב' התקבלו התוצאות הנראות בחלק ב' של האיור. הסבירו את התוצאה. האם ניתן להשתמש בתרופה בבני אדם? נמקו.
4. כיצד תסבירו את העובדה כי אזורי מסוימים על השבבים נותרו שחורים?
5. כיצד תסבירו את העובדה כי בעיבוד התוצאות משבב א' יש אזורים בעלי עוצמות שונות של הצבע הצהוב?



ב.



א.

**איור ש'-7.5: תוצאה שהתקבלה לאחר היברידיזציה של DNA משלים מסומן לשבבי DNA.**

נתבקשתם לחקור ביטוי של 18 גנים מוגדרים ברמת ה-RNA וברמת החלבון בתאים מטופלים בהשוואה לתאים לא מטופלים. לשם כך נעזרתם בשיטה העושה שימוש בתספיג צפוני ובשיטה העושה שימוש בתספיג מערבי. התוצאות שקיבלתם היו כדלהלן:

אפיון גן	תוצאות בשיטה העושה שימוש בתספיג צפוני		תוצאות בשיטה העושה שימוש בתספיג מערבי	
	כמות יחסית של RNA בתא ביקורת	כמות יחסית של RNA בתא מטופל	כמות יחסית של חלבון בתא ביקורת	כמות יחסית של חלבון בתא מטופל
גנים נחקרים #7-1	++	++	+++	+++
גן נחקר #8	+	++	+	++
גן נחקר #9	+	+	+	+++
גן נחקר #10	+	++	+++	+++
גן נחקר #11	+++	-	+	-
גן נחקר #12	-	+++	-	+++
גנים נחקרים #18-13	-	-	-	-

- מהם הגנים שיתכן והתעתוק שלהם עולה בעקבות הטיפול?
- לגבי אילו גנים עשוי הטיפול לגרום להאטה בקצב הפירוק של החלבון שלו הם מקודדים?
- מבין הגנים שנחקרו, מהו אחוז הגנים שביטויים הושפע מהטיפול? מהו אחוז הגנים שביטוי החלבון שלהם השתנה בעקבות הטיפול? מהו אחוז הגנים שביטוי ה-RNA שלהם השתנה כתוצאה מהטיפול?
- הציעו שני מנגנונים מולקולריים בתא העשויים להסביר את השינוי בכמות ה-RNA של גן נחקר מספר 8 בעקבות הטיפול.
- הציעו שני מנגנונים העשויים להסביר כיצד הטיפול גורם לעלייה בכמות החלבון הנחקר שאותו מקודד גן מספר 9.
- האם ניתן לומר בוודאות כי תעתוקו של גן מספר 9 אינו משתנה בעקבות הטיפול?
- אם בידיכם אזור הבקרה של גן מספר 9 ונשא ובו גן מדווח, הציעו דרך לבדוק אם התעתוק של גן מספר 9 אכן מושפע מהטיפול או לא. הציעו מערך ניסיוני מפורט ככל האפשר.
- איזה גן מכלל 18 הגנים הנחקרים הוא לדעתכם המושפע ביותר מהטיפול? הניחו כי הטיפול הוא קרינה שאליה נחשפו התאים וכי התוצאה הביולוגית של הטיפול היא מוות של מקצת התאים. על פי תוצאה זו של הטיפול הציעו הגדרת תפקיד לגן שכזה.
- האם לדעתכם הגן שמספרו 11 עשוי אף הוא לתפקד בהגנה על התא מפני הטיפול?
- האם זה מעשי להמשיך ולאפיין את ביטויים של כל 20,000 הגנים בתא אדם בעקבות הטיפול בשיטה העושה שימוש בתספיג צפוני? נמקו והציעו חלופה, אם יש.



SDF-1 הוא חלבון המופרש אל מחוץ לתא. באיור ש'-7.7 מובא חלק מהרצף של הגן המקודד ל-SDF-1 ברצף מצוינת נקודת התחלת התעתוק (+1) וכן מודגש הקודון הראשון שמקודד לחומצה האמינית הראשונה בחלבון שממנו מתחילה מסגרת הקריאה הפתוחה. ברצף של אזור הבקרה, כלומר, משמאל לנקודת התחלת התעתוק סומנו אתרי הקישור של גורמי תעתוק שונים וצוינו שמותיהם.



**איור ש'-7.7: אזור הבקרה של הגן SDF-1.**

- א. מה תוכלו לומר על רצף הנוקלאוטידים שבין נקודת התחלת התעתוק ובין הקודון הראשון?
- ב. ידוע כי תעתוק הגן SDF-1 מתקיים בתא מסוים, תא א', אך לא ידוע אם הגן מתועתק בתא ב' ובאילו תנאים. לצורך כך שובצו מקטעים מאזור הבקרה של הגן לתוך נשא שבו הגן המדווח GFP. הנשאים

הרקומביננטיים שהתקבלו הוחדרו לתאים מסוג א' ו-ב' שגדלו בתנאי ביקורת או שנחשפו לטיפול מסוים. הניחו כי כאשר מקטע מסוים מאפשר לייצר חלבון GFP, הוא קושר גורם תעתוק המאפשר את ביטוי הגן התאי SDF-1. התוצאות המתארות ביטוי GFP לאחר טרנספקציה מובאות בטבלה הבאה:

ביטוי יחסי של GFP בתא ב'		ביטוי יחסי של GFP בתא א'		מקטע ה-DNA בסמוך לגן המדווח
לאחר טיפול	תנאי ביקורת	לאחר טיפול	תנאי ביקורת	
++	-	++++	++	F → A
-	-	++	++	F → D
++	-	++	-	D → B

האותיות האנגליות מעל הרצף מציינות את נקודת ההתחלה או הסיום של מקטעים שונים, כמצוין באיור ש'-7.7.

ענו על השאלות הבאות:

1. מה דומה ומה שונה בין ביטוי הגן SDF-1 בתא א' לבין ביטוי בתא ב'?
2. מה תוכלו לומר על תפקידו של מקטע ס-F בבקרת הביטוי של הגן SDF-1?
3. מה תוכלו לומר על קישור גורמי התעתוק ADF-1 ו-SP-1 לאזור הבקרה של הגן בתאים השונים ובתנאים השונים?
4. אילו גורמי תעתוק - אחד לפחות - עשויים להיות אחראיים על ביטוי הגן SDF-1 בתא א' בתנאי ביקורת אך לא בתנאים המתקיימים בעקבות טיפול?
5. מה תעשו כדי לקבוע במדויק מהם גורמי התעתוק - אחד לפחות - האחראיים על ביטוי רק בתנאי ביקורת?



### חומרים ותהליכים

- הפקת RNA וקיום תספיג צפוני
- הכנת שבבי DNA
- הפקת RNA, הכנת DNA משלים מסומן והיברידיזציה שלו לשבב DNA
- סימון רדיואקטיבי של חלבונים והשקעה באמצעות נוגדן לצורך אפיון בג'ל
- הפרדת חלבונים בג'ל והעברתם לפילטר לקבלת תספיג מערבי
- היברידיזציה של גלאי לגילוי RNA בתספיג צפוני
- היברידיזציה של DNA משלים מסומן לגלאים שעל שבב DNA
- שימוש בנוגדן זוהר כגלאי בתספיג מערבי

### גנים המקודדים לחלבונים ייחודיים

- גורם תעתוק (מסוים)
- GFP - חלבון זוהר בירוק
- הגנים הייחודיים ששמותיהם הם: p53, PDGF, Ras, Myc וגנים אחרים

### יישומים

- אפיון ביטוי גנים שנחוצים לחלוקת תאים באמצעות תספיג צפוני או RT-PCR
- חקר הסוכרת בעזרת שבבי DNA
- אבחון סוגי סרטן שונים באמצעות אפיון ביטוי בעזרת שבבי DNA

### כלים ב"ארגז הכלים"

- גן מדווח (Reporter gene)
- מחבר (Poly-linker)
- ג'ל אגרוז להפרדת מולקולות RNA
- תספיג צפוני (Northern blot)
- גלאי DNA (DNA probe)
- RT-PCR
- שבבי DNA (DNA microarrays)
- נוגדן (Antibody)
- השקעה באמצעות נוגדן
- ג'ל אקרילאמיד להפרדת חלבונים
- תספיג מערבי (Western blot)

### מושגים ומונחים

- ביטוי גן (Gene expression)
- אזור בקרה (Promoter)
- גורם תעתוק (Transcription factor)
- אתר קישור לגורם תעתוק
- מסלול להולכת אותות (Signal transduction pathway)

### גישות מחקר ועקרונות

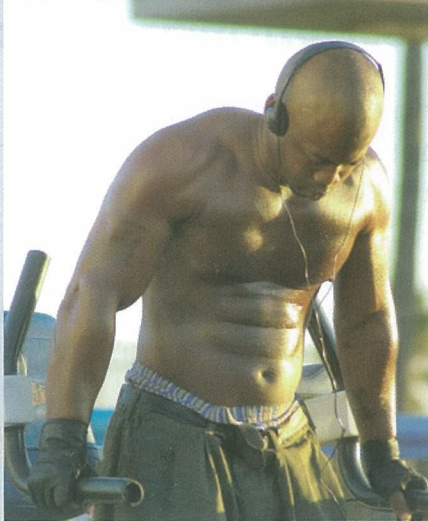
- אפיון ביטוי גן אחד
- אפיון ביטוי גנים רבים במקביל ברמת ה-RNA
- מיקום הביטוי, עוצמת ועיתוי הביטוי של גן משמשים להגדרת תפקידיו של הגן
- ניתן לאפיין ביטוי RNA בשלוש שיטות: בעזרת תספיג צפוני, בעזרת RT-PCR ובעזרת שבבי DNA
- אפיון ביטוי חלבונים



# הנדסת תאים ואורגניזמים לצורכי מחקר וליישומים ביוטכנולוגיים



## להיות חוקי וגם בריא ספורט בלי סמים!



בעידן ההנדסה הגנטית ניתן להשתמש בתאים כ"בתי הרושת" כדי לייצר כמויות גדולות של חלבונים רקומביננטיים המשמשים כתרופות. ספורטאים שמונסים לשפר את ביצועיהם "גילו" כמה חלבונים רקומביננטיים כאלה, והם נוטלים אותם לצורך שיפור הישגיהם. אחד מהחלבונים שנעשה בו שימוש לא חוקי הוא הורמון הגדילה הרקומביננטי. כאשר הוא מוזרק לבוגר בכמות הגדולה פי 25 מזו הנצרכת על ידי ילד מטופל, הוא מאפשר להעלות את מסת השרירים ובכך מעניק יתרון כוח. קשה מאוד לגלות בדם עקבות של הורמון רקומביננטי זה המשמש כסם. הספורטאים המשמשים בחלבונים רקומביננטיים במינונים גבוהים השופים לסכנות בריאותיות ובכלל זה סרטן.

אחד היישומים המרכזיים של ההנדסה הגנטית הוא חקר תפקידיהם של הגנים. לאחר שמושניים לגן תפקידים, ניתן בין היתר לבחון אם אפשר לנצל את הגן כדי לייצר תרופה. תרופות רבות שהתקבלו בעזרת ההנדסה הגנטית הן למעשה חלבונים רקומביננטיים, כדוגמת האינסולין המיוצר בחיידקים. חשוב לא פחות הוא ניצול ההנדסה הגנטית כדי להשביח אורגניזמים לתועלת האדם. כמתואר באיור 8.1, כדי לממש יישומים ביוטכנולוגיים מתקדמים אלה ואחרים, יש להתקדם בשלושה מסלולים עוקבים עיקריים. ראשית, יש לשבט גנים רלוונטיים, ולשם כך מתקדמים ב"מסלול א'": "מ-DNA לגן משובט". לאחר ששובט גן,

מתקדמים ב"מסלול ב'": "מגן - לקביעת תפקידיו של גן", כלומר, פועלים לגילוי מונון תפקידיו של הגן. כך בקצרה ניתן לנצל גן משובט כדי לייצר בתא כמויות עודפות של תוצריו (RNA וחלבון או רק RNA). במקביל, הימצאותו של גן משובט מאפשרת השתקת ביטוי החלבון שאותו הוא מקודד. חקר השינוי בתפקוד התא שנגרם כתוצאה מביטוי-יתר (מייצור עודף) של תוצר גן, כמו גם חקר התנהגות התא כתוצאה מהשתקת ביטוי של תוצר גן, משמשים להגדרת **תפקידי הגן** ותוצריו.

ניתן לשלוט בביטוי הגן לא רק בתא הבודד אלא גם באורגניזם השלם. לכן כאשר בוחנים את השפעת ויסות הביטוי של גן באורגניזם השלם, ניתן לשאול, לדוגמה, אם השתנה גודלו של האורגניזם או אם השתנתה התנהגותו ועוד. משנמצאו תפקידיו של גן **בתא ובאורגניזם**, ניתן לעתים לנצל את הגן לצורך **יישום ביוטכנולוגי** על פי מסלול ג': "מתפקידיו של גן ליישום ביוטכנולוגי". פרק זה עוסק במגוון העקרונות והגישות הניסיוניות המשמשות כדי להגדיר את תפקידיו של גן (הסיכום מובא באיור 8.18). הפרק גם ממחיש כיצד נמצאו תפקידי גנים מוגדרים וכיצד גנים בעלי תפקיד ידוע נוצלו ליישומים ביוטכנולוגיים.

(-): גנצ'יק: שמעת! בשכונה שלנו עברו להתגורר כמה ממדעני גנטוכון.

גנטין: ואתה פוחד שחלק מהם עוסקים בשיבוט?

גנצ'יק: בדיוק! ממש לא הייתי רוצה שמישהו מהם ישבט אותי!

גנטין: אין לך ממה לדאוג, יש דרכים לדעת מי מהם עוסק בשיבוט אורגניזמים...

■ אם אתה מחבב את הכלב שלו הוא יציע לך אחד כמותו.

■ הוא לא נשוי ויש לו 17 בנים.

■ כשלאשתך ייולדו תאומות, הוא יקרא לך "חובבן"!

■ אתה מביט מהחלון ורואה את עצמך שוטף לו את המכונית...

גנצ'יק: עכשיו ממש, אבל ממש הרגעת אותי...

## כש-DNA רקומביננטי וכסף נפגשים: "לידת" הביוטכנולוגיה המודרנית

השנה היא 1976, ארבע שנים לאחר שכהן ובויר הגו את רעיון השיבוט באמצעות פלסמידים וחיידקים והוכיחו שטכנולוגיית ה-DNA הרקומביננטי אפשרית. שנה זו זימנה להרברט בויר פגישה היסטורית נוספת והפעם עם יזם ואיש עסקים בשם בוב סוונסון (Bob Swanson). בויר, בניגוד לאחרים, שוכנע על ידי סוונסון שיש דרך להשתמש בטכנולוגיה זו לצורך יישומים כלכליים. הרעיון העסקי שעמד לנגד עיניהם של השניים היה כמוקד:

להשתמש ב"טכנולוגיית כהן-

בויר", טכנולוגיית DNA רקומביננטי,

כדי לייצר **בחיידק** חלבונים של

**אדם** בעלי ערך רפואי ושיווקי. הם

העריכו כי לשם כך יש לשבץ את

ה-DNA המקודד לחלבון הרצוי של

אדם בסמיכות ל-DNA שבו אזור

הבקרה של חיידק, וכל זאת בתוך

□ עד 1978 נהוג היה להפיק אינסולין מלבלב של בעלי-חיים ובעיקר מלבלב של חזיר. הפקה וניקוי של אינסולין מלבלב של חזיר כדי לטפל בחולי סכרת הוא ללא ספק אחד מהישגיה המרשימים של התעשייה הביוטכנולוגית המסורתית בשנים 1922-1978. תכונותיו של אינסולין מלבלב של חזיר השתפרו אמנם עם השנים, אך השימוש בו נותר בעייתו בשל תופעות לוואי ועלות גבוהה יחסית. לו הפקנו אינסולין מלבלבי חזיר גם כיום בכמות המספיקה לכ-10 מיליון אנשים שקיומם תלוי בו, היה צורך ב-10 מיליארד לבלבי חזירים בשנה.

נשא מתאים. בגמר תהליך הטרנספורמציה של חיידקים עם פלסמיד רקומביננטי שכזה צפוי שהחלבון הרקומביננטי האנושי הרצוי יתבטא בחיידקים. בויר וסוונסון ידעו כי קיימת דרישה עצומה לחלבון האינסולין וכי משום כך ייצרו בחיידקים עשוי להניב פרות כלכליים.

פרקים 2-6	פרקים 5, 7-8	פרק 8	פרקים 2-6
מסלול א'	מסלול ב'	מסלול ג'	מסלול ד'
DNA	גן משובט	קביעת תפקידיו של גן	יישומים ביוטכנולוגיים מבוססי הנדסה גנטית

### איור 8.1: הדרישות להגשמת יישומים ביוטכנולוגיים מבוססי הנדסה גנטית.

בתרשים זה מובאים מסלולי המחקר והפיתוח העיקריים שהם הבסיס לקיומה של ביוטכנולוגיה מבוססת הנדסה גנטית. ביוטכנולוגיה מתקדמת שכזו מאפשרת, בין היתר, השבחת אורגניזמים בעזרת ביטוי יתר של גנים מסוימים או השתקת ביטויים של אחרים. כמו-כן מקצת הגנים שתפקידם מאופיין יכולים לשמש לייצור תרופות, ולעתים גנים עשויים לשמש לריפוי גני.

אחד מהישגיה הבולטים של הביוטכנולוגיה המבוססת על ההנדסה הגנטית הוא ייצור של אינסולין אנושי בחיידק. יישום ביוטכנולוגי שכזה מאפשר לקבל אינסולין באיכות מעולה, בכמויות גדולות ובמחיר זול יחסית. לצורך ביטוי של חלבון אדם בחיידק, יש להחדיר לחיידק נשא מתאים שבו שובץ DNA אנושי המקודד לחלבון הרצוי. כדי לממש יישום ביוטכנולוגי בעל עיקרון דומה, יש לפעול על פי שלושת המסלולים המפורטים באיור 8.1.

השאיפה להתמקד בייצור אינסולין של אדם בחיידקים באמצעות DNA רקומביננטי לוותר בתקוות רבות. אחת התקוות הייתה שניתן יהיה לייצר כמויות גדולות של אינסולין בתא חיידק ושהפקתו מהחיידקים תהיה קלה וכלכלית. וכך, למרות הקשיים הצפויים ולמרות שבשנת 1976 לא שובט עדיין ה-DNA המקודד לאינסולין, השקיעו סוונסון ובויר 500 דולר כל אחד לשם הקמת החברה הביוטכנולוגית הראשונה בעולם שעתידה הייתה להתבסס על הנדסה גנטית. שם החברה היה **Genentech (ג'ננטק)**.

ההצלחה לא איחרה לבוא. בשנת 1978, יום לאחר שהופק בג'ננטק אינסולין אדם שמקורו בחיידקים, מכרה **ג'ננטק** את זכויות השיווק של האינסולין לחברת **לילי (Lilly)**, אשר שלטה בשוק ייצור האינסולין מלבליים. בשנת 1980 הונפקה ג'ננטק בבורסה האמריקנית, וביום הראשון למסחר במניותיה פתחה המניה במחיר התחלתי של \$35 ועלתה למחיר של \$89 למניה, שיא היסטורי באותם זמנים למניה אחת ביום אחד. בויר וסוונסון הרוויחו בגדול ו"שווים" היה 85 מיליון דולר כל אחד. עובדים רבים אחרים שקיבלו מניות במקום חלק משכרם התעשרו אף הם.

□ הסיבה לכך שהאינסולין נחשב לגולת הכותרת של המוצרים המיוצרים בשיטות של הנדסה גנטית היא כי פלח השוק שזקוק לחלבון זה הוא עצום. לשם המחשה, בשנת 2007 נאמד שוק זה בעולם בכ-10 מיליארד דולר.

בעקבות ג'ננטק קמו חברות נוספות שעשו שימוש

בטכנולוגיית ה-DNA הרקומביננטי. החברות נזקקו לידע שנצבר באוניברסיטאות, ומהר מאוד הסתבר שחוקרים במוסדות מחקר אקדמיים יכולים להיות שותפים ליוזמות ביוטכנולוגיות רווחיות. כיום מדענים משמשים כיועצים בחברות ביוטכנולוגיות ולעתים אף עוזבים את מוסדות המחקר האקדמיים לטובת קריירה בחברות ביוטכנולוגיות.

שנת 1980 הייתה שנת מפנה לא רק בשל הנפקתה המוצלחת של ג'ננטק בבורסה, אלא גם מכיוון שבשנה זו התקבל אישור של מכון הבריאות האמריקני לייצר חלבונים נוספים בחיידקים. חלבונים אלה היו הורמון הגדילה האנושי (Human Growth Hormone) (פרק 4) והחלבון המדכא את פעילותו של הורמון הגדילה הנקרא סומטוסטטין (Somatostatin). הורמון הגדילה ניתן לילדים שגופם אינו מייצר כמות מספקת של ההורמון. אם לא יסופק להם הורמון זה, יישארו ננסיים. הורמון הגדילה מסייע גם באיחוי עצמות שבורות ובטיפול בסוגי פצעים מסוימים. בארצות הברית לבדה נזקקים כ-10,000 ילדים להורמון זה. לעומת זאת, סומטוסטטין המיוצר אף הוא בחיידקים, משמש לטיפול באנשים שאינם יכולים לייצר הורמון זה ושעלולים להפוך ל"ענקים" אם לא יקבלו אותו.

□ לפני שהתאפשר לייצר את הורמון הגדילה בחיידקים, היה צורך להפיק אותו מבלוטות יותרת המוח שמקורן בנפטרים. כדי לספק את צורכיהם של 1000 ילדים, נותחו 70,000 גופות בשנה. הייצור של הורמון הגדילה בחיידקים הוזיל את העלויות והבטיח אספקה סדירה ואיכותית של הורמון זה.

האפשרות לייצר כמויות ניכרות של חלבון, כלומר **ייצור-יתר של חלבון (Protein overproduction)** בחיידקים למטרות רפואיות, העלתה לסדר היום את האפשרות להשתמש בתרבויות תאים של בעלי-חיים כדי לאפשר ייצור-יתר של חלבונים שעשויים לשמש כתרופות. אחד החלבונים שאותו מייצרים בעודף בתאים של יונק הגדלים בתרבייה, הוא הורמון אריתרופויטין (Erythropoietin) או בקיצור EPO. הורמון זה מיוצר על ידי הכליות בכמויות קטנות, מופרש לזרם הדם ובאמצעותו מגיע למוח העצמות, שם הוא מזרז יצירת תאי דם אדומים.

מדעני חברת אמג'ן (Amgen) הצליחו להחדיר פלסמיד ובו הגן המקודד ל-EPO לתאים הגדלים בתרבית. התאים אפשרו ביטוי-יָתֵר של הורמון ה-EPO, ולאחר שהופק ההורמון מתאים אלה התברר כי הוא פועל בדיוק כמו ה-EPO המיוצר בגוף. ה-EPO המיוצר בשיטות של הנדסה גנטית ושמוזרק לבני אדם, מצליח להעלות את מספר תאי הדם האדומים בחולים אנמיים וחוסך את הצורך במתן עירוי דם. ה-EPO הוא תרופה יקרה יחסית, ומחזור המכירות השנתי שלו נמדד במיליארדי דולרים. אולם מסתבר שצרכניה של התרופה הם לא רק חולים (ראו תיבה 8.1).

כיום קיימים בשוק כ-30 חלבונים המיוצרים בשיטות של הנדסה גנטית והמשמשים כתרופות. חלבונים אלה הם ברובם המכריע הורמונים, גורמי גדילה וחלבונים המווסתים את תגובת המערכת החיסונית. כ-300 חלבונים נוספים נמצאים בתהליכים לבדיקת הפוטנציאל שלהם לשמש כתרופות. מספר זה מייצג כמאית בלבד ממספרם של הגנים באדם, ודבר זה מעיד על פוטנציאל אפשרי נוסף הטמון בתחום זה.

### מחקר תפקידיהם של גנים נועד לאתר גנים

נוספים שניתן לנצלם לפיתוח תרופות. עקרונות המחקר אודות תפקידיהם של גנים שונים מובאים בסיפור המסגרת הפרוש על פני הפתיחים של הפרקים השונים בספר, ובאזור 8.18. ניתן לסכם את העקרונות כך: כדי להגדיר את מגוון התפקידים של גן, שואפים בין היתר לווסת את ביטוי הגן (להעלות את ביטויו או להשתיק אותו בעזרת ההנדסה הגנטית). לרוב ביטוי-יָתֵר של גן כמו גם מניעת ביטויו מאפשרים לבחון כיצד משתנה התנהגותם של התא והאורגניזם, ומתוך כך אפשר להסיק על תפקידיו של הגן הנחקר. מדי פעם מוליך מחקר

כזה לאיתור גן שהוא בעל חשיבות בתחום הרפואי. גן הופך לבעל חשיבות רפואית כאשר ויסות כמות התוצר שלו בגוף (הגברה או הפחתה של כמותו בגוף), יביא לשיפור במצבו הרפואי של הפרט. איך מווסתים את ביטויים של תוצרי הגן בתא? כלומר, איך שולטים בביטוי של תוצרי הגן בתא?

□ הצורך לייצר חלבונים רקומביננטיים מסוימים (חלבונים המיוצרים בעזרת שיטות של DNA רקומביננטי) בתאים של בעלי-חיים שבתרבית ולא בחיידקים נובע מכך שלא כל חלבון אנושי המתבטא בחיידק מתקבל בו בצורתו הפעילה. לדוגמה, חלבונים רבים פעילים רק לאחר שצומדו להם שיירים סוכריים מסוימים במקומות מתאימים על פני החלבון. דבר זה אינו מתרחש בחיידקים מכיוון שהם חסרי אנזימים המסוגלים לעשות זאת. מלבד זאת לא כל חלבון אנושי מתקפל בצורה נכונה בתא החיידק. קיפול ומבנה שלישוני לא-נכונים פירושים היעדר פעילות חלבונים תקינה.

□ יתרונו של השימוש בתאים שבתרבית למטרות ביטוי-יָתֵר הוא בזה שתאים אלה מתחלקים במהירות המאפשרת להגביר את קצב ייצור החלבון הרקומביננטי.

□ כאשר הכליות נפגעות ויש צורך בטיפול דיאליזה, נפגע גם ייצור האריתרופטיין (EPO). החולים מפתחים אנמיה חמורה (חוסר בתאי דם אדומים) המתבטאת בחולשה קיצונית, וכל זאת בשל מחסור בחמצן זמין. גם חולי סרטן הנזקקים לטיפולים כימותרפיים עלולים לפתח אנמיה. כך EPO רקומביננטי מציל את חייהם של חולי סרטן וחולי כליה.

□ תהליך מחקר ופיתוח שנועד להביא ל"קו הגמר" חלבון מסוים כתרופה, הוא יקר מאוד. עלותו נאמדת ביותר ממיליארד דולר לחלבון, וזאת בעיקר בשל הצורך בניסויים קליניים מורכבים לקראת אישור התרופה.

□ כיום יש במעבדות המחקר בעולם אלפי גנים שאותם תוצריהם מבטאים ביתר או מונעים במתכוון את ביטויים.



## □ תיבה 8.1: סמים ממקור לא צפוי - חלבונים שנוצרו בעזרת ההנדסה הגנטית.

עבור אתלטים המשתתפים בתחרויות, סמים לא חוקיים להגברת ביצועים הם פיתוי שקשה לעמוד בפניו. ידוע זה מכבר שסמים כגון סטרואידים מגבירים ביצועים גופניים מסוימים. קל למדי לגלות סמים אלה בבדיקות. בעידן ההנדסה הגנטית בתחום הרפואה החלו אתלטים להשתמש לפחות בשני חלבונים רקומביננטיים היכולים לשמש להגברת ביצועים שקשה לגלותם אצל נבדקים. האחד הוא לא אחר מאשר הורמון הגדילה, והאחר הוא ה-EPO. כשהורמון הגדילה מוזרק לבוגרים בכמות הגדולה פי 25 מזו הנצרכת על-ידי ילדים, הוא מעלה את מסת השרירים ואת גודלם ובכך מעניק יתרון כוח למשתמשים בו.

באמצעות ה-EPO הספורטאים העבריינים מגדילים את ריכוז תאי הדם האדומים בדמם, דבר אשר מגדיל את אספקת החמצן לשרירים. כך נוטלי EPO משפרים את הביצועים האתלטיים בענפי ספורט המצריכים יכולת אירובית טובה כגון ריצות למרחקים ארוכים, שחייה ומירוצי אופניים. יש לציין כי הספורטאים המשתמשים בחלבונים רקומביננטיים אלה במינונים גבוהים הנדרשים לשיפור ביצועים חשופים לסכנות בריאותיות ובכלל זה סרטן.

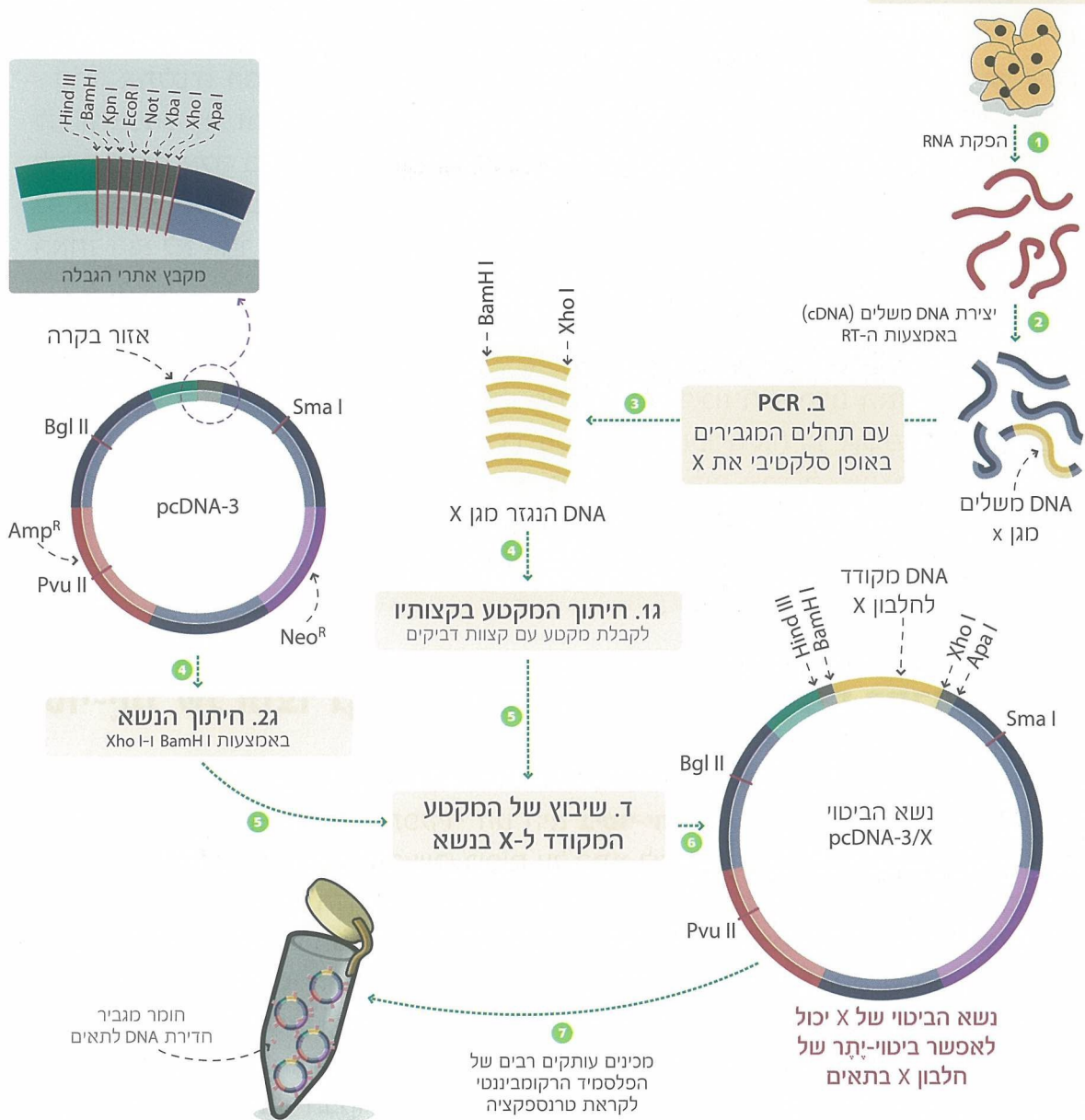
## ביטוי-יָתֵר של תוצר גן בתאים של בעלי-חיים הגדלים בתרבית

שיבוט גן ושיבוט ה-DNA המשלים שלו מאפשרים ביצוע מגוון ניסויים שנועדו לקביעת תפקידי הגן. אחת הפעולות הראשונות לגילוי תפקידי הגן היא **ביטוי-יתר** (Over-expression) של הגן בתאים. ניתן להגדיר ביטוי-יתר של גן בתא כמצב שבו כופים על התא לייצר כמות גדולה (עודף) של תוצר הגן (RNA וחלבון או רק RNA). אחת הדרכים למימוש ביטוי-יתר בתאים של בעל-חיים מתחילה בשיבוץ של הגן - או של מקטע ה-DNA המקודד לחלבון הרצוי - בתוך נשא מתאים הנקרא נשא ביטוי. **נשא ביטוי** (Expression Vector) טיפוסו הוא פלסמיד בעל אזור בקרה מתאים שבסמיכות לו ממוקם הגן/ה-DNA המשלים שמעוניינים בביטוי. כדי להשלים את המהלך לביטוי-יתר של ה-DNA הרצוי, לצורך יצירת החלבון הרצוי בתא, לדוגמה, מחדירים את נשא הביטוי הרקומביננטי לתאים. ביטוי החלבון הרצוי בתאים יתאפשר בתיוכם של אזור הבקרה מהנשא ושל גורמי תעתוק תאיים הנקשרים אליו. משהתקבל ביטוי-יתר של תוצר הגן המסוים, בודקים את תגובת התא לביטוי-יתר זה במטרה להגדיר את תפקידי הגן.

כאמור, כדי לבטא בתאים מקטע DNA מסוים, יש לשבץ בנשא שיכול לאפשר ביטוי שלו. ניתן לבצע שיבוץ שכזה באמצעות תהליכים בסיסיים המתוארים בפרק 3. כמתואר שם, ניתן לחתוך את הנשא ואת ה-DNA המיועד לשיבוץ באותם אנזימי הגבלה כדי לאפשר קשירה בין ה-DNA הרצוי ובין הנשא.

כדי להשיג ביטוי-יתר של חלבון, ניתן להשתמש ב-DNA משלים של גן נחקר. כדי לשבץ DNA משלים בנשא ליצירת נשא ביטוי, אפשר לנצל את תהליך ה-**RT-PCR** (איור 8.2). כך, כמתואר באיור 8.2, בשלב הראשון מסיקים RNA מתאים שבו מתבטא הגן הרצוי ומייצרים DNA משלים. בשלב הבא משמש

א. הכנת DNA משלים



**איור 8.2: ניצול RT-PCR כדי לייצר נשא רקומביננטי שנועד לאפשר ביטוי-יתר של חלבון.**

הנשא pcDNA-3 מאפשר ביטוי של DNA רצוי (יצירת RNA וחלבון הנגזר ממנו) בתאים של יונק. לצורך ביטוי באמצעות נשא זה, יש לשבץ בו את מקטע ה-DNA הרצוי, לרוב DNA משלים הנגזר מוגן, לשם כך מקובל להכין DNA משלים (שלב א') ולבצע הגברה של ה-DNA הרצוי באמצעות PCR (שלב ב'). לצורך כך משתמשים בתחלים שברצף שלהם קיים ייצוג הרצף ה-DNA הרצוי. מנצלים אתרי הגבלה בקצוות המקטע שהוגבר כדי לשבץ לתוך הנשא pcDNA-3 (שלב ג' ו-ד'). במהלך 7 מכינים את נשא הביטוי הרקומביננטי להחדרה לתאים כדי לאפשר ביטוי-יתר של החלבון הרצוי.

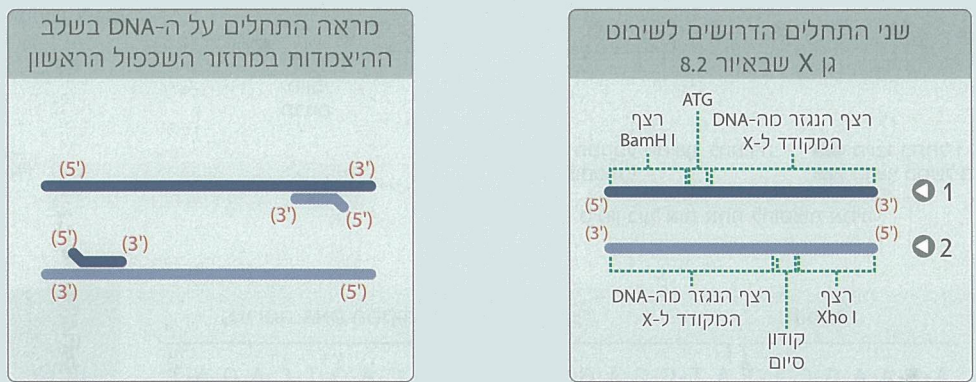
Amp<sup>R</sup> - הגן המוקנה עמידות לאנטיביוטיקה אמפיצילין; Neo<sup>R</sup> - הגן המוקנה עמידות לאנטיביוטיקה G418.

כמתואר באיור 8.2, נשא ביטוי יש אזור בקרה שמאפשר תעתוק של הגן בתא המקבל. כדי להשיג ביטוי-יתר של חלבון בתאים מקובל להשתמש ב-DNA משלים המיועד לשיבוץ בנושא הביטוי בסמיכות לאזור הבקרה. כדי להשיג DNA משלים אפשר לבצע RT-PCR (איור 8.2 א'-ב'). כך מפיקים RNA, מייצרים DNA משלים ואחר כך מגבירים מקטע DNA משלים רצוי באמצעות PCR.

ה-DNA המשלים להגברה סלקטיבית של ה-DNA הרצוי שמעוניינים להחדירו לנשא. עושים זאת באמצעות תחלים המכילים רצפים שנגזרים מה-DNA הרצוי. משבצים את המקטע שהתקבל ב-PCR לנשא מתאים, ומתקבל נשא ביטוי (איור 8.2). אם למקטע שרוצים לשבץ בנשא אין אתרי הגבלה בקצותיו, ניתן לשתמש ב-PCR מיוחד "תיבה 8.2).

**תיבה 8.2: PCR מוסיף אתרי הגבלה" מיינעל שיבוך מקטע DNA בנשא.**

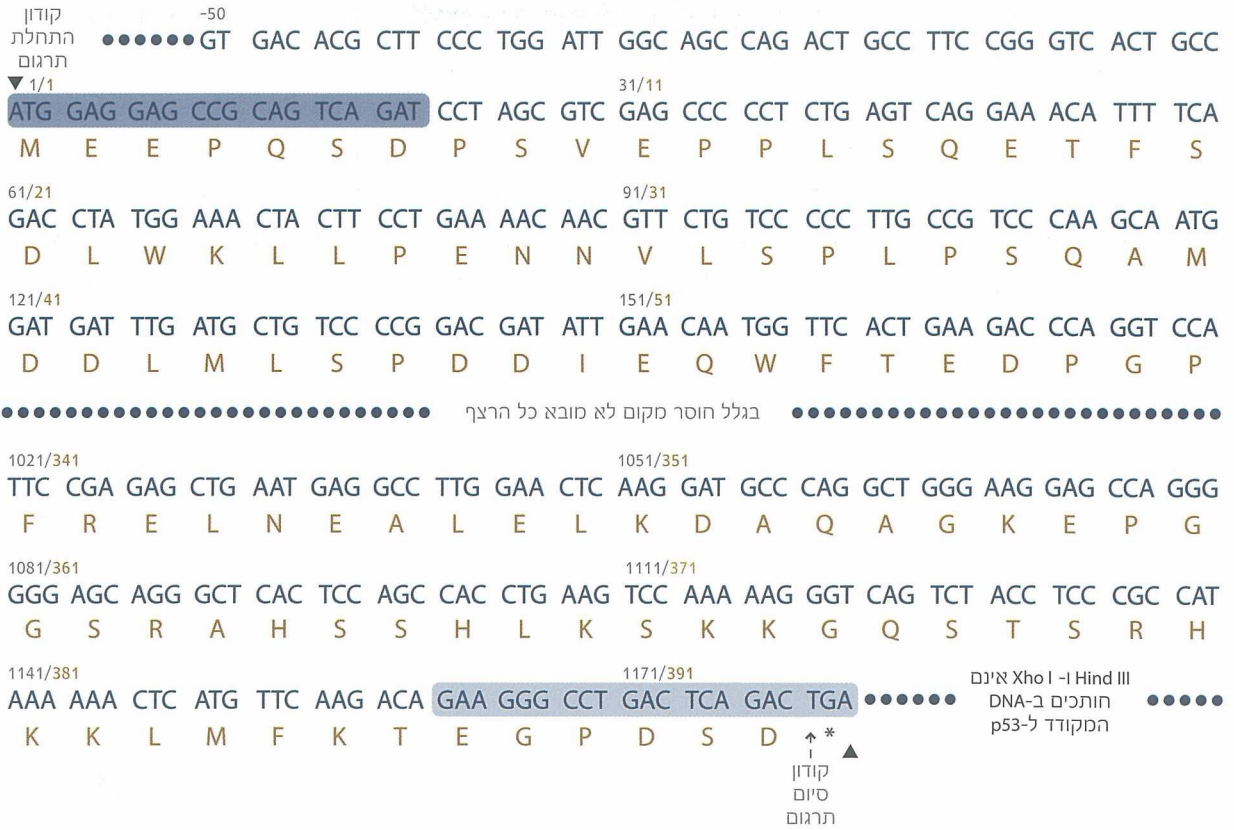
כדי להחדיר מקטע DNA מוגדר לנשא, ניתן להיעזר ב-PCR. אם מקטע ה-DNA שאותו רוצים להחדיר אינו מכיל בקצותיו אתרי הגבלה מתאימים שיכולים לשמש לקשירה ושיבוץ בנשא, ניתן להשתמש בתחלים מיוחדים. כך ניתן לקיים PCR עם תחלים שבהם רצף הנגזר מה-DNA הרצוי (שקובע את גבולות המקטע שיוגבר) ובצמוד לו רצף אתר הגבלה שממקמים אותו בקצה התחל. PCR באמצעות תחלים שכאלה הוא שימושי, מכיוון שלאחר ההגברה מתקבל המקטע הרצוי כשבקצותיו תוספת מלאכותית של אתרי הגבלה רצויים. בשלב הבא ניתן להשתמש באנזימי הגבלה כדי לחתוך את המקטע - תוצר ההגברה - באתרי ההגבלה שהוספו בקצותיו ואז לשבצו בנשא (איור 8.2). את התהליך מתחילתו ועד סופו מכנים **שיבוט באמצעות PCR מוסיף אתרי הגבלה**". ניתן להמחיש שיבוט באמצעות PCR מוסיף אתרי הגבלה" באמצעות המקרה הפרטי של שיבוט ה-DNA המקודד p53 (איור 8.3).



לאחר שהתקבל נשא הביטוי הרקומביננטי, נערכים להחדרתו לתאים כדי לאפשר את ביטוי ה-DNA הרצוי שבו. את החדרת הנשא או כל חומר גנטי אחר עושים בתהליך הנקרא **טרנספקציה**

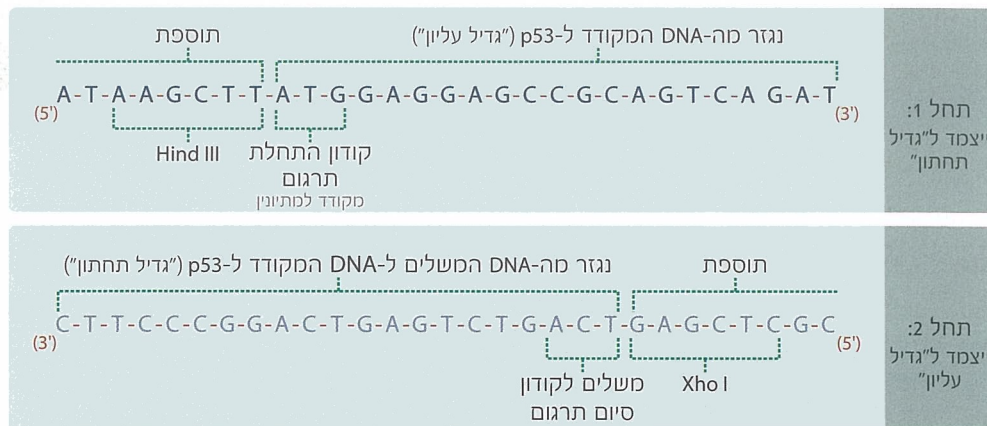
(Transfection). בטרנספקציה טיפוסית עושים שימוש בתרכובות כימיות (כגון CaPO<sub>4</sub> או אחרות) שנועדו לסייע בהחדרה יעילה של ה-DNA לתאים. בחלק מהמקרים התרכובות פוערות חורים זעירים בקרום התא, שדרכם חודר ה-DNA, חורים שאחר כך עוברים איחוי. משהוחדר לתאים נשא הביטוי הרקומביננטי המכיל מקטע DNA מקודד רצוי, מתאפשר ביטוי-יֵתֵר של RNA וחלבון. ביטוי-יֵתֵר של ה-RNA והחלבון הרצוי מתקיים בשל העובדה שהנשא מכיל אזור בקרה "חזק" (איור 8.2). אזור הבקרה שבנשא הביטוי קושר ביעילות רבה גורמי תעתוק תאיים המתפקדים בשפעול תעתוק.

על פי אחת הדרכים האלטרנטיביות להחדרת DNA לתאים עושים שימוש בזרם חשמלי, הפוער אף הוא חורים קטנים בקרום התא ואלה מאפשרים ל-DNA לחדור לתא. שיטה זו נקראת "אלקטרו-פורציה" (Electroporation). המילה האנגלית pore משמעותה "חור".



▲▼ גבולות המקטע הסיועד להגברת (ללא תוספות) מיוצג בתחיל 1  
 ● הרצף המשלים מיוצג בתחיל 2

T, A, S, R, ... סימון בעל אות אחת לחומצות אמינו

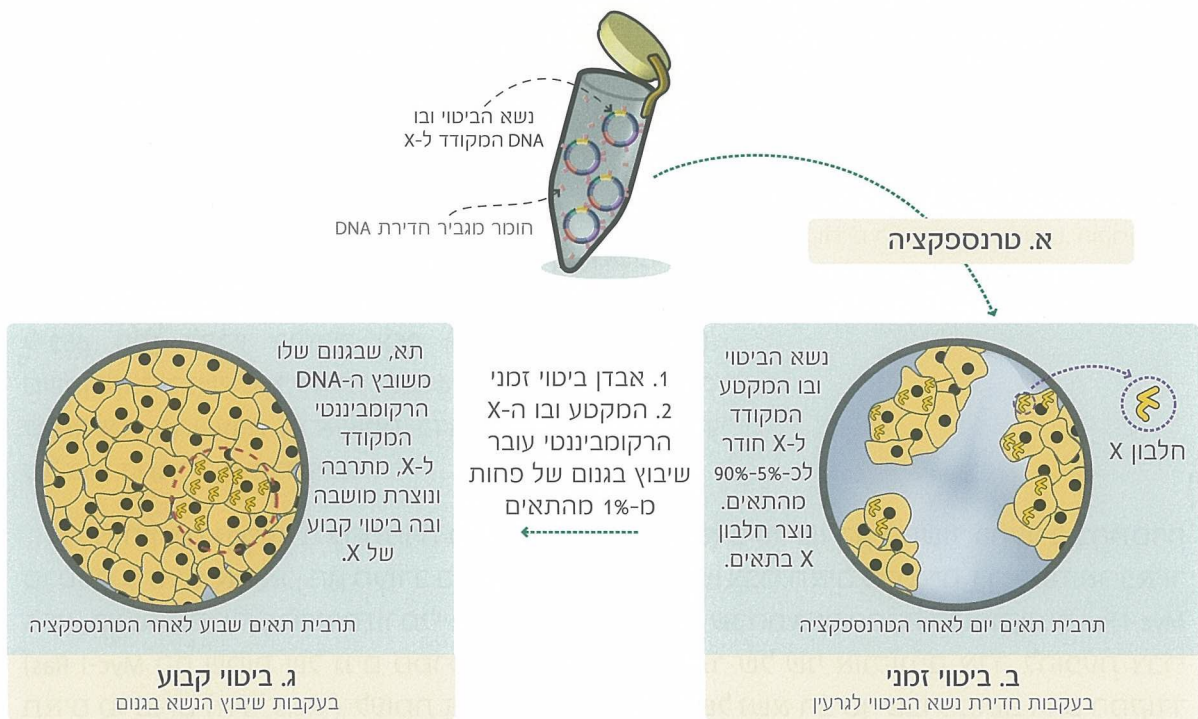


**איור 8.3: תכנון תחלים לצורך קיום "PCR מוסיף אתרי הגבלה": המקרה הפרטי של הגן המקודד ל-p53.**

רצף ה-DNA שמקורו בגן המקודד ל-p53 מופיע בכול, ורצף החלבון p53 בחום. רצף ה-DNA המתואר הוא של הגדיל המקודד ("הגדיל העליון"). התחלים הסיועדים להגברת של מקטע ה-DNA המקודד ל-p53 מכילים גם "תוספת" שהיא רצף אתר הגבלה. "תוספת" זו נועדה לאפשר את הגברת המקטע הרצוי, כך שבקצותיו יתקבלו אתרי הגבלה מלאכותיים רצויים. אתרי הגבלה אלה משמשים לחיתוך המקטע המוגבר בקצותיו כדי לשבץ את המקטע בנשא פלסמידי מתאים.

**טרנסקריפציה** הוא תהליך שבו מוחדרות חומצות גרעין (DNA או RNA) אל תוך התא. משהוחדר נשא הביטוי ובו ה-DNA המשלים הרצוי לתאים, מתאפשר בתאים ביטוי של RNA וחלבון. הביטוי מתאפשר בשל נוכחות אזור בקרה בסמיכות ל-DNA המשלים. לאזור בקרה זה נקשרים גורמי תעתוק המפעילים את ה-RNA פולימראז.

בעקבות הטרנספקציה התאים קולטים לתוכם DNA. שיעור התאים שקולטים DNA נע בין אחוזים בודדים לעשרות אחוזים, בהתאם לסוג התא ולשיטת ההחדרה. מיד לאחר שחדר ה-DNA הרצוי לתא ולאחר שהגיע לגרעין, מתאפשר ביטוי (יצירת RNA ואחר-כך חלבון), אך ביטוי זה הוא **ביטוי זמני** ("Transient expression") (איור 8.4ב). הביטוי הוא זמני מכיוון שה-DNA שחדר מתפרק ימים ספורים לאחר הטרנספקציה. אולם באחוז קטן מאוד של התאים שבהם מתקבל ביטוי זמני, מתרחש גם תהליך של שיבוץ ה-DNA הרקומביננטי הייחודי ב-DNA של התא (בגנום). שיבוץ זה מונע את פירוק ה-DNA. בעקבות זאת ובהנחה שלתוצר ה-DNA שהשתבץ בגנום התא אין השפעה שלילית על חיי התא ותפקודו, ישאר ה-DNA הייחודי בגנום התא לאורך זמן. יתרה מזאת, בתהליך חלוקת התא יעבור ה-DNA הייחודי (שמקורו מחוץ לתא) בתורשה גם לתאי הבת. בתא ובתאי הבת יהיה **ביטוי קבוע** של תוצר הגן ("Stable expression") (איור 8.4ג). בעקבות ביטוי קבוע ניתן לבחון לאורך זמן אם ואיך השתנתה התנהגות התא. מידע זה על התנהגות התא חשוב להבנת תפקיד הגן שתוצרו מתבטא ביטוי-יתר. כדוגמה, מובא המקרה הפרטי של הגן p53 (תיבה 8.3).



**איור 8.4: ביטוי-יתר של חלבון X בתאים של בעלי-חיים הגדלים בתרבית.**

מקטע המקודד לחלבון X שובץ בנשא הביטוי pcDNA-3. נשא זה מאפשר ביטוי בתאים מיונק דוגמת תאי אדם או עכבר. הנשא שבו המקטע המקודד ל-X מוחדר לתאים בטרנספקציה (טרנספקציה הוא תהליך שבו מחדירים לתא DNA או אפילו RNA). הנשא מגיע לגרעין של תאים רבים יחסית ושם הוא מתועתק. ה-RNA השליה הנוצר מתורגם בציטופלסמה לחלבון X. הביטוי שמתקבל הוא ביטוי זמני של X (חלק ב' של האיור). ביטוי זה ייפסק במרביתם של התאים בגלל הרס ה-DNA הרקומביננטי. במהלך הביטוי הזמני מתרחש במקצת התאים שיבוץ קבוע של ה-DNA הרקומביננטי בגנום. בעקבות זאת מתקבל ביטוי קבוע של X (חלק ג' של האיור). על פי הדוגמה באיור זה, לחלבון X אין השפעה שלילית על גידול תאים.

## □ תיבה 8.3: מביטוי-יתר ועד למציאת תפקידיו של גן:

### סיפורו של p53, גן בצומת שבין חיים למוות

במהלך חקר ההתמרה הסרטנית שהווירוס SV40 אחראי לה (פרק 7), הוכנו נוגדנים כנגד אנטיגן D של וירוס זה כדי לחקור כיצד הווירוס גורם לסרטן. בשנת 1979 הצליחו 3 קבוצות מחקר בארצות הברית ובאנגליה לזהות באמצעות נוגדנים כנגד אנטיגן D גם חלבון שמשקלו המולקולרי הוא 53kd (53,000 דלתון). חלבון זה נמצא קשור לאנטיגן D בתאים שהודבקו על ידי הווירוס. הסתבר שהחלבון שזכה לשם p53, מקורו בתא ולא בוירוס (פרק 7). המגלים של p53 תהו לגבי תפקידו של p53 בתא. כדי לענות על שאלה זו שובט הגן p53 במטרה לבחון את ההשלכות שיש לביטוי-יתר של p53 על התנהגות תאים.

□ לשיבוט מקטע ה-DNA המקודד ל-p53 יש סן ישראלי. חוקרים במכון ויצמן ניגשו בתחילת שנות ה-80 לביצוע המשימה כשלושתם נוגדנים כנגד p53, וכך שובט מקטע DNA המקודד ל-p53. בתוך זמן קצר (בימים ההם שיבוט גן בשנה-שנתיים נחשב זמן קצר) היו החוקרים משה אורן, ורדה רוטר ודוד גבעול אחראים לשיבוט הגנים וה-DNA המשלים המקודדים ל-p53 בעכבר ובאדם. חוקרים אלה גם היו אחראים למציאת תפקידים רבים של p53 בתא.

כדי להעריך את תפקידיו של גן, ובכלל זה את תפקידיו של p53, דרושים מידע מוקדם, השערות שניתנות לבדיקה באופן ניסיוני וכמובן גם מערכות ניסיוניות לבדיקת ההשערות. מכיוון שאנטיגן D הוויראלי מביא לחלוקה בלתי מרוסנת של תאים, ההשערה הכללית שהועלתה הייתה כי p53 עלול להיות מעורב בתהליכים סרטניים.

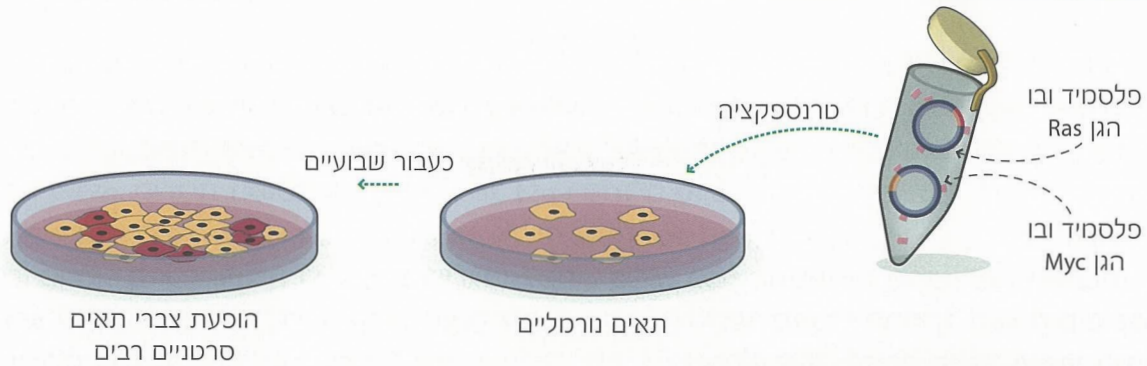
ההשערה הממוקדת הראשונית הייתה כי ביטוי-יתר של p53 בתאים יגרום להתמרה סרטנית. לבדיקת השערה זו יש צורך בנשא ביטוי. את נשא הביטוי שבו ה-DNA המקודד ל-p53 ניתן להכין בעזרת PCR (כמתואר באיור 8.2). משהתקבל הנשא שביכולתו לאפשר ביטוי p53, ניתן היה לבחון את ההשערה הראשונית בדבר מעורבות אפשרית של p53 בתהליכים סרטניים.

כדי לבחון אם גן מעורב בהתמרה סרטנית, מחדירים נשא ביטוי ובו הגן החשוד כמעורב בהתמרה סרטנית לתאים. אם אכן הגן מעורב בהתמרה סרטנית, יופיעו צברי תאים סרטניים. כך, כמתואר באיור 8.5, כאשר מחדירים לתאים נורמליים בו-זמנית נשאי ביטוי שבהם DNA המקודד לאונקוגנים Myc-I Ras (Myc-I Ras הם שמות של גנים מסרטנים), גורם ביטוי היתר של שני אונקוגנים אלה להופעת צברי תאים סרטניים (איור 8.5א'). לעומת זאת, החדרה לתאים של נשא הביטוי שבו ממוקם DNA המקודד ל-p53, לא גרמה להתמרה סרטנית (באיור 8.5ב'). המסקנה מתוצאות אלה הייתה, כי ביטוי-יתר של p53 אינו גורם להתמרת תאים וכי p53 אינו אונקוגן.

השערה שאינה נתמכת על ידי התוצאות הניסיוניות מחייבת השערה חלופית. ואכן, כשהצטבר מידע נוסף, ניתן היה להעלות השערה חדשה שלפיה p53 מתפקד דווקא בריסון תהליכים סרטניים. ואכן, כאשר הוחדר לתאים נורמליים בתרבית נשא הביטוי של p53 יחד עם נשאי הביטוי של Ras-I Myc, פחת במידה ניכרת מספר צברי התאים הסרטניים שהתקבלו (איור 8.5ג') (השוו זאת לטרנספקציה באמצעות Myc-I Ras בלבד). גישה ניסיונית זו תרמה להבנה ש-p53 הוא **גן מדכא סרטן** (Tumor suppressor gene). עוד התברר כי אנטיגן D גורם לסרטן על ידי קישור ל-p53 ונטרול פעילותו.

בעקבות הטרנספקציה וביטוי ה-DNA שהועבר לתא ניתן לבחון אם ואיך השתנה התא. המידע אודות השינוי שחל בתא בעקבות ביטוי-יתר של תוצרי הגן, הוא חשוב להבנת תפקידי הגן. עיקרון זה ניתן להמחיש באמצעות המקרה הפרטי של הגן p53. כמוסבר בתיבה 8.3 ובאיור 8.5, ביטוי-יתר של הגנים שנקראים Myc-I Ras גורם להתמרה סרטנית של תאים בתרבית.

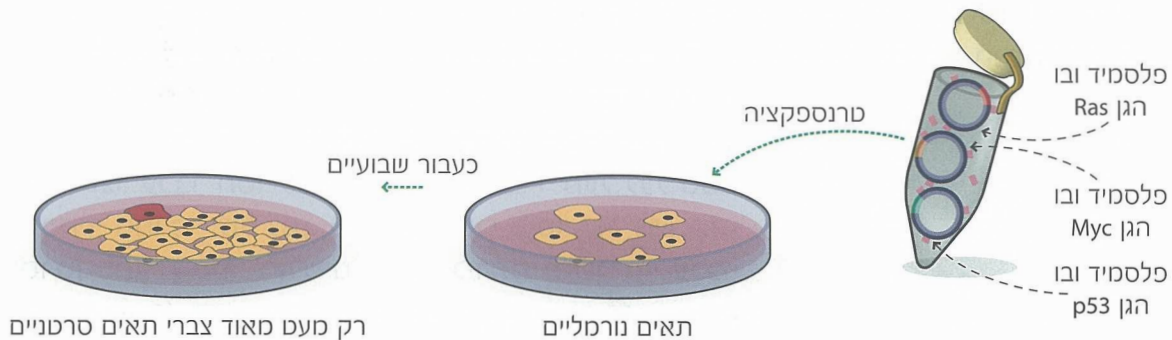
**א. טרנספקציה של נשאי ביטוי של Ras ו-Myc לתאים נורמליים גורמת להופעה של צברי תאים סרטניים**



**ב. p53 אינו מסוגל לגרום להתמרה סרטנית**

התמרה סרטנית (הופעת צברי תאים סרטניים)	הגנים המשובצים בפלסמידים המוחדרים לתא
-	Myc
-	Ras
+++	Myc+Ras
-	p53
-	p53+Ras
-	p53+Myc

**ג. ביטוי-יתר של p53 מדכא התמרה סרטנית הנגרמת על-ידי Myc ו-Ras**



**איור 8.5: ביטוי יתר של גנים לצורך חקר תפקידם: חקר הרלוונטיות של גנים מסוימים בבקרת חלוקת תאים.**

חלק א' של האיור מדגים כיצד ניתן לגרום להופעת צברי תאים סרטניים בתרבית. לשם כך מחדירים לתאים נורמליים את נשאי הביטוי ובהם האונקוגנים המקודדים לחלבונים Myc ו-Ras. לעומת זאת, כשמוחדר לתאים נשא ביטוי ובו DNA המקודד לחלבון p53, אין מתרחשת התמרה סרטנית (חלק ב' של האיור). יתרה מזאת, ביכולתו של p53 לדכא התמרה סרטנית שעשויה הייתה להתרחש בעקבות החדרה של Myc ו-Ras לתאים נורמליים (חלק ג' של האיור). p53 הוא לכן "גן מדכא סרטן" (Tumor suppressor).

## □ תיבה 8.3: המשך

חקר של תאים בתרבות יש לגבות באמצעות מחקר בגוף האדם. כך, על-פי הממצאים ממעבדתו של החוקר האמריקני ברט ווגלשטיין (Bert Vogelstein) וממעבדות אחרות, כ-50% מהגידולים הסרטניים באדם נושאים מוטציה בגן ל-p53. בגידולים שונים באנשים שונים נמצאו מוטציות שונות בגן ל-p53. הצורות המוטנטיות השונות של p53 בגידולים סרטניים איבדו, כמעט בלי יוצא מן הכלל, את יכולתן לדכא סרטן במבחן ההתמרה על ידי Ras-1 Myc. מכאן מסיקים כי ל-p53 תפקיד במוניעת סרטן באדם וכי מוטציה בו פוגמת ביכולתו לשמש כבלם בפני התפתחות סרטן. בשל חשיבותו זו, p53 הוא גן שאת תפקידיו חוקרות מאות קבוצות מחקר. מספר מאמרי המחקר העוסקים ב-p53, ישירות או בעקיפין, הגיעו ב-2008 ל-45,000, מספר חסר תקדים לגן אחד. לפיכך, מבין כ-20,000 הגנים באדם, p53 נחשב כיום לגן הנחקר ביותר בעולם.

## השתקת ביטוי גן בתאים של בעלי-חיים

כדי לקבוע את תפקידיו של גן מסוים בתא ובאורגניזם, לא די להסתמך על ביטוי-יתר של הגן בתאים שבתרבות. אחת הסיבות לכך היא שלא תמיד ביטוי-יתר גורם לשינוי נראה לעין בתא ובהתנהגותו. הגישות המשלימות נועדו **לנטרל או להשתיק** את ביטויו של גן מתוך ציפייה כי התא עשוי להיות רגיש להיעדר או לדיכוי ביטוי.

כדי **לנטרל** את ביטויו של גן פועלים ברמת ה-DNA וכדי **להשתיק** ביטויו גן פועלים ברמת ה-RNA. ברמת ה-DNA ניתן לפגוע באופן מכוון וממוקד בגן הנחקר שבתא **ולשבש את רצף הגן**. אפשר לעשות זאת בתא בתהליך שבו מחליפים מקטע בגן במקטע שמכיל רצף זר המנטרל את ביטויו הגן. יתרה מכך, אפשר להשתמש בתא עוברי שרצף גן מסוים בו שובש, כדי לייצר עכבר שבו הגן הנחקר משובש בכל תא מתאיו. מהשינויים שחלו בעכבר כזה **בהיעדר ביטוי** גן מסוים, ניתן להסיק על **תפקידי הגן הנחקר באורגניזם**. ואכן, כאשר יוצר עכבר חסר p53 בכל תאיו, התברר מעל לכל ספק התפקיד המרכזי של p53. עכברים חסרי ביטוי של p53 מתו מסרטן בתוך מספר חודשים לאחר לידתם (משך חיי עכבר הוא כשנתיים). ממצא זה חיזק את המסקנה ש-p53 הוא גן **מדכא סרטן**.

□ עכברים שרצף גן מסוים בהם שובש ושיטויו הגן בהם נטרל, נקראים באופן סמלי "עכברי Knock out". השם בא לציין את העובדה שנטרול ביטויו של גן באמצעות שיבוש הרצף שלו הוא נטרול בלתי הפיך.

קשה לשבש רצף של גן ברמת ה-DNA ולנטרל את ביטויו, ולכן שיטה זו אינה נפוצה בחקר תאים בתרבות. בגישה החלופית חוקרים את השפעת **השתקת הביטוי** של גן בתאים בתרבות באמצעות **RNA מפריע**. "RNA מפריע" מסוים הוא RNA בעל רצף שמשלים לחלק מהרצף של RNA שליוח מסוים. RNA מפריע נצמד ל-RNA שליוח. בעקבות היצמדות זו גורם ה-RNA המפריע להשתקת תרגום ה-RNA שליוח או להרס שלו. למעשה, RNA מפריע מסוים משתיק באופן סלקטיבי וממוקד ביטוי של RNA שליוח מסוים ומאפשר לחקור את השפעת ההשתקה של ביטוי ה-RNA על התא. השתקה כזו מאפשרת להסיק על תפקידיו של הגן הנחקר.

הגישות המשלימות את הגישה שמאפשרת ביטוי-יתר של חלבון, והמשמשות אף הן לקביעת תפקידיו של גן, הן הגישות המאפשרות לנטרל או להשתיק את ביטויו של גן נחקר. **נטרול ביטוי** ברמת ה-DNA עושים באמצעות שיבוש של רצף ה-DNA של הגן. ברמת ה-RNA גורמים **להשתקת ביטוי** ה-RNA באמצעות "RNA מפריע".



## ניצול "RNA מפריע" להשתקת ביטוי גן

כאמור, חקר יסודי של תפקידי גן מתאפשר באמצעות השליטה בביטוי: ביטוי-יתר מחד והשתקת הביטוי מאידך. אחת הדרכים הראשונות שהועמדה למבחן לצורך השתקת ביטוי גנים ניצלה RNA מטיפוס Anti-sense. RNA זה יכול להיווצר באופן טבעי בתא. איור 8.6 מדגים כי לעתים ניתן למצוא בגנום מקטע של DNA שממנו עשויות להיווצר שתי מולקולות RNA. במצב מיוחד זה כל אחת מהמולקולות מיוצרת מכיוון אחר של המקטע. למעשה נוצרות שתי מולקולות RNA מכל אחד מהגדילים השונים של מקטע ה-DNA. אם במקטע כזה שוכן גן מקודד לחלבון, אחת ממולקולות ה-RNA שתתקבלנה תעבור שינוי ל-RNA שליה. למולקולת RNA שליה קוראים גם מולקולת RNA

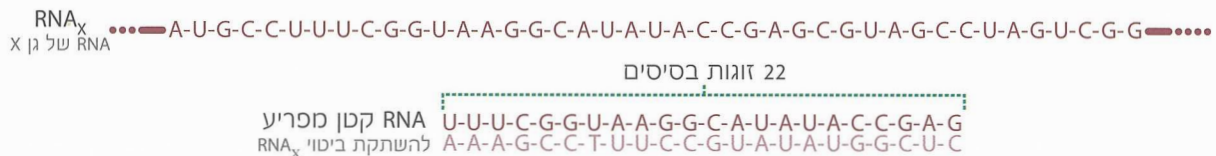
□ מתוך 20 מילים בעברית המשמשות לתרגום המילה Sense בחרנו במילה "משמעות".

מטיפוס Sense. RNA מטיפוס Sense הוא RNA שיש לו "משמעות" שכן ממנו ייווצר חלבון. למולקולת ה-RNA הנוצרת מהכיוון האחר - (ובעצם מהגדיל האחר) קוראים Anti-sense RNA.

מטיפוס Anti-sense אינו מקודד לחלבון, והוא RNA בעל רצף משלים ל-RNA מטיפוס Sense. מולקולת RNA מטיפוס Sense ומולקולת RNA מטיפוס Anti-sense יכולות להיצמד זו לזו ליצירת מולקולת RNA דו-גדילית (איור 8.6). בעקבות היצמדות שכזו קיימות שתי אפשרויות. על פי האחת, תהיה הפרעה לתרגום של ה-RNA מטיפוס Sense, ועל פי האחרת, תפורק מולקולת ה-RNA הדו-גדילית. בשני המקרים ה-RNA השליח אינו מסוגל לשמש ליצירת חלבון, והמשמעות היא **השתקת של ביטוי גן**.

RNA מטיפוס Anti-sense הוא בעל יעילות מוגבלת בהשתקת ביטוי גן נחקר. מפנה חד בתחום חל ב-1998 בעקבות גילוי **RNA מפריע מטיפוס דו-גדילי** שמוחדר לתא מבחוץ. RNA שכזה מפריע לביטוי בעילות שהיא פי 10 מזו של Anti-sense RNA רגיל. המגלים היו המדענים האמריקנים אנדרו פייר וקרייג מלו (Andrew Fire and Craig Mello) שתגליתם זיכתה אותם בשנת 2006 בפרס נובל.

על פי המערך הניסיוני שפיתחו מלו ופייר להשתקת ביטוי RNA שליה מסוים, יש לספק מחוץ לתא RNA סינתטי קטן הנקרא "RNA קטן מפריע". **RNA קטן מפריע** (ובאנגלית **siRNA**) שהוא קיצור של small interfering RNA) הוא RNA דו-גדילי שגודלו 22 זוגות בסיסים בעל רצף משלים לרצף שליה מסוים שאת ביטויו רוצים להשתיק. את ה-RNA הזה מרכיבים במבחנה משני גדילי RNA בעלי רצף משלים זה לזה שסונתזו באופן כימי. את ה-RNA הקטן המפריע מחדירים לתא בטרנספקציה כמתואר באיור 8.7. לאחר חדירת ה-RNA הקטן המפריע לתא, גדיל אחד שלו מתמקם בתוך קומפלקס חלבונים ייחודי. בתוך קומפלקס חלבונים זה מתמקם גם ה-RNA השליח בעל הרצף המשלים. השניים נצמדים בתוך הקומפלקס, ובעקבות כך מתפרק ה-RNA השליח. כך מושתק באופן ממוקד ביטוי ה-RNA השליח שכנגדו כוון ה-RNA הקטן המפריע בעל הרצף המשלים הייחודי.



**א. אזור בגנום ושני אזורי הבקרה השונים שבקצותיו**  
 מאזור שכזה עשוי להיווצר RNA מטיפוס Sense ו-RNA מטיפוס Anti sense



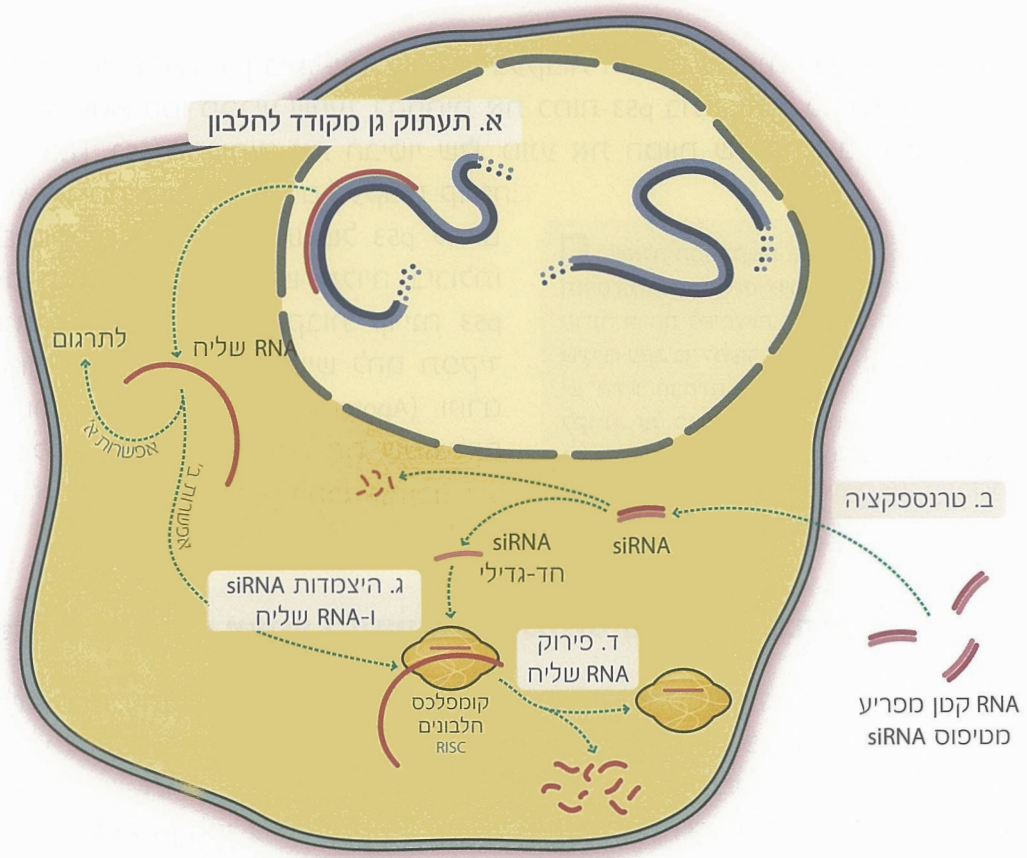
**ב. הפרעה לביטוי בעקבות היצמדות RNA מטיפוס Sense ל-RNA מטיפוס Anti-sense**



**איור 8.6: RNA מטיפוס Anti-sense נצמד ל-RNA שליח (Sense RNA) ומפריע לביטויו.**  
 הגנום מאפשר לייצר גם RNA שאינו מקודד לחלבון. לעתים RNA שאינו מקודד לחלבון הוא RNA מטיפוס Anti-sense. זה יכול לגרום לפירוק או יכול למונע תרגום של RNA שליח משלים שהוא RNA מטיפוס Sense.

בחיות "Knock out" משיגים נטרול ביטוי מוחלט (כלומר התאים אינם מייצרים כלל RNA או חלבון רלוונטי). לעומת זאת, siRNA שמקורו מחוץ לתא מביא להשתקת ביטוי, כלומר להפחתה של 70%-80% בלבד בכמות החלבון הרלוונטי. אך גם השתקה שכזו מספיקה ברוב המקרים כדי לגרום לשינוי בתא (כלומר לגרום לפנוטיפ תאי). השינוי יכול להעיד על תפקידיו של הגן שביטויו הושקת. לפיכך, גם נטרול של ביטוי גן בחיות Knock out וגם השתקת ביטוי באמצעות RNA קטן מפריע הם כלים חיוניים במחקר המשמש למציאת תפקידיו של גן נחקר.

□ מופע תאי לדוגמה שמקבלים לעתים בעקבות שימוש ב-RNA מפריע, הוא הגברה או האטה של קצב חלוקת התא, הגברה או האטה של קצב הנשימה של התא או לחילופין הגברה או האטה של קצב תנועת התא.



**איור 8.7: ניצול RNA קטן מפריע מטיפוס siRNA לצורך השתקת ביטוי RNA שליח.**

ניתן "לכפות" הפרעה לביטוי RNA שליח מסוים על ידי פירוקו וזאת בהתערבות מבחוץ. לשם כך מחדירים לתא RNA דו-גדילי קטן סינטטי שגודלו 22 זוגות בסיסים הנקרא siRNA ובעברית "RNA קטן מפריע" (שלב ב' באיור). מתכננים את רצף siRNA זה שיהיה בעל רצף משלים לרצף ה-RNA השליח שאת ביטויו רוצים להשתיק. בהיותו בתא, גדיל אחד של ה-siRNA מתמקם בקומפלקס חלבונים, שבו הוא פוגש את ה-RNA השליח (שלב ג'). התוצאה היא השתקה ממוקדת רצויה של ביטוי (שלב ד').

רצף ה-RNA הקטן המפריע הוא זה שמכתיב "חיסול ממוקד" של RNA תוצר גן מסוים שבעקבותיו ניתן לבחון אם השתנתה התנהגות התא (בהיבטים תאיים ומולקולריים). מגישה ניסיונית זו ניתן להסיק מהו תפקידו של הגן המקודד ל-RNA זה. איור 8.7 ממחיש תעתוק של גן מסוים ופירוק ה-RNA שלו על ידי RNA קטן מפריע הייחודי רק לו (משמע, בעל רצף משלים לו) והמועבר לתא בטרנספקציה.

השימוש ב-RNA קטן מפריע (siRNA) לצורך חקר תפקידיו של גן הוא כיום דבר שבשגרה. אפשר להדגים זאת במקרה של חקר תפקידיו של הגן המקודד ל-p53. כאמור, נוכחות p53 באורגניזם מאפשרת דיכוי סרטן. יתרה מזאת, ביטוי-יתר כפוי של p53 בתא סרטני גורם לעתים למות התא. בנוסף, נתגלה כי p53 הוא גורם תעתוק שמאפשר תעתוק של מספר רב של גנים. מוות של תא סרטני כתוצאה מביטוי-יתר של p53 יכול עקרונית להסביר את יכולתו של p53 לדכא את הופעתם של צברי תאים סרטניים בתרבית. ממצאים אלה עלתה ההנחה - שהייתה טעונה הוכחה - כי גם בתאי הגוף שאינם סרטניים יש ל-p53 הטבעי תפקיד בגרימת מוות בעיתוי הנדרש. כמודגם באיור 8.8א', בתא שנחשף לקרינה, הגורמת בתוכו לעקה (Stress), עולה באופן ניכר כמות p53. לעלייה בכמות ה-p53 שמקורו בגן הטבעי, מתלווה לעתים מוות של התא. במצב זה צריך לקבוע אם יש **קשר סיבתי** בין העלייה בכמות ה-p53 בתא ובין המוות. קשר סיבתי מוכח שכזה, פירושו כי p53 **נחוץ** לגרימת המוות, וכי העלייה בכמותו אינה תוצר הנלווה באופן אקראי למוות עצמו.

ניתן להוכיח קשר סיבתי בין ביטוי-יתר של p53 בעקבות חשיפה לקרינה לבין מוות של תא. עושים זאת באמצעות RNA קטן מפריע שנועד להפחית את כמות p53 בתא. ואכן, כמודגם באיור 8.8ב', RNA קטן מפריע כנגד p53 המשתיק את הביטוי שלו, מונע את המוות של התא בעקבות קרינה. מכאן ש-p53 נחוץ לגרימת מוות של תאים בעקבות קרינה.

□ השאלה המתבקשת היא "מדוע" p53 מכתוב מוות של תאים במצבי עקה מסוימים כמו לאחר קרינה חזקה? כידוע, קרינה גורמת למוטציות העלולות להצטבר בגנים מסוימים שיגררו עקב כך למעורבות פעילה בסרטן (כמו Ras, פרק 4). יש "היגיון" מבחינת האורגניזם להעדיף מוות של תא שנחשף לקרינה על פני הישארותו בחיים. זאת מכיוון שהחלופה הלא רצויה היא שתא שצבר מוטציות ישרוד. תא כזה עלול להתפתח לתא סרטני. זהו למעשה אחד מתפקידיו של p53 שמקנה לו את היכולת לדכא סרטן.

מחקרים נוספים גילו כי יכולתו של p53 לגרום למוות של התא בעיתוי הנדרש תלויה ביכולתו לתפקד כגורם תעתוק. כך, בעקבות קרינה p53 נקשר לאזורי הבקרה של גנים שיש להם תפקיד בגרימת מוות מכוון ומתוכנת (Apoptosis) וגורם לתעתוק שלהם. תוצרי גנים אלה הם שמוציאים לפועל את ה"הוראות" של p53 להרג מתוכנן של התא.

### □ תיבה 8.4: RNA קטן מפריע ליישומים ביוטכנולוגיים ברפואה ובחקלאות

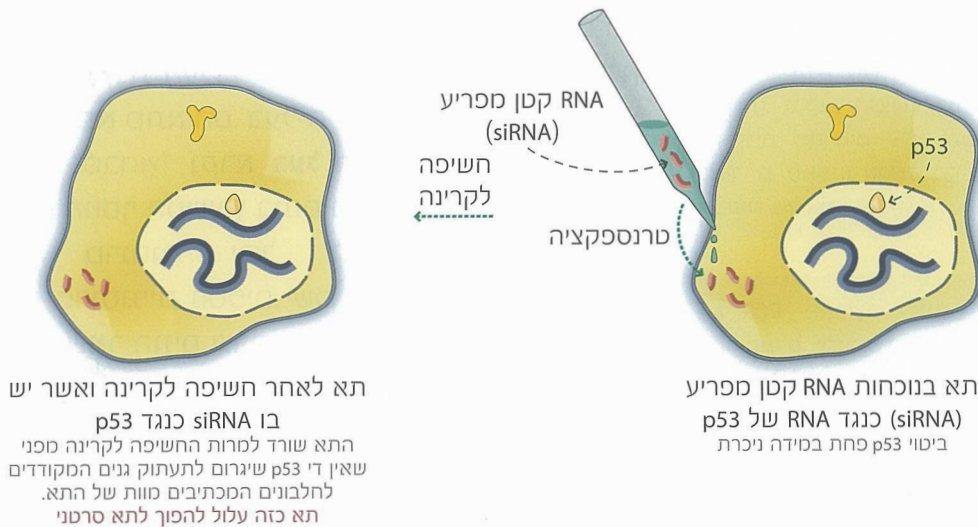
במחלות רבות ניתן לאתר ביטוי-יתר של חלבונים מחוללי המחלה. דוגמה לחלבונים כאלה הם חלבונים המעורבים באלרגיות למיניהן, חלבונים האחראיים ליצירת כלי דם בגידול סרטני וחלבון ההנטיגטין שביטוי-יתר של צורתו המוטנטית אחראי למחלה הניונית הנטינגטון. לכן עלתה האפשרות להשתמש ב-RNA קטן מפריע להשתקת ביטוי של ה-RNA המקודד לחלבונים הלא רצויים. השתקת ביטויים של חלבונים אלה עשויה להביא להטבה רפואית, ואכן, פטנטים כבר נרשמו על רצפים קצרים של RNA שעשויים להיות בעלי ערך רפואי. יישומים כגון אלה ניתן לסווג כ**ריפוי גני**.

למטרות הרפואיות שצוינו ניתן גם להחדיר לתוך התא mRNA שמקודד ל-RNA קטן מפריע. אם DNA כזה יעבור שיבוץ בגנום, ניתן יהיה להבטיח ביטוי קבוע של RNA קטן מפריע בתא. בשל כך תתקבל השתקה ארוכת טווח של ביטוי mRNA המטרה הלא רצוי. השתקת ביטוי ארוכת טווח מעלה תקוות רבות בניצול RNA קטן מפריע לצורך הפרעה לריבוי וירוסים שאת הרצף שלהם מכירים. בין יתר היישומים, המפתחים מקווים לפריצת דרך בלוחמה כנגד וירוסים התוקפים צמחים וגם כנגד וירוס ה-HIV, מחולל האיידס.

**א. תא מסוים, שבו ביטוי תקין של p53, מת לאחר חשיפה לקרינה**



**ב. תא, שבו הושתק ביטוי p53 באמצעות RNA קטן מפריע, אינו מת לאחר שנחשף לקרינה**



**איור 8.8: RNA קטן מפריע לצורך השתקת ביטוי p53 מאפשר לשייך לגן של p53 תפקיד בגרימת מוות מבוקר של תאים.**

א. תא ובו ביטוי תקין של p53, שהוא גן מדכא סרטן, מת בעקבות חשיפה לקרינה. הקרינה גורמת לעלייה בכמות p53 בתא ולעלייה בתוצרי גנים שמושרים מוות מבוקר (אפופטוזיס). יש צורך להוכיח כי p53 הוא אכן מחולל המוות, כלומר כי העלייה בכמות p53 בתא היא זו שאחראית לביטוי גנים מבצעי הרג. לשם כך חוזרים על המערך הניסיוני שב-א' ומשתמשים ב-RNA קטן מפריע כנגד RNA של p53 (חלק ב' של האיור).

ב. תא שלתוכו הוחדר RNA קטן מפריע בעל רצף משלים לרצף של p53 הוא תא שבו ביטוי p53 הושתק. נמצא כי בהיעדר מספיק p53 בתא ולאחר הקרנה לא מתקיים תעתוק אופטימלי של גנים המקודדים לחלבונים מבצעי הרג. כתוצאה מכך לא מתו תאים שנחשפו לקרינה. עובדה זו מוכיחה כי p53 נחוץ לגרימת מוות מבוקר של תאים שנחשפו לקרינה. תא שאין בו p53, צובר לאחר שנחשף לקרינה מוטציות שעלולות להפכו לתא סרטני. מכאן של-p53 תפקיד בהרג תאים שעלולים להפוך לסרטניים.

כמודגם באיור 8.8, השתקת הביטוי של p53 באמצעות RNA קטן מפריע מונעת את העלייה בכמותם של חלבונים גורמי מוות ואת המוות של התא בעקבות קרינה חזקה. מכאן שאחד מתפקידיו של p53 הוא לגרום למוות של תא לאחר קרינה חזקה. תפקידו זה של p53 מצריך את יכולתו לתפקד כגורם תעתוק המגביר את התעתוק של גנים הגורמים למוות מבוקר של התא. בכך p53 מפחית את הסיכוי להתפתחותו של גידול סרטני בעקבות קרינה.

צינו אילו מביין המשפטים הבאים נכונים. תקנו את המשפטים שאינם נכונים.

1. גן תמיד מקודד לחלבון.
2. גן יכול לשמש כדי לייצר תרופה.
3. כדי לנצל גן ליצירת תרופה (יישום ביוטכנולוגי) נוהגים כיום קודם לקבוע את תפקידיו של הגן ואחר כך לשבט אותו.
4. ניתן להשיג ביטוי-יתר של תוצר גן באמצעות החדרתו של נשא ביטוי לתא.
5. ביטוי-יתר של חלבון אינו יכול לשמש להגדרת תפקידיו של גן.
6. השתקת ביטוי של גן יכולה לגרום לשינוי בתכונות האורגניזם ובהתנהגותו אך אינה יכולה לגרום לשינוי בתכונות התא ובהתנהגותו.
7. שינוי בתכונותיו של תא כתוצאה מביטוי-יתר של גן, או כתוצאה מהשתקת ביטוי, מאפשר להגדיר את תפקידיו של הגן.
8. ייצור-יתר של אינסולין אנושי בחיידק מצריך קשירה של DNA חיידקי המקודד לאינסולין לאזור בקרה אנושי והחדרת תוצרי הקשירה לחיידק.
9. נשא ביטוי יכול להיות פלסמיד שבו מוקמו זה לצד זה אזור בקרה ו-DNA שבביטוי שלו מעוניינים.
10. האנזים DNA פולימראז מאפשר סינתזת RNA מגדיל התבנית שבנשא הביטוי.
11. לאחר שנשא ביטוי עובר שיבוץ לגנום התא, מתקבל ביטוי חולף של החלבון שאותו מקודד הגן שבנשא.
12. בנשא ביטוי מקובל לשבץ גן אבל לא DNA משלים של גן.
13. תהליך ה-RT-PCR מאפשר לשבט DNA משלים שאותו ניתן לשבץ בנשא לקבלת נשא ביטוי.
14. RNA קטן מפריע (מסוים) יכול לאפשר "חיסול ממוקד" של מרבית העותקים של RNA שליח (מסוים) ובעקבות זאת נוצר יותר חלבון תוצר RNA זה.
15. רק גדיל אחד של RNA קטן מפריע נצמד ל-RNA בעל רצף הבסיסים המשלים, ולאחר אירוע היצמדות זה מתפרק ה-RNA השליח.
16. שימוש ב-RNA מפריע מביא לירידת בכמות ה-RNA כתוצאה מירידה בהיקף התעתוק.
17. ניתן להשתיק ביטוי גן גם ברמת ה-DNA וזאת על ידי שיבוש רצף ה-DNA שלו, אך תהליך זה מסובך יחסית לשימוש.
18. אם נמדדה כמות גדולה של חלבון X בתא וגם כמותו של חלבון Y גדולה, ניתן להוכיח קשר סיבתי בין האירועים ולקבוע, כי X אחראי להעלות את כמותו של Y. ניתן לנסות להוכיח זאת באמצעות שימוש ב-RNA קטן מפריע כנגד RNA של Y.
19. בעל-חיים טרנסגני יכול לשמש בחקר תפקידיו של גן באורגניזם.
20. את הדג שבו רוצים לבטא חלבון המגן מפני קור יש לייצר בעזרת אזור בקרה שאליו נקשר גורם תעתוק בעקבות חשיפה לתנאי קור. על מקטע DNA זה להיות בסמיכות לגן המקודד לחלבון המגן מפני קור.

## ביטוי-יתר של תוצר גן בבעלי-חיים טרנסגניים

החדרת גן לתאים בתרבית וביטוי-יתר שלו מאפשרים לבחון את תפקידי הגן בתא יחיד כפי שהודגם במקרה של הגן המקודד ל-p53 (איור 8.5). למרות היתרונות שיש לביטוי-יתר של גן בתרבית תאים, ביטוי כזה אינו מניב תוצאות משמעותיות בכל הגנים. כדוגמה ניתן להביא את המקרה של הגן המקודד להורמון הגדילה (Growth Hormone = GH). הורמון זה מופרש מתאי יותרת המוח, אך את עיקר פעולתו הוא מבצע על תאים אחרים בגוף. ביטוי בעודף של ה-GH בסוג אחד של תאים בתרבית אינו עתיד ללמדנו בהכרח כיצד הוא משפיע על התפתחות האורגניזם ומהי תרומתו במגוון התאים בגוף שבהם מורגשת השפעתו.

כדי לבחון את תפקידי הגן באורגניזם השלם (*In vivo*) בהקשר של תהליכים התפתחותיים, תהליכים התנהגותיים ואפילו בהקשר של עמידות למחלות, יש לשאוף ולבטא את הגן **ביטוי-יתר** באורגניזם השלם! לקראת **ביטוי-יתר באורגניזם** דוגמת עכבר, מזריקים גן שמוקם בסמיכות לאזור בקרה רצוי לתוך ביצית מופרית כמתואר באיור 8.9. במהלך ההזרקה של ה-DNA לתוך הביצית המופרית מחדירים כ-500 עותקים של הגן שאותו רוצים לבטא ביטוי-יתר. יש ביציות מופרות שמסיבות טכניות לא יקלטו

□ מחדירים גן לביצית במטרה שיעבור שיבוץ בגנום. בעקבות ההחדרה ייתכן שישובצו בגנום מספר עותקים שלו (מעותק אחד ועד כמה עשרות). מיקום השיבוץ בגנום הוא אקראי, ובמקרים מסוימים עלול השיבוץ להתרחש בתוך גן מתפקד ובשל כך עלול להשתבש תפקודו של אותו גן.

□ PCR מאפשר לאתר את העכברים הטרנסגניים ולצורך כך משתמשים בתחלים יחודיים ל-DNA שהוחדר.

DNA זר זה, אולם באחדות מהן ישתבצו בגנום מספר עותקים של הגן. את הביציות המופרות והמוזרקות מחדירים לעכברה פונדקאית. במקצת העכברים שתוליד עכברה זו יימצא הגן המוזרק בכל תא מתאיהם. בעל-חיים הנושא בכל תא מתאי גן שהוחדר "מבחוץ" נקרא **בעל חיים טרנסגני** (Transgenic animal) והגן הנוסף המשובץ בגנום נקרא **טרנסגן** (Transgene). בעל-חיים טרנסגני יכול להביא ללידתם של בעל-חיים טרנסגניים נוספים, שכן הטרנסגן עובר בהורשה מנדלית עם שאר הגנים שבתא.

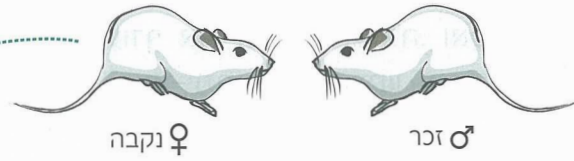
הטרנסגן שנמצא בסמיכות לאזור בקרה "חזק", מתבטא ביטוי-יתר, ותוצר הגן מתקבל בעודף. לעתים מעדיפים

לבחור בסוג מסוים של אזור בקרה המאפשר **ביטוי** של הטרנסגן רק בתאים מסוימים באורגניזם. כך לדוגמה, לשם יצירת עכברים טרנסגניים נושאי הגן המקודד להורמון הגדילה, נעשה שימוש באזור בקרה שמאפשר ביטוי הטרנסגן בעיקר בכבד. בעקבות ביטוי-יתר של הורמון הגדילה בכבד, מתרחשת הפרשה של הורמון זה לזרם הדם וכתוצאה מכך ההורמון פעיל ביולוגית. ואכן, כפי שניתן להתרשם מאיור 8.10, עכברים טרנסגניים להורמון הגדילה גדולים פי 2 מעכברי ביקורת.

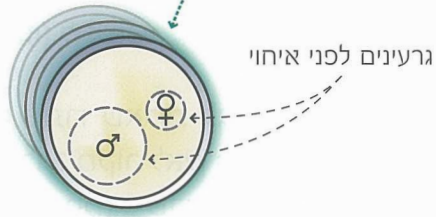
□ הבחירה באזור בקרה שמאפשר ביטוי בכבד אינה מקרית. הכבד הוא איבר שמסוגל להפריש חלבונים לזרם הדם, וביטוי הורמון הגדילה בכבד מאפשר הפרשתו לדם. ההפרשה מהכבד לדם היא חיקוי תהליך שאותו עובר הורמון הגדילה בבלוטת יותרת המוח. בנוסף, בשל גודלו הרב של הכבד בהשוואה ליותרת המוח, מובטח שהביטוי בעודף בכבד יאפשר ביטוי-יתר של פי 100 ועד פי 1000 של הורמון הגדילה בזרם הדם. למרות ביטוי עודף זה החיות הטרנסגניות גדולות רק פי 2 מחיות ביקורת, עובדה שמעידה על בקרה שלילית באורגניזם שתפקידה לנטרל חלק ניכר מההשפעה העודפת של הורמון הגדילה.

כדי למצוא את תפקידי הגן באורגניזם, מקובל לייצר אורגניזם טרנסגני. **אורגניזם טרנסגני** הוא אורגניזם שבכל תא מתאיו ישנו גן (או DNA משלים בסמוך לאזור בקרה) שהוחדר "מבחוץ". ביטוי גן כזה הנקרא **טרנסגן** בחלק מתאי האורגניזם או בכלם עשוי להביא לשינוי באורגניזם. לדוגמה, ביטוי-יתר של הטרנסגן המקודד להורמון הגדילה בעכברים או בדגים מביא לעלייה בגודלם של אורגניזמים אלה.

א. זיווג בין עכברים לקבלת ביציות מופרות



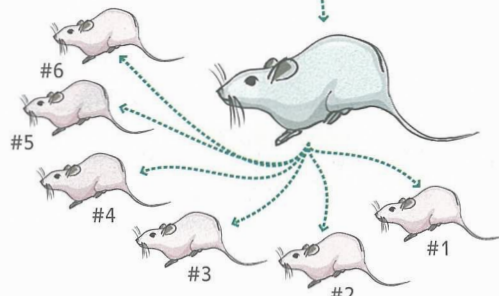
ב. הוצאת ביציות מופרות



ג. הזרקת DNA לתוך הגרעין שבביצית

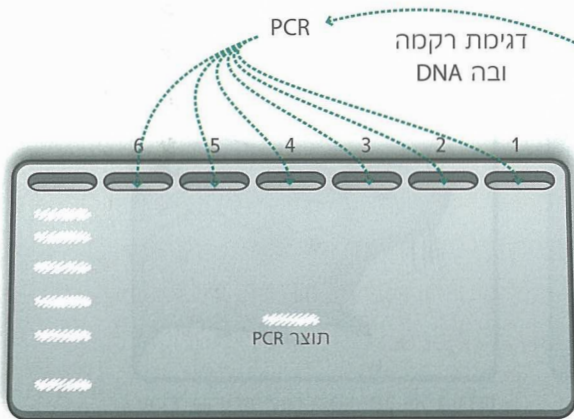


ד. השתלה של ביציות מוזרקות לאם פונדקאית



צאצאים שהתפתחו מביציות שהוזרק להן DNA

ה. מבחן לנוכחות הטרנסגן בצאצאים



עכבר #4 הוא טרנסגני כפי שנתגלה ב-PCR שנועד לזהות את נוכחות הטרנסגן

**איור 8.9: יצירת עכבר טרנסגני: עכבר הנושא גן ממקור חיצוני ("טרנסגן").**

ניתן לייצר עכבר שבתאיו ביטוי-יתר של גן, ואפילו ביטוי של גן שמקורו באורגניזם אחר. ביטוי כזה מאפשר לחקור את תפקידי הגן המסוים באורגניזם. לצורך יצירת עכבר טרנסגני כזה מזריקים לביציות מופרות עותקים רבים של הגן הרצוי. את ה-DNA הרצוי מזריקים לגרעין הגדול שבביצית זו בשלב שלפני איחוי הגרעינים. הביציות המוזרקות מועברות לאם פונדקאית. את נוכחות הטרנסגן בתאי הגוף של הצאצאים בוחנים באמצעות PCR. לאחר סכך בוחנים אם כצפוי התקבל בחיות הטרנסגניות ביטוי של הטרנסגן ומהי השפעת הביטוי הזה. מהשינוי הביולוגי שחל בעכבר הטרנסגני מסיקים את תפקידו של הגן הספציפי ששימש כטרנסגן.

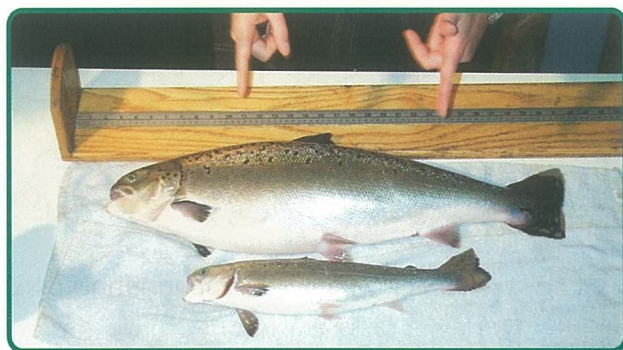


החוקרים האמריקנים פלמיטר (Palmiter) וברנסטר (Brinster) שיצרו את העכברים הטרוסגניים להורמון הגדילה חזו במאמר שפרסמו בשנת 1982 שלא ירחק היום שבו ניתן יהיה לייצר למטרות השבחה חקלאית יצורים טרוסגניים אחרים המבטאים בעודף את הורמון הגדילה. ואכן ב-1992 כבר התקבלו הדגים הטרוסגניים הראשונים שביטאו ביטוי-יתר את הורמון הגדילה. הדג הטרוסגני הנראה בתמונה 8.10 נזקק ל-18 חודשים כדי להגיע לגודל ראוי לשיווק, בהשוואה ל-36 חודשים הנדרשים לדגים "רגילים". לעובדה זו חשיבות כלכלית בעולם הזקוק מאוד לאספקה מוגברת וזולה של מזון לתושביו.

למרות ההצלחה נותרו שאלות לגבי הסכנות הטמונות באכילת בשרם של דגים טרוסגניים אלה (שאריות הורמון גדילה? מקור לאלרגיות?), אם כי אין הוכחות מוצקות דיין שהסיכונים ממשיים. כמו כן קיימים חששות כבדים ממצב שבו דגים טרוסגניים להורמון הגדילה ימצאו דרכם לטבע ויגרמו לחיסולן של אוכלוסיות דגים טבעיות בשל הריבוי המהיר שלהם. לחששות האקולוגיים הללו אין עדיין ביסוס עובדתי. עם זאת יש מודעות לכך שראוי לנהוג בזהירות ולהימנע מפגיעה במגוון המינים. במקביל מושקע כיום מאמץ ניכר לייצר דגים טרוסגניים שנושאים גנים המקנים להם עמידות למחלות. בדגים אלה צפון ערך חקלאי-כלכלי, והם נתונים פחות לביקורת מודעת וציבורית.

לאחרונה התעורר עניין **בעלי-חיים טרוסגניים המייצרים תרופות**. אחת התרופות "הנחשקות" היא החלבון אנטי-תרומבין (Anti-thrombin) שהוא חלבון נוגד קרישת דם.

ב. דג סלמון טרוסגני שבו ביטוי-יתר של הורמון הגדילה לצד דג ביקורת



הדגים שבתמונה בקעו מהביצים באותו יום. בדג העליון ביטוי-יתר של הורמון הגדילה בעוד הדג התחתון הוא דג ביקורת. הדג הטרוסגני מגיע לגודל ראוי לשיווק בתוך כ-18 חודשים, בעוד שלדגים שאינם טרוסגניים נדרשים 36 חודשים להגיע לאותו גודל.

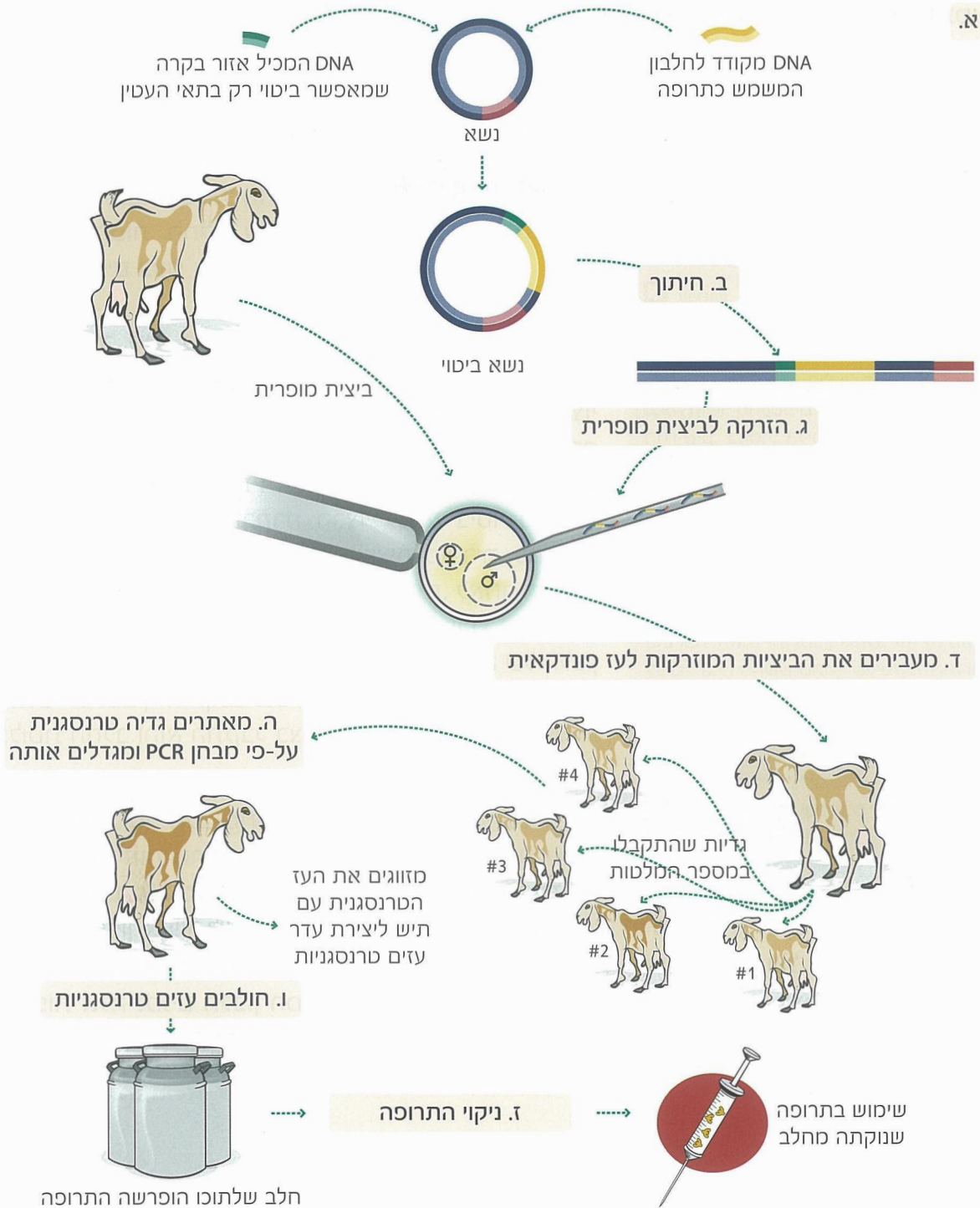
א. הדמיה של עכבר טרוסגני שבו ביטוי-יתר של הורמון הגדילה לצד עכבר ביקורת



עכבר טרוסגני שבו ביטוי-יתר של הורמון הגדילה, גדול פי 2 מעכבר ביקורת.

### איור 8.10: בעלי-חיים טרוסגניים שהטרנסגן שבהם הוא הגן להורמון הגדילה.

ביציות מופרות שימשו להזרקה של הגן להורמון הגדילה שמוקם בסמיכות לאזור בקרה סתאים. התקבלו אורגניזמים טרוסגניים, וביטוי הגן להורמון הגדילה בעכבר ובדג הסלמון הביא להאצת הגדילה של אורגניזמים אלה. אורגניזמים אלה גדולים באופן משמעותי מאורגניזמים המשמשים כביקורת (כלומר, מאורגניזמים שאין בהם גן ממקור חיצוני).



**איור 8.11: יצירת עז טרנסגנית המפרישה לחלב חלבון-תרופה.**

בשלב א' יוצרים נשא שבו ממקמים את ה-DNA המוקודד לחלבון התרופה בסמיכות לאזור בקרה שמתפקד רק בתאי עטין. חותכים נשא רקומביננטי זה (שלב ב') לקראת הזרקתו לתא ביצית מופרית (ג') ובשלב הבא מחדירים את הביצית המוזרקת לעז פונדקאית (ד'). הגדיות שמתקבלות בהמלטות עוקבות, נבחנות לנוכחות הטרנסגן וליכולתן להפריש את החלבון התרופה לחלב שלהן. מנקים את התרופה מהחלב וממשיכים לחלב ולנקות.

ייצור אנטי-תרומבין בתאים של אוגר בתרבית הוא תהליך יקר, מכיוון שכל תא מייצר כמות נמוכה יחסית של החומר ובנוסף יש צורך בתהליך ניקוי מסובך. בשל כך כבר בשנות ה-80 של המאה ה-20 חשבו מדענים על חלופות. הרעיון היה להתחשב בעובדה שבלוטות החלב של פרות ועזים מסוגלות לייצר כמויות גדולות של חלבונים מורכבים המופרשים אל מחוץ לתא. לכן הועלתה האפשרות לייצר בבלוטות החלב של בעלי-חיים אלה גם חלבונים רקומביננטיים בעלי ערך רפואי שיופרשו לחלב.

□ הנזקים לאנטי-תרומבין הם בראש ובראשונה אותם חולים שגופם אינו מסוגל לייצר צורה תקינה של חלבון זה בגלל מוטציה בגן (1 מתוך כ-5000 אנשים). כמו כן נזקים לתרופה גם מנותחי לב.

□ שימוש בטרנסגן לייצור חלבון בעל ערך רפואי המופרש לחלב יכול לאפשר לקבל כמות גדולה של החלבון הרצוי באיכות טובה. חלבון באיכות טובה הוא חלבון המתקפל בצורה נכונה ואשר מתווספים לו שיירי סוכר במקומות הנדרשים. בנוסף, הליכי ההפקה והמיצוי של החלבון הרקומביננטי מחלב קלים יחסית, מכיוון שהחלבון מופרש אל מחוץ לתא ומחוץ לגוף החיה הטרנסגנית. בשל עובדות אלה מחיר התרופה עשוי לרדת באופן ניכר.

□ חל עיכוב ממושך במתן אישור לשימוש בתרופת האנטי-תרומבין מחלב עז. הנימוקים לעיכוב נבעו מחשש שהגוף של מקבל התרופה יגיב ביצירת נוגדנים. מצב זה ייתכן אם התרופה אינה נקייה במאת האחוזים משאריות של חלבוני עז שעלולים לגרום למערכת החיסונית לייצר נוגדנים לא רצויים נגדם. במאמר מוסגר, חלב עזים וגבינות שמכילים מסונו - מקורם בעזים שאינן טרנסגניות.

כדי ליצור חיה טרנסגנית, לדוגמה עז, שמייצרת חלבון רקומביננטי רצוי המופרש בחלב, נעזרים בשיטות של הנדסה גנטית. בשלב הראשון משבטים את הגן המקודד לחלבון הרצוי וכן אזור בקרה מתאים. אזור בקרה מתאים הוא אזור בקרה של גן הפעיל **רק** בבלוטות החלב של העז. לאחר שמשלימים את שיבוץ הגן ואזור הבקרה הרצוי לנשא ביטוי מתאים, מזריקים את הנשא הרקומביננטי לביצית מופרית, כמתואר באיור 8.11 וזאת במטרה לקבל עז טרנסגנית. לאחר העברת הביציות לעזים פונדקאיות עורכים לגדיות שנולדו מבחן PCR לאיתורן של העזים בעלות הטרנסגן בגנום. במקרה של חלבון האנטי-תרומבין הרקומביננטי, הוא התבטא כצפוי בתאי בלוטת החלב והוא התקבל כצפוי בחלב העזים הטרנסגניות.

שוויי של ליטר חלב מחיה טרנסגנית הוערך ב-\$1000, אך רשויות הבריאות סרבו במשך שנים רבות לאשר את שיווק התרופה שנוקתה מהחלב. רק בשנת 2006, כ-20 שנה לאחר

שנהגה הרעיון, אושר לשווק את התרופה הראשונה מחלב חיה טרנסגנית: תרופת האנטי-תרומבין. זוהי פריצת דרך משמעותית, ובשל כך מנסים כיום לייצר תרופות נוספות בחלב של חיות טרנסגניות. עם תרופות אלה נמנים חלבון המסייע באיחוי פצעים, חלבון נוגד פעילות של גז עצבים וחלבון של וירוס שנחץ לחיסון כנגד אותו וירוס.

## שאלה 8.2

אתם מתכוונים לחקור את תפקידיו של הגן החביב עליכם, הגן X. בידכם DNA משלים של הגן ואתם רוצים להשתמש בו לחקר תפקידי הגן בתאי אדם. לשם כך אתם מתכננים להשיג ביטוי-יתר של ה-DNA המשלים שלו וכן להשתיק את ביטוי הגן התאי כדי לבחון את השינוי בהתנהגות התאים.

1. כיצד תממשו ביטוי-יתר של ה-DNA המשלים של X בתאים, ולאילו חומרים ומרכיבים ביולוגיים נוספים תזדקקו לשם כך?
2. כיצד תממשו את השתקת הביטוי של הגן X בתאים?

## שאלה 8.3

השלמתם את המהלכים שנועדו להשיג ביטוי-יתר של ה-DNA המשלים של הגן X בתאים. אתם רוצים לבחון אם אכן התקבלו ביטוי-יתר של ה-RNA וביטוי-יתר של החלבון.

- א. בחרו בשיטה שמאפשרת לבחון אם מתקיים בתאים ביטוי-יתר של RNA של גן. פרטו את המרכיבים והכלים הניסיוניים שתזדקקו להם כדי לממש מבחן לביטוי-יתר של ה-RNA. כמו-כן פרטו את שלבי העבודה.
- ב. בחרו בשיטה שמאפשרת לבחון אם מתקיים בתאים ביטוי-יתר של החלבון X. פרטו את המרכיבים שתזדקקו להם כדי לממש מבחן לביטוי-יתר של החלבון ופרטו את שלבי העבודה.

## שאלה 8.4

- א. מהם מאפייניו של ה-RNA קטן מפריע ומהו עיקרון פעולתו של RNA זה?
- ב. אתם מתכוונים להשתמש ב-RNA קטן מפריע כדי להשתיק את ביטוי הגן התאי X.
  1. לאיזה מידע תזדקקו כדי להשיג את מטרתכם?
  2. לאילו מרכיבים ושיטות תזדקקו כדי לממש השתקת ביטוי הגן באמצעות RNA קטן מפריע?
  3. לפניכם קטע קטן מה-RNA של הגן X:

..... A-U-G-C-C-U-G-U-A-C-G-G-U-C-A-G-G-C-A-U-A-U-A-C-A-G-A-G-C-G-U-A-G-C-C-U-A-G-U-C-U-G .....

## שאלה 8.5

השתמשתם ב-RNA קטן מפריע שנועד להשתיק את ביטוי הגן X, ואתם רוצים לדעת אם הצלחתם במשימתכם. הציעו שיטה למימוש מטרה זו, מלבד השיטה העושה שימוש בתספיג צפוני. פרטו את העיקרון שעומד בבסיס השיטה שבחרתם, את הכלים הנדרשים לניצול שיטה זו למטרה שצוינה ואת שלבי העבודה.

## שאלה 8.6

8.6

בדקתם את ההשפעה של קרינה מיינת בעוצמה מסוימת, נמוכה יחסית, על תאי אדם בתרבית. רציתם לדעת מה קרה לביטוי גנים בתא בעקבות הקרינה ולצורך כך השתמשתם בשבבי DNA. במהלך העבודה גיליתם כי 3 שעות לאחר ההקרנה, עלה הביטוי של 59 גנים ואילו הביטוי של 28 גנים ירד. בתאים נמדדו נזקים ב-DNA אך התאים שרדו את ההקרנה.

א. אתם משערים כי חלק מהגנים שביטויים עלה בעקבות ההקרנה בעוצמה נמוכה, נחוצים כדי לאפשר לתאים להסתגל למצב העקה שבעקבות ההקרנה ובפרט כדי לתקן את נזקי הקרינה. מה תעשו כדי להוכיח את השערתכם שלפיה תפקידיו של גן נחקר שביטוי **עלה** בעקבות ההקרנה, הם לאפשר לתא להתגבר על נזקי הקרינה? פרטו שתי גישות ניסיוניות עיקריות. כמו כן שערו אילו תוצאות ניסיוניות יבססו השערה זו.

ב. מה הן הגישות הניסיוניות שבהן תבחרו כדי לקבוע בוודאות שגן נבחן שביטוי **ירד** אכן נחוץ להגנה מפני נזקי קרינה? אילו תוצאות ניסיוניות יתמכו בקביעה זו?

ג. הקרנתם את התאים בעוצמת קרינה גבוהה שגורמת בסופו של דבר למוות, ובדקתם את ביטוי הגנים 8 שעות לאחר ההקרנה. גיליתם כי ביטויים של 48 גנים עלה וביטויים של 22 גנים ירד.

1. מהי השערתכם באשר לתפקידם של גנים אלה שביטויים השתנה (עלה או ירד)?

2. מה הן הגישות הניסיוניות שבהן תבחרו כדי להוכיח את השערתכם ואילו תוצאות יעידו כי ההשערה באשר לתפקידיו של גן נבחן נכונה?

3. על-פי מה שלמדתם, מה עשוי לקרות לביטוי p53 לאחר ההקרנה בעוצמה הגבוהה? מה יעלה בגורלם של תאים אלה אם תגרמו בהם לביטוי-יתר של p53 גם בהיעדר הקרנה?

## שאלה 8.7

8.7

בהמשך לשאלה 8.6, גיליתם כי ניתן לקבל תוצאות דומות גם בתאי העכבר שבתרבית שנחשפו לקרינה: ביטויים של גנים מסוימים עולה וביטויים של אחרים יורד. החלטתם להתמקד בחקר גן עכברי שביטוי עולה בעקבות הקרנה בעוצמה נמוכה. לגן זה יש גן מקביל באדם (הדומה לו ברצף) שגם ביטוי עולה בתאי אדם שנחשפו לקרינה. מטרתכם להוכיח כי לגן העכברי ולמקבילו האנושי יש תפקיד בהגנה מפני קרינה גם באורגניזם השלם.

א. באיזה "כלי ניסיוני" (או "כלים ניסיוניים") תבחרו כדי להוכיח כי לגן נבחן תפקיד בהגנה על האורגניזם מפני נזקי קרינה?

ב. מה הם המרכיבים המולקולריים והשיטות שתזדקקו להם לצורך הכנת "הכלי הניסיוני" ומה הם שלבי העבודה?

ג. לאחר שיצרתם "כלי ניסיוני" מתאים, הציעו מערך ניסיוני שיאפשר לכם לאמת את השערתכם. מה הם המשתנים הניסיוניים שתבדקו? מה הן התוצאות הצפויות?

## הנדסה גנטית בצמחים



**המהפכה היוקרה בכך דינו.** ייצורם של צמחים טרנסגניים המבטאים גנים רצויים שהוחדרו אליהם במכוון הפך עניין שבשגרה. מבין הצמחים שעשויים להעניק עתיד טוב יותר לאדם ולסביבתו נמצאים צמחים טרנסגניים עמידים לתנאי אקלים קיצוניים, צמחים עמידים לקוטלי עשבים וכאלה העמידים לחרקים. שימוש בצמחים שכאלה מייצל עבודה חקלאית, מגדיל את התוצרת ומקטין את חשיפת החקלאים לחומרים מסוכנים. חשובים לא פחות הם הצמחים הטרנסגניים שערכם התזונתי שופר, ובכלל זה צמחים שהונדסו לייצר ויטמינים ומרכיבי מזון אחרים. צמחים אלה משפרים את תזונתן של אוכלוסיות נרחבות בארצות מתפתחות הסובלות ממהלות בשל מחסור במזון וויטמינים. לא פלא שההערכה ליישומים ביוטכנולוגיים בצמחים היא עצומה, שכן הם בעלי חשיבות למיליארדי אנשים.

הטכנולוגיות של ההנדסה הגנטית מאפשרות לווסת את ביטויים של גנים גם בתאי צמח. ביטוי-יתר של גן או השתקת ביטוי באמצעות RNA קטן מפריע יכולים לסייע בחקר תפקידיו של הגן בתא ובצמח השלם. משנמצאו תפקידיו של גן, ניתן לבחון אם אפשר לנצל את הגן לצורך השבחת צמחים אחרים (יישום ביוטכנולוגי). ביישום ביוטכנולוגי טיפוסים מחדירים לתא צמח מקטע DNA, לדוגמה גן רצוי, כדי לקבל צמח טרנסגני בעל תכונות משופרות. השבחת צמחים באמצעות העברתם לתא של גנים רצויים - לא בהכרח גנים ממקור צמחי - הניבה עד כה צמחים טרנסגניים מוגוונים. עם אלה נמנים צמחים בעלי עמידות לתנאי אקלים או סביבה קיצוניים, צמחים עמידים למחלות, למזיקים או לחומרי הדברה ועוד. סיכום מאפייני ההשבחה באמצעות ההנדסה הגנטית בהשוואה למאפייני ההשבחה הקלסית של צמחים מובא בתיבה 8.5.

### תיבה 8.5: השבחת צמחים בדרך הקלסית והשבחה המבוססת על ההנדסה הגנטית.

השבחה של צמחים בדרך של גנטיקה קלסית החלה הרבה לפני עידן ההנדסה הגנטית והיא מצויה בשימוש גם היום. כך, כדי לקבל צמחים בעלי תכונות משופרות, ניתן לבצע הכלאות על ידי העברת אבקה מצמח לצמח. לדוגמה, כדי לקבל צמחי עגבנייה למאכל העמידים למחלות ניתן להכליא בין צמח עגבנייה שפירותיו משובחים ובין צמח עגבנייה מזן הבר העמיד למחלות. יש לשוב ולהכליא בין צמחי העגבנייה במשך שנים רבות כדי לשמור על תכונות הצמח הרצוי בעת החדרת השיפור המבוקש. לעומת זאת, בעזרת ההנדסה הגנטית ניתן בתוך פחות משנה להשביח את תכונותיו של צמח.

התהליך הקלסי המבוסס על הכלאה בין צמחים מוגבל לזני צמחים של אותו מין בלבד. כך לדוגמה, אם נמצאה תכונה טובה בצמח התירס, לא ניתן להעבירה לצמח העגבנייה באמצעות התהליך הקלסי של הכלאות. ההנדסה הגנטית לעומת זאת מאפשרת להתגבר על מחסום המינים. כך, כדי לשנות את תכונות הצמח וגם לשפרן, ניתן להחדיר לצמח גן שמקורו ממין צמח אחר ואפילו גן שמקורו באורגניזם אחר.

ההנדסה הגנטית מאפשרת להשביח אורגניזמים ובכלל זה צמחים. ניתן לייצר צמח טרנסגני שבו ביטוי-יתר של טרנסגן מקנה לצמח יבולים גבוהים ו/או יבולים בעלי ערך תזונתי משופר. עם הצמחים הטרנסגניים הקלסיים נמנים צמחים בעלי עמידות לחרקים, לקוטלי עשבים וצמחים שהונדסו כדי לייצר ויטמינים.

## הנדסה גנטית בעזרת תרביות צמחים

ייתכן שנתקלתם בתופעה של ייחור המתפתח לצמח שלם. ייחור, כגון גבעול בעל עלים, מפתח בסביבה לחה שורשים, וכך ניתן לקבל צמח שלם ללא רבייה מינית. ניתן לייעל תהליכי רבייה אל-מינית בעזרת תרבית. תרבית של רקמה צמחית מאפשרת לתאי הצמח להתרבות ולהתמייין בתנאי מעבדה מבוקרים. תנאים אלה כוללים בין השאר מזון, טמפרטורה ואור הדרושים לתהליכי ההתרבות וההתמיינות.

תרבית של רקמה צמחית מאפשרת לקחת תא של צמח או איבר צמחי (לדוגמה, גבעול או דיסקיות עלה) ולגרום לכל אחד מאלה בנפרד, ובנוכחות הורמונים ותנאים מתאימים אחרים, להתפתח לצמח שלם.

כמתואר באיור 8.12, כשמעבירים לתרבית קרעי עלים (או דיסקיות עלים) או פרוטופלסט (תא חסר דופן) מתרחשות חלוקות תאים שבעקבותיהן מתקבלת רקמה רכה ובהירה הקרויה קאלוס. תאי הקאלוס גדלים בצורה בלתי מאורגנת, והם תאים שלא עברו התמיינות. אם מוסיפים למצע הגידול שבו התפתח הקאלוס הורמונים צמחיים מתאימים, תתרחש התמיינות של תאי הקאלוס. מקצת תאי הקאלוס יתמיינו לשורשים ואחרים יתמיינו לגבעולים ועלים. כך נוצר למעשה צמח שלם בתרבית. לכן אומרים שתאי צמח הם בעלי יכולת לפתח ללא זרע את כל איברי הצמח בזכות תכונת הרגנרציה (היצירה מחדש) של איברים.

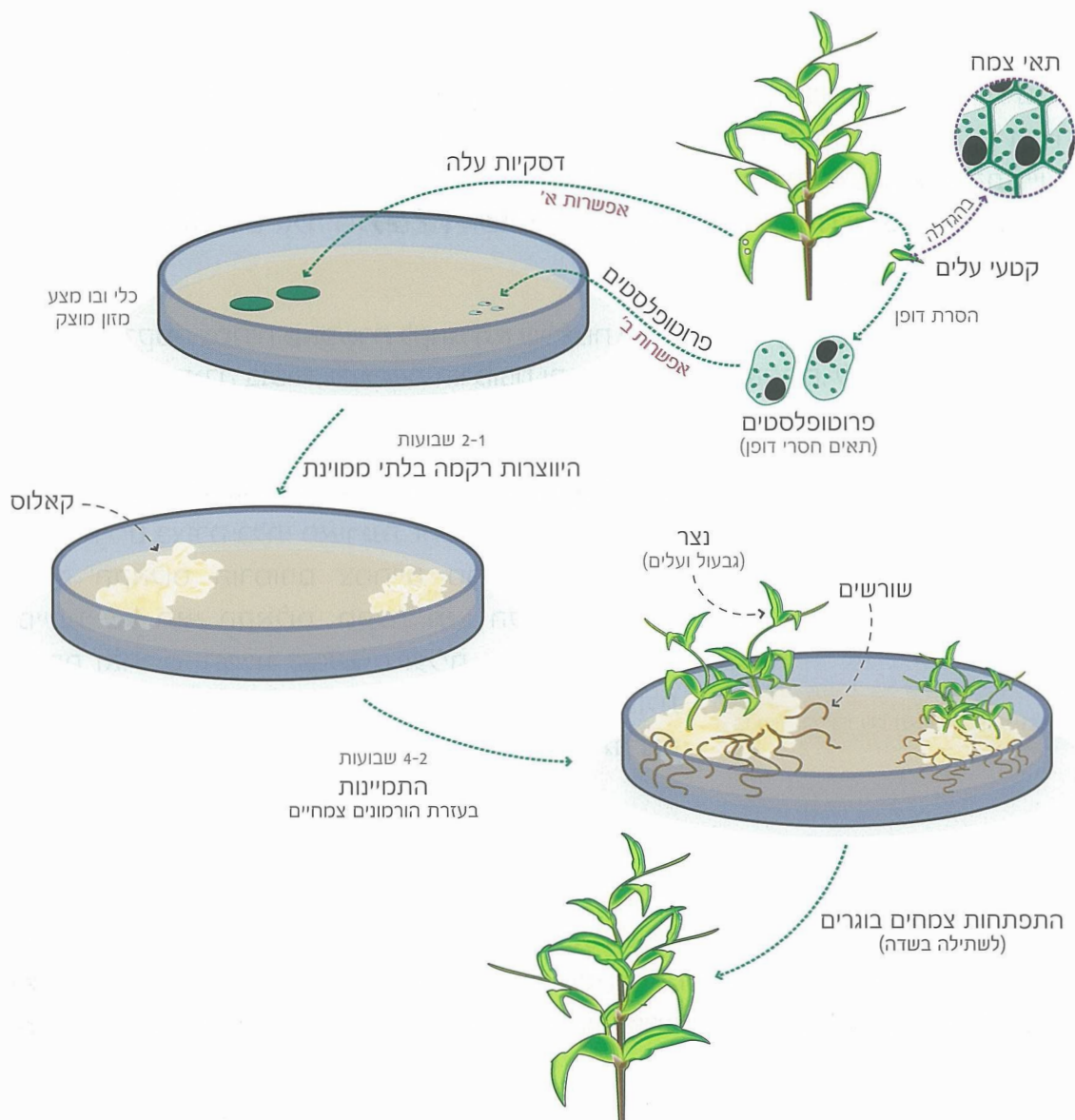
קל להתרשם שכשתרבית מאפשרת התפתחות צמחון מתא בודד, מתקיים למעשה תהליך של שיבוט, אך הפעם מדובר בבידוד ורבייה של תא ושל אורגניזם.

חוקרי הצמחים במחצית השנייה של המאה ה-20 חיפשו דרכים יעילות להחדרת DNA רצוי לתאי צמח הגדלים בתנאי תרבית במטרה לקבל צמח טרנסגני. ואכן, בשנות ה-70 של המאה ה-20 חלה פריצת דרך שנחשבה לאחת ההפתעות הגדולות ביותר בתחום ההנדסה הגנטית. התברר כי חיידק בשם אגרובקטריום (*Agrobacterium tumefaciens*) מדביק תאי צמח ומחדיר לתוך הגנום שלהם מקטע DNA. בשל כך, כונה חיידק זה "המהנדס הגנטי הטבעי הקדום ביותר". ניתן לרתום את חיידק האגרובקטריום ולהחדיר בעזרתו DNA רצוי לתאי צמח.

### סיפורו של חיידק האגרובקטריום הנחשב "למהנדס הגנטי הקדום ביותר"

כמתואר באיור 8.13, עפצים בצמחים הם גידולים הנוצרים כתוצאה מהתרבות בלתי מרוסנת של תאים שבעקבותיה מתפתח גידול (Tumor). עוד בתחילת המאה ה-20 היה ידוע כי עפצים בצמחים דו-פסיגיים הם למעשה מעין מחלה סרטנית שזכתה לשם Crown Gall, וכי הגורם למחלה זו הוא חיידק האגרובקטריום. חיידקי האגרובקטריום המצויים בקרקע נעים אל פצע בצמח ובעקבות המגע בין החיידק לצמח הופכים תאי הצמח לסרטניים באופן תמידי. לאחר שנוצר הגידול הוא יכול להמשיך להתפתח ללא החיידקים שהם הגורם הראשוני לגידול העפץ.

כשמעבירים את תאי העפץ לתרבית, תאי הגידול מתרבים באופן בלתי מרוסן וללא צורך בתוספת הורמונים, והתאים אינם מתמיינים לצמחונים. תאי העפץ שונים מתאי צמח בריא גם בשל העובדה שהם מייצרים נגזרות של חומצות אמינו הנקראות אופינים (Opines) ששום צמח בריא אינו מסוגל לייצרם.

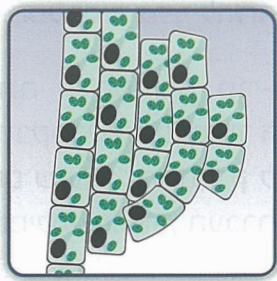


**איור 8.12: תרביות רקמה של צמחים מאפשרות רגנרציה ושיבוט.**

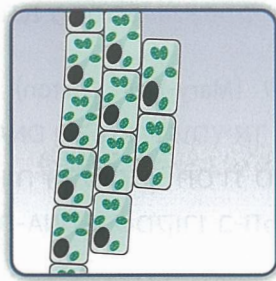
לקיום תרבית רקמה צמחית במעבדה נדרש מכלול תנאים מוגדר המאפשר לתאי הצמח להתרבות ולהתמייין כשהם גדלים במצע מזון מלאכותי. לקיום תרבית צמחית טיפוסית מקובל להשתמש במצע אגר שבו סוכרים, מלחים והורמונים המאפשרים לתאי הצמח להתרבות ולהתמייין לאברים ולצמח שלם. גם תא בודד חסר דופן (פרוטופלסט) יכול להתרבות במצע זה (לאחר יצירת דופן התא). בשלב הראשון מתקבלת רקמה רכה בלתי ממוינת הנקראת קאלוס. שינוי ביחסי ההורמונים השונים הוא הגורם הנחוץ להתמיינות לאברי הצמח השונים (רגנרציה). צמח שמקורו בפרוטופלסט בודד מוכנה צמח משובט.

תרביות משמשות גם לריבוי מהיר של צמחונים נקיים ממחוללי מחלה (כמו וירוסים וחיידקים). התרבית שימושית במיוחד לריבוי צמחים חסרי יכולת לרבייה מינית (כמו צמח הבננה). וחשוב במיוחד, תנאי התרבית מאפשרים לייצר צמחים טרנסגניים.





הדמיה של שלב מתקדם  
בהתפתחות עפץ



הדמיה של שלב מוקדם  
בהתפתחות עפץ



עפצים בצמח

### איור 8.13: עפץ בצמחים מתאפיין בחלוקת תאים בלתי מרוסנת.

העפץ בצמח נחשב לגידול סרטני בלתי מרוסן. גידול זה יכול להיגרם כתוצאה מהדבקה על-ידי חיידק האגרובקטריום.

כדי להבין את חידת העפצים בצמחים, שאלו החוקרים כיצד החיידק מתמיר תא צמחי והופך אותו לסרטני? מדוע תאי הגידול אינם זקוקים לתוספת של הורמונים ממקור חיצוני לשם גדילתם וריבויים? מדוע מייצרים תאי העפץ אופינים, חומרים ששום תא צמחי בריא אינו מייצר? הרמזים על התרחשות מיוחדת בין החיידק והצמח לא איחרו לבוא. הסתבר כי האופינים הם חסרי ערך עבור הצמח אך משמשים להזנת החיידק. הסתבר כי החיידק האלים מאלץ את הצמח לייצר עבורו מרכיב בעל תועלת. איך כל זה קורה?

העובדה שלאחר שהאגרובקטריום הדביק את תא הצמח הוא אינו נחוץ להמשך התפתחות הגידול, העלתה את האפשרות שה-DNA של החיידק חודר לתא הצמח וגורם להפיכתו לתא סרטני. רק לאחר מאמצים רבים שהושקעו בשכלול השיטות, הצליחו החוקרים הבלגים ג'ף של ומארק ואן מונטגו (J. Schell and M. Van-Montagu) בשנת 1974 לאתר פלסמיד באגרובקטריום. גודלו של הפלסמיד באגרובקטריום כ-200,000 זוגות בסיסים, פי 10 מגודלם של פלסמידים נפוצים. עובדה חשובה במיוחד היא כי בזנים מסוימים של אגרובקטריום שאינם גורמים לגידול, לא נמצא פלסמיד כלל. מכאן שישנה התאמה (Correlation) בין נוכחות הפלסמיד בחיידק לבין הופעת הגידול בצמח. ההתאמה רק מחזקת את ההשערה שלפיה הפלסמיד הוא גורם ההתמרה הסרטנית, אך אין בכך הוכחה חותכת שהפלסמיד אכן אחראי להופעת הגידול.

כדי להוכיח שהפלסמיד הוא גורם ההתמרה הסרטנית, גרמו החוקרים לחיידק אגרובקטריום אלים לאבד את הפלסמיד וזאת על ידי גידולו בחום לא מסוים. טיפול זה גרם לכך שהחיידק איבד את יכולתו לגרום לגידול סרטני. בניסוי חשוב נוסף, כאשר הוחדר הפלסמיד לחיידק שאיבד אותו, החיידק רכש מחדש את יכולתו לגרום לגידול. לכן הוכח כי הפלסמיד, שזכה לשם pTi, מקנה לחיידק האגרובקטריום את יכולת ההתמרה הסרטנית של תאים.

□ שמו של הפלסמיד pTi מקורו בקיצורים "p" (plasmid), ו-"Ti" (Tumor-inducing).

בעקבות זאת נשאלו השאלות האלה: איזה חלק בפלסמיד מאפשר לו לגרום להתמרה סרטנית בצמח? האם הפלסמיד צריך לחדור לשם כך לתא הצמח?

הייתה זו החוקרת מרי-דל שילטון (Mary-Dell Chilton) שהוכיחה ב-1977 כי מקטע מפלסמיד האגרובקטריום, הפלסמיד **pTi**, מצוי ב-DNA של תאי העפץ אך לא ב-DNA של תאי צמח אחרים. מקטע ה-DNA ש"עבר" מהחיידק לצמח, המהווה חלק קטן יחסית מהפלסמיד, זכה לכינוי **T-DNA** (T - קיצור של המילה Transfer, העברה). אם כך, ה-T-DNA שמקורו ב-pTi חשוד כמשתתף ביצירת העפץ בצמח. מיד צצו שאלות חשובות: האם ה-T-DNA הוא המרכיב היחיד בפלסמיד הנחוץ לתהליך יצירת הגידול? האם ה-T-DNA עובר שיבוץ בגנום התא הצמחי או שהוא חופשי בתא? האם הוא מקודד לחלבונים ואם כן, לאילו?

הסתבר כי ה-T-DNA משתבץ בגנום שבגרעין תא הצמח, ולכן המקטע החיידקי מורש לתאי הבת. לכל אותם חוקרים שעסקו בניסיון לפתח שיטות להחדרת DNA רצוי לצמחים הייתה עובדה זו בבחינת תגלית מרעישת. הסתבר להם כי האגרובקטריום הוא "מהנדס גנטי" מטבעו. עוד הסתבר כי מלבד מקטע ה-T-DNA ישנו בפלסמיד ה-pTi אזור נוסף בעל חשיבות. אזור זה קרוי VIR והוא נחוץ להעברת ה-T-DNA מהחיידק לתא הצמח. מאחר שכך, עלתה השאלה המתבקשת והבלתי נמנעת הבאה: האם ניתן לסלק מפלסמיד ה-pTi את האזור הגורם לעפץ (T-DNA) ולנצל את המרכיבים האחרים ב-pTi כדי להחדיר לצמח DNA רצוי לצורכי מחקר והשבחה?

### החדרת DNA רצוי לתאי צמח: ניצול האגרובקטריום וכלים אחרים

כמתואר באיור 8.14, לחיידק האגרובקטריום יש פלסמיד טבעי הקרוי pTi, ופלסמיד זה אחראי להעברת מקטע DNA פלסמידי מתוכו לתא הצמח. מקטע ה-DNA העובר מהחיידק לצמח נקרא "T-DNA" ובהיותו בתא הצמח הוא גורם להתמרה הסרטנית של תאי הצמח וליצירת עפץ. כיום מנצלים את מרכיבי הפלסמיד pTi כדי להעביר DNA רצוי לתא הצמח וכל זאת מבלי לגרום לגידול הלא רצוי.

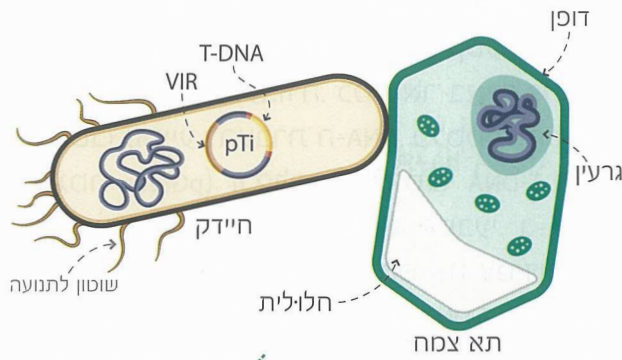
האזורים ב-pTi האחראיים להעברת ה-T-DNA לתא הצמח הם ה-T-DNA בעצמו ואזור הקרוי VIR (איור 8.14ב). ב-T-DNA מצויים גנים המקודדים לחלבונים בעלי תפקיד בייצור הורמונים צמחיים המשרים גידול בלתי מרוסן וכן גנים הנחוצים לסינתזה של אופינים הנחוצים לחיידקים. לעומת זאת, ב-VIR מצויים גנים המקודדים לחלבונים שכל תפקידם הוא לאפשר ל-T-DNA לחדור לתא הצמח. אזורים נוספים חשובים הם רצפי DNA קצרים הממוקמים בקצוות ה-T-DNA והנקראים "גבולות". הגבולות נחוצים אך הם בתהליך העברת ה-T-DNA לתא הצמח (ברצפים אלה נחתך ה-DNA לפני העברתו). סיכום התהליך המתאר את ההעברה

של ה-T-DNA לתא הצמח, השתלבותו של ה-T-DNA בגנום וההשלכות שיש לכך על הופעת העפץ, מובא באיור 8.14ג-ד.

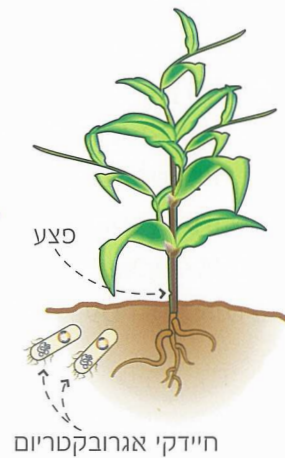
VIR הוא קיצור של Virulence שפירושו אלימות, והוא בא לציין שהאזור נחוץ להופעת העפץ האלימה שכן בלעדיו ה-T-DNA אינו עובר לתא.

האזור VIR מקודד בין היתר לחלבונים שמייצרים את התעלה בין החיידק לתא הצמח שדרכה חוזר ה-DNA.

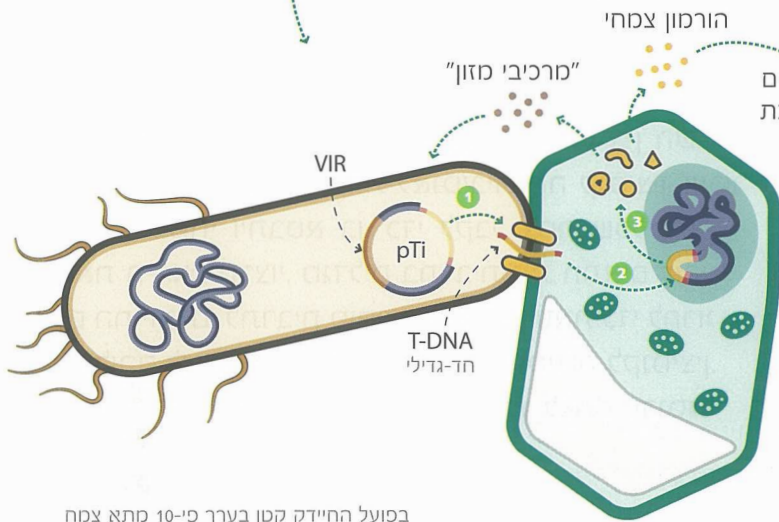
ב. הדבקת תא צמח על-ידי חיידק אגרובקטריום



א. חיידקי אגרובקטריום נעים לעבר סצע בצמח

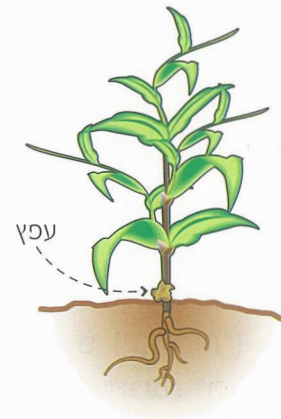


ג. מעבר T-DNA של אגרובקטריום לתא הצמח



בפועל החיידק קטן בערך פי-10 מתא צמח

ד. הופעת עפץ, תוצאה של גידול בלתי מרוסן



**איור 8.14: חיידק האגרובקטריום אחראי ליצירת גידולים (עפצים) בצמחים.**

חיידק האגרובקטריום "שוחה" לעבר סצע בצמח. לחיידק פלסמיד טבעי הקרוי pTi. לאחר המגע בין חיידק לתא צמח נוצרת "תעלה" בין התאים, ודרכה עובר מקטע DNA שמקורו בפלסמיד. המקטע העובר נקרא "T-DNA", והוא עובר שיבוץ לגנום תא הצמח. במקטע זה מצויים גנים המקודדים לחלבונים שתפקידם לייצר הורמונים צמחיים ותרכובות מזון לחיידקים. ההורמונים שנוצרו בהשפעת ה-T-DNA גורמים לחלוקת תאים בלתי מרוסנת, וכך נוצר גידול.

כדי שה-T-DNA יעבור מהחיידק לצמח, החיידק נזקק לאזור נוסף של הפלסמיד הנקרא VIR. אזור זה מקודד לחלבונים בעלי תפקיד במעבר ה-T-DNA.

לאחר שה-T-DNA עבר לגרעין התא, הוא עובר שיבוץ בגנום. בהיותו בגנום, גנים שב-T-DNA מתבטאים ונוצרים בתא הורמונים צמחיים האחראיים להתרבות בלתי מרוסנת של תאי הצמח. ניתן לנצל חיידק אגרובקטריום שאינו אליים ושנושא שני פלסמידים רקומביננטיים כדי להעביר גן רצוי לתא צמח שיכול להתפתח לצמח טרנסגני.

כיצד מחדירים DNA רצוי לתא צמח באמצעות ה-DNA הפלסמיד של האגרובקטריום? התברר כי אין הכרח ש-DNA ו-VIR יהיו על אותו פלסמיד כדי שמקטע ה-DNA יעבור לתא הצמח. מכיוון שפלסמידים קטנים יחסית מאפשרים קשירה יעילה של מקטעי DNA לתוכם, שימש הפלסמיד הגדול  $\lambda$  זק להכנת שני פלסמידים קטנים הנוחים לעבודה. כמתואר באיור 8.15, הפלסמיד האחד שהוכן הוא "פלסמיד עוזר" שאזור ה-VIR שבו מסייע להעברת ה-DNA. פלסמיד זה נקרא pVIR. הפלסמיד השני שהוכן הוא "פלסמיד מעביר" (לדוגמה pGreen), ובפלסמיד זה מצוי T-DNA **רקומביננטי** שלא נמצאים בו הגנים האחראיים לעפץ, שהם גנים המצויים רק ב-DNA הטבעי. ב-DNA הרקומביננטי אשר ב"פלסמיד המעביר" ממוקמים מקבץ אתרי הגבלה וכן הגן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה קנמיצין. מקבץ אתרי הגבלה נועד לאפשר שיבוץ של DNA רצוי לתוך ה-DNA הרקומביננטי. ה-DNA הרצוי שישוּבץ ל-DNA מיועד להעברה לתא הצמח, והעברה זו תיעשה בעזרת ה"פלסמיד העוזר". הגן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה מאפשר רק את גידולם של תאים שקלטו DNA רצוי (תאים טרנסגניים).

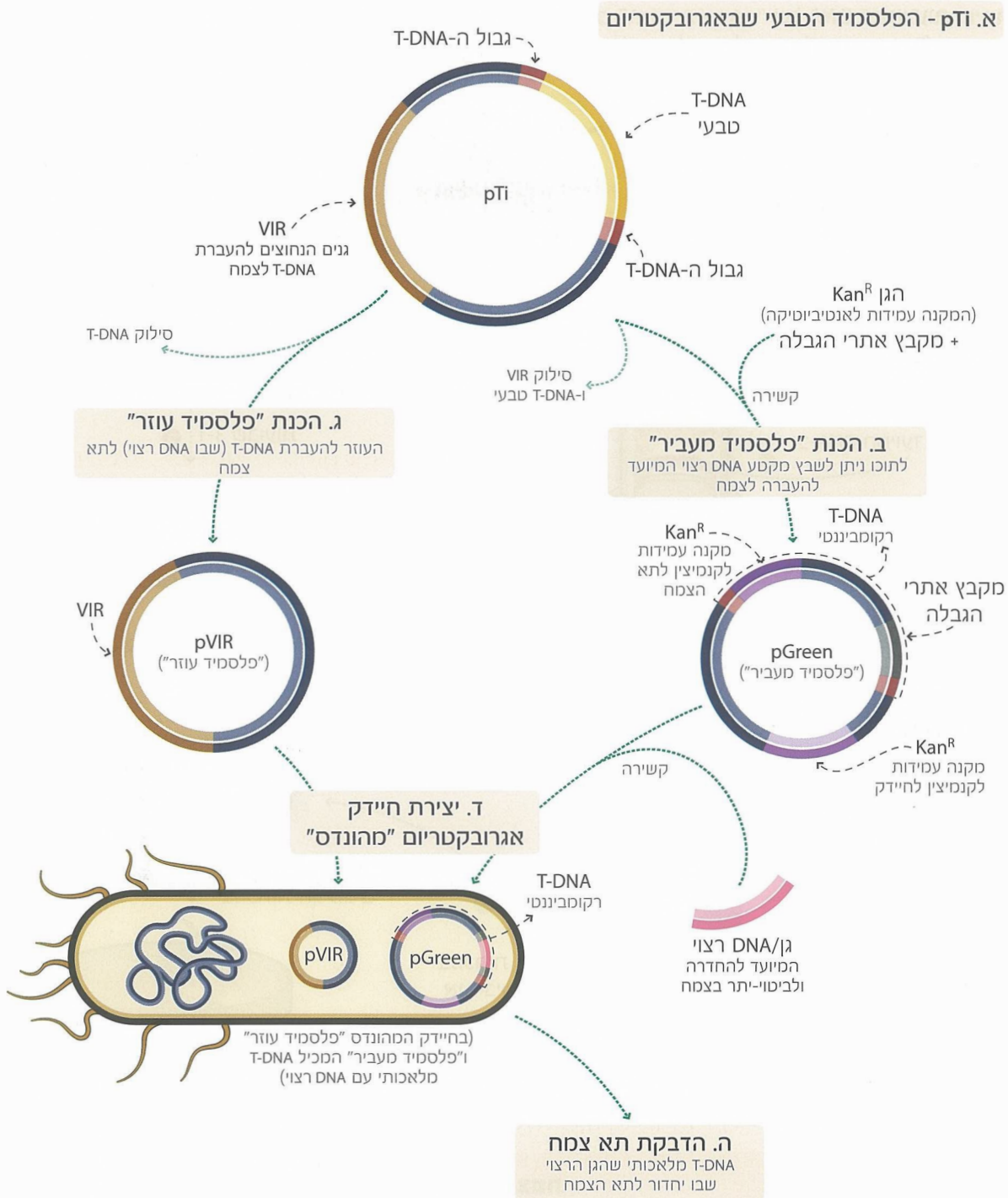
ליצירת צמח טרנסגני ("מהונדס") בעזרת האגרובקטריום יש בראש ובראשונה לייצר במבחנה "פלסמיד מעביר" רקומביננטי. "פלסמיד מעביר" זה יכול T-DNA שבו ישוּבץ ה-DNA (או הגן) שמעוניינים להעביר לתא הצמח ("DNA רצוי"). לאחר מכן מחדירים את הפלסמיד הרקומביננטי לחיידק אגרובקטריום שלתוכו כבר הוחדר "הפלסמיד העוזר". כמתואר באיור 8.16, חיידק מהונדס כזה, שבו שני הפלסמידים, יבוא במגע עם תאי צמח בתרביית. בעקבות המגע בין השניים, ה-DNA הרקומביננטי, שבו ה-DNA הרצוי לביטוי והגן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה קנמיצין, יעבור לתא הצמח. מקטע DNA זה ישתלב בגנום התא הצמחי ויתבטא בו. כדי לקבל צמח שכל תאיו נושאים את ה-DNA הרצוי, מגדלים בתרביית את התאים שהיו במגע עם החיידקים. לתרביית מוסיפים קנמיצין וזאת כדי להרוג תאים שאליהם לא חדרו ה-DNA הרצוי והגן לעמידות לקנמיצין. תאים עמידים לקנמיצין יתפתחו בסופו של דבר לצמח טרנסגני שבכל תא מתאיו מצוי הגן הרצוי.

□ הבררה בעזרת קנמיצין היא חיונית, שכן יעילות ההדבקה של תאים בתרביית על ידי החיידק והפלסמידים שבו אינה גבוהה, ובהיעדר אנטיביוטיקה מרבית התאים שבתרביית יהיו תאים שאליהם לא חדר DNA.

האגרובקטריום מדביק בעילות צמחים דו-פסיגיים. לעומת זאת, יעילות ההדבקה של צמחים חד-פסיגיים (דוגמת הדגנים) היא נמוכה, ולכן השימוש בו להנדסה גנטית של צמחים חד-פסיגיים מוגבל. בשל כך יש צורך גם בשיטות חלופיות להחדרת DNA לתא צמח. אחת הדרכים החלופיות להחדרת גנים רצויים לתא צמח היא באמצעות ירי של חלקיקים מיקרוניים ("כדוריות") מצופים ב-DNA לעבר תאי הצמח. ירי של חלקיקים המצופים ב-DNA באמצעות מה שמכונה "תותח גנים" מתואר באיור 8.16. את החלקיקים ממקמים בתא ואקום שהוא החלק העיקרי ב"תותח הגנים". לצורך ה"ירי" מעלים את הלחץ בתא הוואקום, החלקיקים ניתקים מהמשטח שעליו מוקמו וחודרים לתא. לאחר שה-DNA חדר לתא הצמח, מתקבל ביטוי זמני של ה-DNA. במקצת התאים, ה-DNA שהוחדר ושמוכיל גם גן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה, עובר שיבוץ לגנום. לכן אפשר להשתמש באנטיביוטיקה כדי לקיים בְּרָה המאפשרת את התרבותם רק של התאים הטרנסגניים שבהם ביטוי קבוע של הגן הרצוי. תאים אלה מתמיינים בסופו של דבר, ומתקבל צמח טרנסגני.

□ למרות קיומן של שיטות חלופיות להחדרת גנים, האגרובקטריום מצוי עדיין בשימוש, וזאת כיוון שהוא מאפשר שיבוץ של מספר מצומצם יחסית של עותקי הגן לגנום התא הצמחי, וכך עולה הסיכוי לשמור על שלמות הגנום של התא הצמחי.

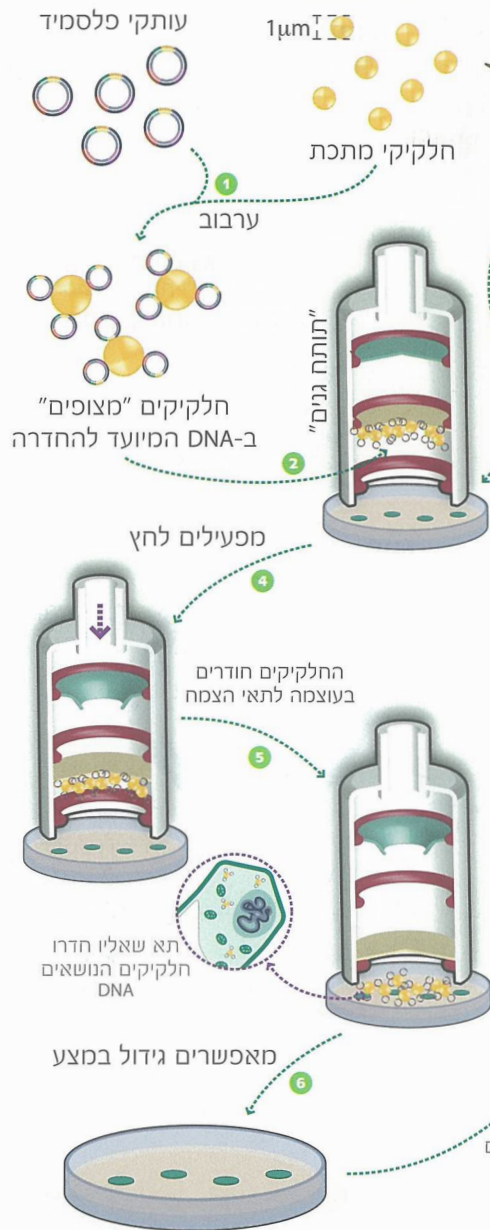
כדי לייצר צמח טרנסגני בעזרת חיידק האגרובקטריום, משתמשים במערכת ובה שני פלסמידים: "פלסמיד מעביר" ו"פלסמיד עוזר". כמתואר באיור 8.15, בפלסמיד המעביר קיים גן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה וכן מקבץ אתרי הגבלה שלתוכו משבצים את הגן שרוצים שיתבטא בצמח. משני עבריהם של רצפים אלה קיימים רצפי DNA הנקראים "גבולות ה-DNA-T" המזוהים על ידי אנזימים המאפשרים למקטע ה-DNA-T על הגנים שבו להתנתק מהפלסמיד ולהשתלב בגנום.



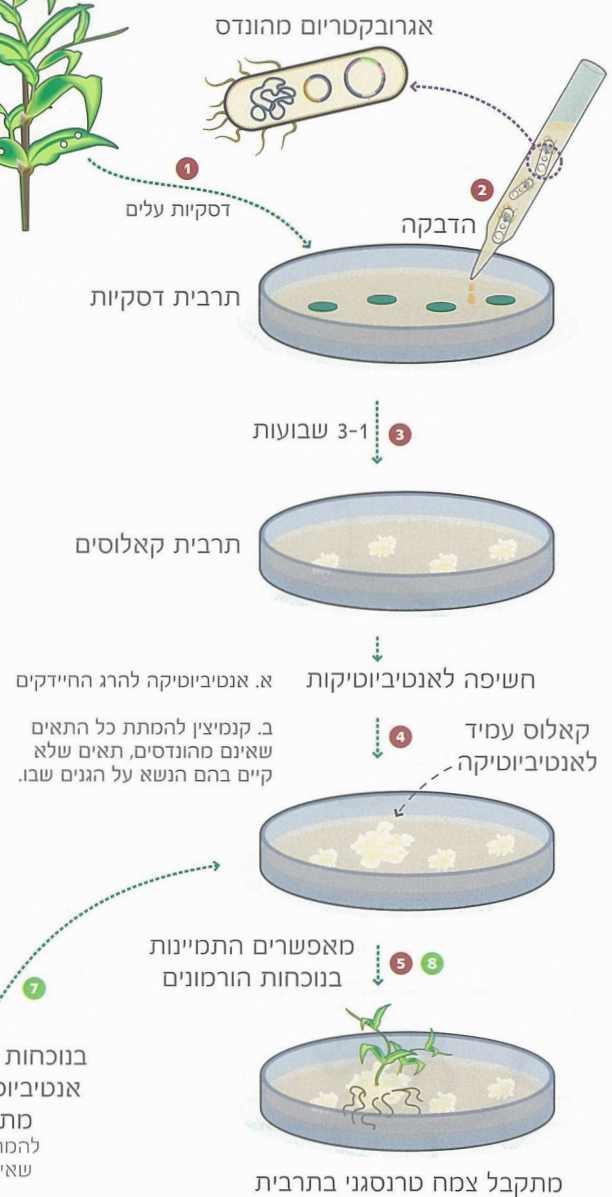
**איור 8.15: שימוש בשני פלסמידים מלאכותיים באגרובקטריום לצורך העברת DNA רצוי לתא הצמח.**

הפלסמיד הטבעי pTi מכיל "גנים אלימים" כלפי הצמח. ניתן לסלק את קטע ה-DNA "האלים" ולנצל את יתר מרכיבי הפלסמיד ליצירת מערכת להעברת DNA רצוי. כדי לממש זאת יוצרו שני פלסמידים רקומביננטיים: "פלסמיד עוזר" ו"פלסמיד מעביר". את ה-DNA הרצוי להעברה משבצים באתרים במקבץ אתרי הגבלה אשר ב"פלסמיד המעביר".

**ב. "החדרה ישירה" של DNA באמצעות שיטה לירי חלקיקים ("תותח-גנים")**



**א. "החדרה עקיפה" של DNA באמצעות אגרובקטריום**



**איור 8.16: שיטות נפוצות להחדרת DNA רצוי לתאי צמח.**

ניתן להעביר DNA רצוי לתא צמח באמצעות "שיטה עקיפה" העושה שימוש בחיידק האגרובקטריום שבו מערכת של שני פלסמידים. לעומת זאת, ב"שיטה הישירה" מחדירים את ה-DNA הרצוי בעזרת חלקיקים המופצצים על ידי "תותח גנים". שתי השיטות מתאימות לקבלת צמח טרנסגני שמתפתח בעזרת תרבית.

ניתן כיום להעביר לצמח DNA רקומביננטי גם ללא צורך בתרביות תאים. ניתן לעשות זאת על-ידי הדבקת תפרחות צמח בחיידק אגרובקטריום מהונדס. כתוצאה מההדבקה, ה-T-DNA מהחיידק מועבר לתאי המין של הצמח ומשם לעובר המתפתח. כתוצאה מכך חלק מהזרעים שמקורם בתפרחות המודבקות מותמרים גנטית, וניתן לזהותם לפי עמידות הנבטים לאנטוביוטיקה.

כמתואר באיור 8.16, ניתן להחדיר גן רצוי לתא צמח גם בשיטה חלופית העושה שימוש במתקן לירי חלקיקים מצופי DNA. מכיוון שהגן הרצוי מוחדר לתא הצמח יחד עם גן המקנה עמידות לאנטוביוטיקה, הרי שתאים עם DNA זה ישרדו בתנאים שבהם נוכחת אנטוביוטיקה מתאימה. עובדה זו מאפשרת רק לתאים שלתוכם חדר הגן הרצוי להתרבות ולהתפתח לצמח טרנסגני.

## יצירת צמחים טרנסגניים בעלי יתרונות חקלאיים וביוטכנולוגיים

בשדה הצמחים חשופים למזיקים כגון חרקים ועשבים שוטים. ניתן לסלק עשבים באופן מכני או ידני, אך פעולה זו מעלה מאוד את מחיר התוצרת. אפשר גם לרסס בקוטלי עשבים, אך יש להגביל את הריסוס לשלב שלפני גידול הצמח הרצוי מחשש שיפגע אף הוא. פתרון רצוי אחר הוא לייצר צמחי יבול (כגון תירס, כותנה, סויה, ואחרים) עמידים לקוטלי העשבים. כך ניתן להשתמש בקוטלי עשבים להשגת צמחים הגדלים בסביבה נקייה מעשבים. בהיעדר עשבים, יניבו הצמחים יבול גבוה יותר.

ניתן לקבל בדרכים גנטיות קלסיות צמחים עמידים לקוטלי עשבים, אך זהו תהליך ארוך. בנוסף, בסוף התהליך לא ניתן יהיה להעביר את העמידות לקוטל העשבים מהזן העמיד לצמח ממין אחר. לכן הפתרון המתקדם הוא יצירת **צמחים טרנסגניים עמידים לקוטלי עשבים**. לשם כך מאתרים גן המקנה עמידות לקוטל העשבים שבשימוש ומעבירים אותו לצמחים כדי להקנות להם עמידות רצויה (איור 8.17א').

אחד מקוטלי העשבים המקובלים הוא החומר (GP) Glyphosate. GP הוא מעכב סלקטיבי של אנזים המתפקד בסינתזת חומצות אמינו. כשאנזים זה מעוכב על ידי GP, הצמח מת. אותו שני גנים המקנים עמידות ל-GP ואחד מהם הוא גן המקודד לאנזים המפרק את ה-GP. כאשר מחדירים לתא הצמח את הגן המקודד לאנזים המפרק את ה-GP, מקבלים צמח טרנסגני עמיד ל-GP. צמחים טרנסגניים העמידים ל-GP גדלים בשדות חקלאיים רבים ברחבי העולם, כמפורט בתיבה 8.6.

### □ תיבה 8.6: צמחים טרנסגניים עמידים לקוטלי עשבים מאפשרים לקבל יבולים גבוהים.

הדרישה לצמחים טרנסגניים עמידים לקוטלי עשבים גבוהה במיוחד. כיום הצמחים הטרנסגניים העמידים ל-GP הם בעיקר זני סויה, תירס, קנולה וכותנה. בארצות הברית למעלה מ-80% מהסויה שגודלה בשנת 2008 הייתה טרנסגנית ועמידה ל-GP. בשל כך פחתו במידה ניכרת הוצאות הטיפול השוטף בעשבים, היבול עלה ומחירו היה אטרקטיבי. אך לשימוש בקוטל העשבים נלווית בעיית הופעתם הספונטנית של עשבים עמידים ל-GP. ייתכן שבעתיד יתעורר הצורך להשתמש בקוטלי עשבים אחרים ובמקביל יידרש לייצר צמחים טרנסגניים עמידים לאותם קוטלי עשבים.

בעיה חקלאית נוספת היא הנזק שגורמים חרקים ליבולים. אלא שחשוב לציין כי קוטלי חרקים הם מסוכנים לחקלאי, לסביבה ולעתים לצרכן. בנוסף, עלותם של חומרי ההדברה גבוהה למדי, והיא מייקרת את התוצרת החקלאית. עידן ההנדסה הגנטית מציע דרכים זולות יותר ומסוכנות פחות: **צמחים טרנסגניים עמידים לחרקים מזיקים**.

□ ניתן להשתמש בחיידק ה-Bt כהדברה ביולוגית לריסוס שדות נגועים בחרקים. מכיוון שהחיידק פוגע בזחלים בשלב התפתחותי מסוים בלבד, יש לרסס את השדות שוב ושוב. טיפול כזה יקר, ויעילותו מוגבלת.

לפני למעלה ממאה שנה התגלה כי החיידק הקרוי *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) מייצר חלבון רעיל, או רעלן, הפוגע בחרקים. הנפגעים הם הזחלים של החרקים מכיוון שהרעלן פוגע במערכת העיכול שלהם. הרעיון היה לייצר צמח טרנסגני

א. היתרונות שבגידול צמחים טרנסגניים עמידים לקוטלי עשבים

א3. צמחים טרנסגניים שבהם גן או גנים המקנים עמידות לקוטל עשבים



שימוש מבוקר ומינימלי בקוטל עשבים (הצמחים הטרנסגניים אינם נפגעים)



יבול טוב במחיר סביר

א2. צמחים "רגילים"



סילוק ידני או ממוכן של עשבים



יבול טוב שמחירו גבוה מאוד

א1. צמחים "רגילים"



ללא טיפול



יבול נמוך

עשבים לא רצויים

ב. היתרונות שבגידול צמחים טרנסגניים עמידים לזחלי חרקים

צמחים טרנסגניים שבהם הגן החיידקי Cry המקודד לרעלן זחלי החרקים שאוכלים מהצמח מתים מהרעלן שבו



צמחי ביקורת



איור 8.17: יתרונותיהם של צמחים טרנסגניים עמידים לחרקים או לקוטלי עשבים.

השימוש בשדות בצמחים טרנסגניים עמידים לחרקים ובצמחים טרנסגניים עמידים לקוטלי עשבים מאפשר להגדיל יבולים ולהקטין חשיפה לא רצויה לחומרי הדברה ולקוטלי חרקים. מלבד היתרונות הבריאותיים הנלווים לשימוש בצמחים אלה, חשוב לא פחות לציון כי פוחתת כריתת היערות לצורך הגדלת שטחים חקלאיים. גם מצבם הכלכלי של החקלאים משתפר, מה שמביא לדרישה גוברת לזנים טרנסגניים בעלי יתרונות חקלאיים נוספים.

צמח טרנסגני נוסף בעל ערך חקלאי הוא צמח שמבטא את הרעלן Cry המקודד על ידי הגן החיידקי Cry שמקורו בחיידק Bt. רעלן זה פוגע בזחלי חרקים הניזונים מהצמח, ולכן צמחים המבטאים אותו עמידים לחרקים.



שבכל תאיו יתבטא הגן המקודד לרעלן. זחלי חרקים שייזונו מצמח כזה צפויים למות. צמחים טרנסגניים כאלה יוצרו בשיטות מקובלות של הנדסה גנטית ובעזרת תרבויות.

□ הצורך בגן לעמידות לאנטיביוטיקה נובע מהצורך להסית באמצעות האנטיביוטיקה את כל אותם תאים שלגונם שלהם לא חדר ה-DNA עם הגנים הרצויים.

□ במהלך הכנת הצמח הטרנסגני המבטא את הרעלן Cry ניתן היה לבחור ולמקם בסמוך לגן Cry אזור בקרה שמאפשר ביטוי רק במקצת תאי הצמח. במקרה זה היה מתקבל ביטוי סלקטיבי של הרעלן ברקמות מסוימות בלבד.

להכנת צמח טרנסגני שבו מתבטא הרעלן שמקורו בחיידק Bt-ה, נדרש קודם כול לשבט את הגן **החיידקי** המקודד לרעלן. הגן והרעלן (שהוא חלבון) זכו לשם Cry. בשלב הבא שובץ הגן Cry ליד אזור בקרה שיכול לתפקד בכל תאי הצמח, וכל זה בתוך נשא הכולל גם גן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה **בתאי צמח**. DNA רקומביננטי זה הוחדר לתא צמחי. בעזרת הבקרה בנוכחות האנטיביוטיקה, התקבלו צמחים טרנסגניים שבכל תאיהם התבטא הגן המקודד לרעלן Cry. על אף החשש, הצמחים הטרנסגניים שמוייצרים את הרעלן Cry שמקורו בחיידק Bt-ה ושעמידים לחרקים תפסו מקום מכובד בחקלאות העולמית, כמתואר באיור 8.17 וכמפורט בתיבה 8.7.

### □ תיבה 8.7: צמחים עמידים לחרקים: הצלחה לצד חששות.

הצמחים מבטאי הרעלן Cry והעמידים לחרקים מזיקים, הפכו למסחריים בשנת 1996 ומאז זכו להצלחה. בשנת 2003 היו אלה צמחי קנולה, תירס, כותנה וסויה טרנסגניים שאפשרו, בארצות הברית לבדה, תוספת יבול של 2.4 מיליון טונות ותוספת הכנסה של 2 מיליארדי דולר. במקביל פחת הצורך להשתמש בקוטלי חרקים כימיים ב-21,000 טונות. בסין לדוגמה, צמחים טרנסגניים אלו הקטינו את הרעלת החקלאים העובדים בשדות הכותנה מ-22% ל-5% בלבד. יחד עם ההצלחה, אין להתעלם מחששות אקולוגיים שלפיהם הצמחים הטרנסגניים הנושאים את ה-Cry יפגעו במיני חרקים שאינם מזיקים. מנגד, ייתכן שהפגיעה של הצמחים הטרנסגניים באוכלוסיות חרקים לא מזיקות לא תהייה חריפה מזו הצפויה מהמשך השימוש בקוטלי חרקים כימיים. שיקול נוסף הוא כי אי-שימוש בצמחים טרנסגניים עלול לגרום נזק כבד לסביבה ולאדם.

השבחת צמחים באמצעות החדרת טרנסגן אינה מוגבלת להקניית עמידות למזיקים או לרעלים. ניתן לייצר צמחים בהם ביטוי-יתר של גנים שתפקידם להקנות עמידות לתנאי אקלים וסביבה קיצוניים. ניתן גם לייצר צמחים טרנסגניים בהם ביטוי-יתר של מרכיבים בעלי ערך תזונתי.

התנאי ליישומים אלה הוא בראש ובראשונה מציאת תפקידיהם של גנים בניסיון לאתר את אלה המקנים תכונות רצויות לצמחים.

**הקניית עמידות ליושב באמצעות טרנסגן** היא יעד מחקרי מועדף. זאת בשל הצורך להתמודד עם תהליכי שינוי באקלים הגורמים למדבור והצורך לחסוך במים. גנים שיש להם רלוונטיות להקניית עמידות ליושב, הם גנים שביטויים עולה בעקבות חשיפה של הצמח ליושב. ניתן לאתר גנים כאלה על

סמך המידע על ביטוי גנים בתנאי יובש כפי שמתקבל במבחני ביטוי שבהם נעשה שימוש בשבבי DNA. ההשערה שיש לבדוק היא אם גנים שביטויים עולה בתנאי יובש, מעורבים בהקניית עמידות לצמח בפני אותם תנאי סביבה.

ידוע כי בזמן יובש מיוצר בצמח הורמון ששמו ABA. ההורמון מאפשר הולכת אותות מולקולריים לגורמי תעתוק. פעילותם של גורמי התעתוק עולה, ובעקבות זאת יש עלייה בביטוי גנים מסוימים. ואכן, התברר שכאשר יוצר צמח טרנסגני המבטא ביתר תוצר גן מסוים שעולה בזמן יובש כתוצאה מפעילות ההורמון ABA, היה הצמח הטרנסגני עמיד יותר ליובש מצמח הביקורת. מכאן שגן זה שביטוי עולה בעקבות יובש, **נחוצ** להגנה על הצמח מפני היובש. יש לקיים מחקר נוסף שנועד לגלות אם גם בתנאי שדה תהיה לצמחים טרנסגניים המבטאים גן זה עמידות טובה ליובש, עמידות שעשויה להגדיל את היבול.

מוקד פיתוח נוסף הוא **ייצור צמחים טרנסגניים למטרות שיפור התזונה** של אוכלוסיות, בעיקר בעולם המתפתח. לעניין מיוחד זכו גנים המעורבים בסיתתה של בטא-קרוטן ( $\beta$ -carotene) שהוא פרו-ויטמין A. בשל תפקידו המרכזי של הבטא-קרוטן בגוף יש חשיבות ביצירת צמח טרנסגני שיהיה זמין לאוכלוסיות גדולות בעולם שמזונן אינו מוגון דיו, ושבו יתקיים ביטוי-יתר של בטא-קרוטן. הצמח שנבחר הוא אורז, כמסוכר בתיבה 8.8.

### □ תיבה 8.8: "אורז הזהב" מאפשר ללחם במחלות הנובעות מתזונה לקויה.

בטא-קרוטן, הנותן לצמחים מסוימים את צבעם הכתום, הוא מרכיב חשוב בתזונה שכן בגופנו הוא הופך לויטמין A. על פי נתוני ארגון הבריאות העולמי, היעדרו של ויטמין A במזון במדינות עניות גורם לעוורון בקרב כחצי מיליון ילדים בכל שנה. מחציתם של הילדים שהתעוורו מתים בתוך שנה ממחלות. מספר גדול יותר של ילדים, כמחצית הילדים במדינות עניות, יהיו קורבנות למחלות, שכן בהיעדר ויטמין A המערכת החיסונית חלשה.

אורז הוא מזון מסורתי בסיסי ועיקרי במדינות עניות רבות. מכיוון שלאנשים במדינות אלה אין אפשרות לקבל מזון אחר שיש בו בטא-קרוטן, עלה הצורך לייצר צמח אורז טרנסגני שבהלקיו האכילים יתקבל בטא-קרוטן. כשהתקבל אורז כזה הוא זכה לשם "אורז הזהב" (Golden Rice). הממציאים והמפתחים I. Potrykus-I P. Beyer ויתרו על זכויות הפטנט ותרמו את המצאתם למען הארצות העניות שבהן יש עדיין צורך לשכנע את הנזקקים להשתמש באורז זה.



אורז רגיל לצד "אורז הזהב"

ניתן לייצר צמחים טרנסגניים בעלי תכונות משופרות, כגון עמידות ליובש, על-ידי העברת הגן המקנה את התכונה המשופרת הרצויה לתוך תא הצמח. ניתן לייצר צמחים כאלה רק לאחר שבוצע מחקר המגדיר במדויק את תפקידי הגן המיועד להעברה. מחקר של תפקידי גנים מתבצע על-ידי ביטוי-יתר ובמקביל על-ידי השתקת ביטוי של גן נחקר.

האנדוספרם של גרגיר האורז (החלק של צמח האורז שאנו אוכלים) אינו מכיל בטא-קרופן. נמצא כי באנדוספרם מתבטאים רק מקצת הגנים הנחוצים ליצירת בטא-קרופן, וכי הביטוי של שני גנים נוספים הנחוצים אף הם ליצירת בטא-קרופן מושתק. החוקרים סימנו להם כמטרה לחדש את הייצור של הבטא-קרופן באנדוספרם באמצעות שני הגנים האמורים. אך כדי ששני הגנים יהיו פעילים באנדוספרם, יש צורך למקם אותם בסמיכות לאזור בקרה מתאים. הגנים מוקמו בסמוך לאזור בקרה שיש לו פעילות סלקטיבית מוכחת באנדוספרם.

□ מכיוון שלייצור בטא-קרופן נחוצים גנים רבים, וכל אחד לבדו נחוץ אבל לא מספיק, נהוג לומר כי תכונת הצמח לייצור בטא-קרופן היא תכונה רב-גנית.

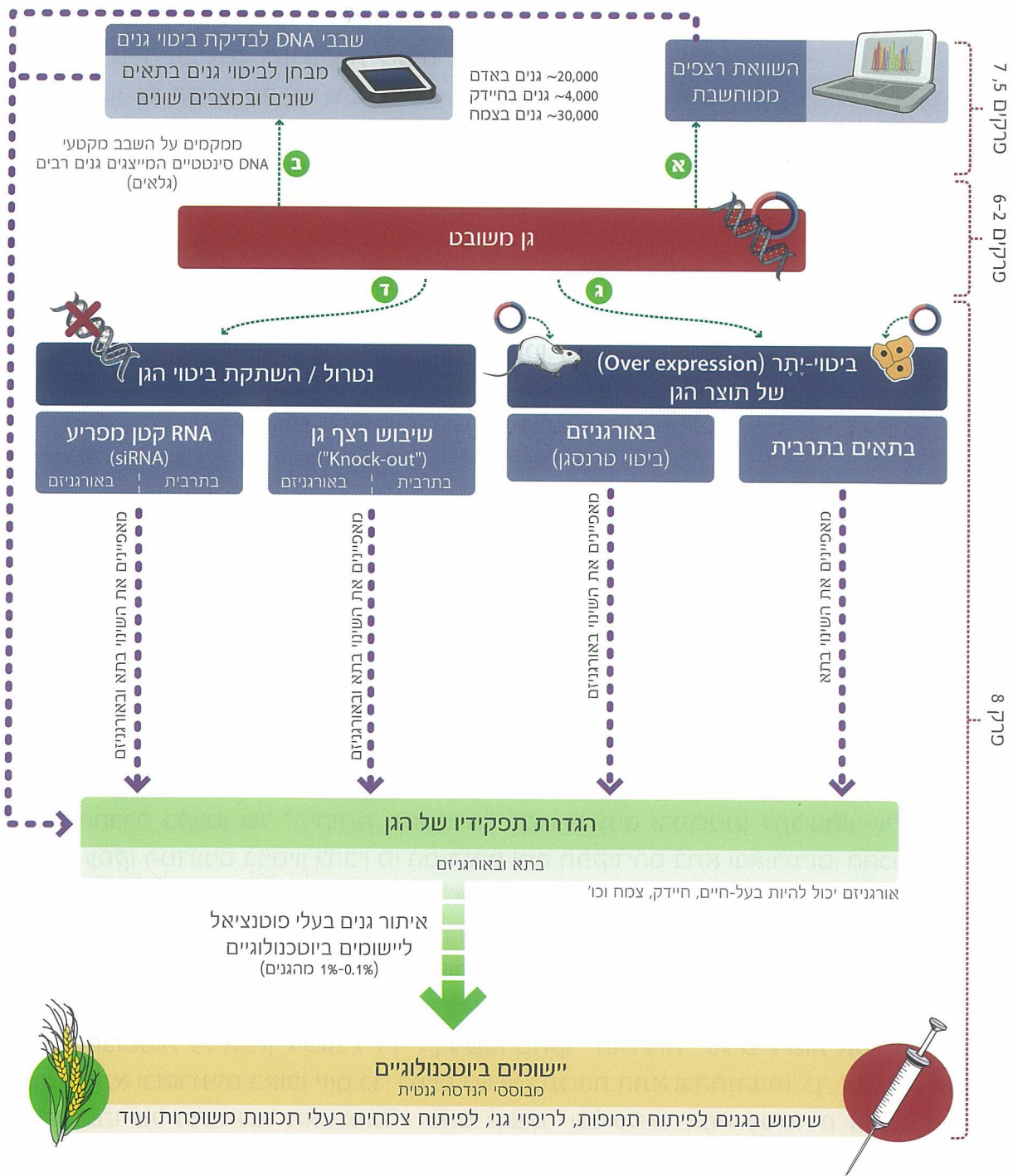
□ איזור בקרה שיש לו פעילות סלקטיבית מוכחת באנדוספרם, הוא אזור בקרה היכול לקשור גורמי תעתוק שנמצאים רק באנדוספרם ולא בתאי צמח של איברים אחרים.

לאחר ששני הגנים המשתתפים בייצור הבטא-קרופן, ובכלל זה אזור הבקרה הייחודי שנקשר לכל אחד מהם, הועברו לתא צמחי בתרבית, התקבלו צמחים טרנסגניים שבכל תא מתאיהם היו שני הגנים הרקומביננטיים. אולם בשל אזורי הבקרה המיוחדים שצומדו לגנים הרקומביננטיים, התבטאו הגנים הרקומביננטיים רק באנדוספרם. לכן הכיל האנדוספרם של גרגר האורז את כל האנזימים שהיו נחוצים ליצירת בטא-קרופן. בפעם הראשונה בהיסטוריה התקבל צמח אורז שגרגריו כתומים ושנקרא בשם החיבה "אורז הזהב". בעקבות הצלחה זו צפו כי יגברו ניסיונות הפיתוח של צמחים טרנסגניים בעלי ערכים תזונתיים ייחודיים לצורכי אוכלוסיות שסל המזון שלהן דל.

## מ-DNA לגן ומגן לתפקידיו וליישומים ביוטכנולוגיים

מאז ההכרה בקיומן של "היחידות המוגדרות" הקרויות גנים ובתרומתן לתכונותיו של האורגניזם והפרט, עסקו המדענים בניסיון להבין מי הם הגנים ומה תפקידיהם בתא ובאורגניזם. ההכרה כי הגנים הם מקטעי DNA בעלי רצף ייחודי שמהם נוצר mRNA, גרמה לצורך לבדוד ולהרבות מקטעי DNA, ובכלל זה גנים, למטרות מחקר. לשון אחרת, אנחנו מדברים על שיבוט DNA רצוי. כמתואר באיור 8.1 ובאיור 8.18, רק בעזרת גן משובט אפשר לנהל מחקר יסודי שנועד למצוא את תפקידיו. לצורך כך מתקדמים ב-3 מסלולים (איור 8.1) ומקיימים 4 גישות מחקר (א'-ד' באיור 8.18). בעוד שהגישות א' ו-ב' שבאיור 8.18 הן גישות המבוססות על אפיון, גישות ג' ו-ד' הן גישות מחקר "חודרניות". על פי גישות אלה יש להתערב בנעשה בתא ובאורגניזם באופן יזום כדי לגרום לשינוי בתכונות התא ובהתנהגותו. כך, שינויים בתכונותיו ובהתנהגותו של התא ושל האורגניזם - שהם תוצאה של עלייה יזומה בביטוי גן או של השתקת ביטוי - מלמדים על תפקידיו של הגן (כמוסבר בפתיח של פרק 4 וכמומחש בפרק זה לגבי הגן p53).

במסגרת פרויקטי הגנום השונים נהוג כיום לשבט את כל הגנים ללא קשר לזהותם ותפקידיהם. השיבוט נועד לאפשר לגלות גם את תפקידיהם של גנים "אלמוניים" יחסית וכל זאת בעזרת גישות המחקר שצוינו באיור 8.18. רק אפיון ומחקר מעמיקים של גנים נבחרים יכולים לסייע בניצול המידע אודות הגן ותפקידיו לצורך פיתוח יישומים ביוטכנולוגיים מבוססי הנדסה גנטית, ובכלל זה ייצור תרופות והשבחת אורגניזמים.



**איור 8.18: מהלכים עקרוניים מקובלים למציאת תפקידיו של גן בתא ובאורגניזם.**

גן משובט הוא מרכיב הכרחי לביצוע מהלכים למציאת תפקידיו של הגן (התחילו בתיבה האדומה). גן משובט הכרחי גם לקיום ביוטכנולוגיה מבוססת הנדסה גנטית. לכן מטרתם של המהלכים העקרוניים למציאת תפקידיו של גן (א'-ד') היא לבחון בין השאר אם ניתן לנצל את הגן ליישומים ביוטכנולוגיים. מהלכים אלה מתבססים על מספר מצומצם של עקרונות ושיטות מולקולריות מקובלות בשימוש כמפורט בתיבות השונות.

## שאלה 8.8

- צינו אילו מבין המשפטים הבאים נכונים. תקנו את המשפטים שאינם נכונים.
- ניתן להשתמש ב-RNA קטן מפריע כדי להשתיק ביטוי גן צמחי לצורך הגדרת תפקידיו.
  - צמח טרנסגני המבטא ביטוי-יתר של חלבון מסוים מייצרים רק למטרות שיפור תכונותיו של הצמח.
  - T-DNA הוא שמו של מקטע ה-DNA שבפלסמיד האגרובקטריום המסייע בהעברת אזור ה-VIR המצוי אף הוא בפלסמיד האגרובקטריום אל תא הצמח.
  - צמחים טרנסגניים אפשר לייצר בעזרת תרביות רקמה, והשימוש באנטיביוטיקה מתאימה מאפשר להרוג את התאים שלתוכם הוחדר DNA.
  - פלסמיד האגרובקטריום שמשמש להחדרת DNA רצוי לתא צמח "עושה זאת" באמצעות החדרת שני מקטעי DNA נפרדים שבאחד מהם הגן שבביטויו מעוניינים ובשני גן לעמידות לאנטיביוטיקה.
  - כאשר משתמשים בתותח גנים כדי להחדיר DNA לתאי צמח, משתמשים בחלקיקים מצופים בחיידקי אגרובקטריום.
  - אם נמצא כי גן מסוים מקנה עמידות ליובש בצמח התירס, ניתן להחדירו לצמח עגבנייה לקבלת צמח טרנסגני שעשוי להיות בשל כך צמח בעל עמידות יחסית ליובש.

## שאלה 8.9

אתם חוקרים את הווירוס V33 שגורם למחלה בצמחים. הווירוס מסית תאי צמח בתרבית. מצאתם כי חלבון p33 שמקורו בווירוס V33, נקשר לחלבון p11 המצוי בתאים של צמח הטבק. אתם מעלים השערה כי בעקבות הקישור p33 מנטרל את פעילותו של p11 המצוי בצמח הטבק. בנוסף, אתם מניחים כי ללא p11 חופשי תאי הצמח ימותו. אתם משערים שהחלבון p33 עלול לקשור גם את החלבון p11 של צמח העגבנייה ובשל כך לגרום לנזק חקלאי נוסף.

א. כיצד תוכיחו את השערתכם כי החלבון p33 נקשר גם בתאי צמח העגבנייה לחלבון p11 של העגבנייה? תארו ברמה העקרונית את המערך הניסיוני שאתם מציעים תוך כדי בחירתם של הכלים הרלוונטיים להצעתכם מבין הכלים הייחודיים המפורטים כאן. הניחו כי לרשותכם כל החומרים והמכשירים הנדרשים כדי לממש את השיטות השונות בהנדסה גנטית של צמחים.

## כלים ניסיוניים ייחודיים

- תאי צמח הטבק בתרבית, תאי צמח העגבנייה בתרבית, נוגדן כנגד p33, נוגדן כנגד p11, DNA משלים המקודד ל-p33, DNA משלים המקודד ל-p11, אזור הבקרה של p33, אזור בקרה המאפשר ביטוי של DNA בתאי צמח העגבנייה בתרבית, נשא פלסמידי צמחי.
- כיצד תתמכו בהשערתכם כי חלבון p11 חופשי נחוץ לקיום תאים שבתרבית? לרשותכם מלבד הכלים הניסיוניים אשר ב-א' גם RNA קטן מפריע שנועד להשתיק את ביטוי p11. הציעו גישה ניסיונית מתאימה ותארו את התוצאות הצפויות.
- הציעו דרך ל"ריפוי גני" (ריפוי באמצעות גנים) בצמחים שנועדה למנוע את המחלה הנגרמת על ידי הווירוס V33.



## גישות מחקר ועקרונות

- הגדרת תפקידי הגן בתא ובאורגניזם באמצעות אפיון רצף הגן, אפיון הביטוי שלו והשליטה היזומה בביטוי שלו
- ביטוי-יתר של גן (ותוצריו)
- השתקת ביטוי של גן (ותוצריו)
- קשר סיבתי בין שני אירועים מולקולריים בתא
- ביטוי חלבון של אורגניזם מסוים באורגניזם אחר בעזרת ההנדסה הגנטית

## גנים

- אינסולין, הורמון הגדילה והגנים שלהם
- הגן p53 והחלבון p53
- הגנים Ras-1 Myc
- הגן GP, הגן Cry

## יישומים

- יישומים ביוטכנולוגיים עקרוניים מייצגים: ייצור חלבון-תרופה בתרביות תאים, השבחת אורגניזמים, השתקת ביטוי גן שתוצרו גורם למחלה
- ייצור חלבון-תרופה בחלב של בעל-חיים טרנסגני
- RNA קטן מפריע ללוחמה בוורוסים ובמחוללי מחלה אחרים
- צמחים טרנסגניים שעברו השבחה

## כלים ב"ארגז הכלים"

- תאים ותאים מהונדסים בתרבית
- נשא ביטוי (Expression vector)
- RNA קטן מפריע
- חייית "Knock-out"
- אורגניזם טרנסגני
- אזור בקרה המתפקד בביטוי גן רק בסוגי תאים מסוימים
- אגרובקטריום מהונדס שבו "פלסמיד מעביר" ו"פלסמיד עוזר"
- "תותח גנים" לירי חלקיקים מצופים ב-DNA לעבר תאי צמח

## מושגים ומונחים

- חלבון רקומביננטי
- ביטוי זמני, ביטוי קבוע
- גן מדכא סרטן
- מוות מבוקר של תא (Apoptosis)
- Anti-sense RNA, Sense RNA
- טרנסגן, בעל-חיים טרנסגני
- VIR, T-DNA

## שיטות

- RT-PCR
- PCR מוסיף אתרי הגבלה
- טרנספקציה לתאים של בעל-חיים
- העברת DNA לתאי צמח במגוון שיטות
- מבחן להופעת צברי תאים סרטניים בתרבית
- שיבוש רצף הגן כדי להשתיק את ביטוי
- העברת RNA קטן מפריע לתאים לצורך השתקת ביטוי ברמת ה-RNA

## הפניות

## פרק 1

## עמוד 2

Henig, R. M. (2000) *The monk in the garden: the Lost and Found Genius of Gregor Mendel, the Father of Genetics*. A Mariner Book, New York.

Orel, V. (1984) *Mendel*. Oxford University Press, New York, pp. 19-23.

## עמוד 3

Cherfas, J. (1982) *Man Made Life*, Basil Blackwell, Oxford.

Avery, O. T., MacLeod, C. M. and McCarthy, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of *Pneumococcal* types. *Journal of Experimental Medicine* 79, 137-158.

Watson, J. and Crick, F. (1953) Molecular structure of nucleic acids: a structure for Deoxyribonucleic Acid. *Nature* 171, 737-738.

Watson, J. (1968) *The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of the Double Helix*. Atheneum, New York.

## עמוד 8

Korenberg, A. (1989) *For the Love of Enzymes: the Odyssey of a Biochemist*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

## עמוד 14

Brenner, S., Jacob, F. and Messelson, M. (1961) An unstable intermediary carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190, 576-581.

Brenner, S. (2001) *My Life in Science*. BioMed Central, London.

Crick, F. H. C. (1978) The genetic code: III, in: *Recombinant DNA*, ed. David Freifelder. W. H. Freeman, San Francisco, p.22.

## עמוד 31

sir Frederick Banting. The early story of Insulin.

[http://www.expasy.org/spotlight/back\\_issues/sptlt009.shtml](http://www.expasy.org/spotlight/back_issues/sptlt009.shtml)

## פרק 2

## עמוד 39

Luria, S. E. (1978) The recognition of DNA in bacteria. In: *Recombinant DNA*, ed. David Freifelder, W. H. Freeman, San Francisco.

## עמוד 41

Arber, W. (1979) Promotion and limitation of genetic exchange. *Science* 205, 361-365.

Smith, H. O. (1979) Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases. *Science* 205, 455-462.

Smith, H. O. and Wilcox, K. W. (1970) A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae* I- purification and general properties. *Journal of Molecular Biology* 51, 379-391.

**עמוד 46**

Danna, K. and Nathans, S. D. (1971) Specific cleavage of Simian Virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 68, 2913-2917.

**פרק 3****עמוד 57**

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W. and Helling, R. B. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 70, 3240-3244.

**עמוד 58**

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 69, 2110-2114.

Cohen, S. N. (1978) The manipulation of a gene, in: *Recombinant DNA*, ed. David Freifelder. W. H. Freeman, San Francisco.

**עמוד 69**

Thomas, M., Cameron, J. R. And Davis, R. W. (1974) Viable molecular hybrids of bacteriophage lambda and eukaryotic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 71, 4579-4583.

**פרק 4****עמוד 75**

Martial, J. A., Hallewell, R. A., Baxter, J. D. and Goodman H. M. (1979) Human Growth Hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science* 205, 602-607.

**עמודים 77 ו-80**

Weinberg, R. A. (1983) A molecular basis of cancer. *Scientific American* 294(5), 102-126.

**עמוד 83**

Weinberg, R. A. (1996) How cancer arises. *Scientific American* 275 (3) 62-70.

**עמוד 84**

Temin, H. M. (1978) RNA-directed DNA synthesis, in *Recombinant DNA*, ed. David Freifelder. W. H. Freeman, San Francisco.

**עמוד 92**

Martial, J. A., Hallewell, R. A., Baxter, J. D. and Goodman H. M. (1979) Human Growth Hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science* 205, 602-607.



## פרק 5

## עמוד 98

Sanger, F. (1959) Chemistry of Insulin. *Science* 129, 1340-1344.

Sanger, F., Nicklens, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74, 5463-5467.

## עמוד 108

Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M. (1992) *Recombinant DNA* (second edition) Scientific American Books, W. H. Freeman and Company, New York, pp. 120-121.

## עמוד 110

Doolittle, R. F., Hunkapillar, M. W., Hood, L. E., Devare, S. G., Robbins, K. C., Aaronson, S. A. and Antoniades, H. N. (1983) Simian sarcoma virus *onc*, gene, *v-sis*, is derived from the gene (or genes) encoding platelet-derived growth factor. *Science* 221, 275-276.

## פרק 6

## עמוד 112

Mullis, K. B. (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262(4), 56-65.

Mullis, K. (1998) *Dancing Naked in the Mind Field*. Vintage Books, A division of Random House, Inc., New York.

## עמוד 128

Iweala, O. I. (2004) HIV diagnostic tests: an overview. *Contraception* 70, 141-147.

## עמוד 129

Strachan, T. and Read, A. P. (2004). *Human Molecular Genetics* 3<sup>rd</sup> edition. Garland Science, London and New York, pp. 519-523.

## פרק 7

## עמוד 136

Strachan, T. and Read, A. P. (2004) *Human Molecular Genetics* 3<sup>rd</sup> edition. Garland Science, London and New York, pp. 13-19, pp. 594-595.

## עמוד 140

Strachan, T. and Read, A. P. (2004) *Human Molecular Genetics* 3<sup>rd</sup> edition. Garland Science, London and New York, pp. 66-70, 287-288.

## עמוד 143

Coats, S. R., Olson, J. E. and Pledger, W. J. (1992) Rapid induction of competence formation is PDGF-isoform specific. *Journal of Cellular Biochemistry* 48, 242-247.

**146 עמוד**

Strachan, T. and Read, A. P. (2004) *Human Molecular Genetics* 3<sup>rd</sup> edition. Garland Science, London and New York, pp. 175-178.

**148 עמוד**

Webb, G. C., Akbar, M. S., Zhao, C. and Steiner, D. F. (2000) Expression profiling of pancreatic  $\beta$  cells: glucose regulation of secretory and metabolic pathway genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, 5773-5778.

**149 עמוד**

van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R. and Friend, S. H. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536.

**152 עמוד**

Linzer, D. I., and Levine A. J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.

Lane, D. P. and Crawford, L. V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.

**154 עמוד**

Linzer, D. I., and Levine A. J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.

**פרק 8****167 עמוד**

Bodmer, W. and McKie, R. (1994) *The Book of Man*. Scribner, New York, pp. 56-64.

**174 עמוד**

Levine, A. J., Hu, W. and Feng, Z. (2006) The p53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death and Differentiation* 13, 1027-1036.

**176 עמוד**

Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Butel, J. S. et al. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 356, 215-221.

**177 עמוד**

Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

**180 עמוד**

Gottlieb, T. M. and Oren, M. (1998) p53 and apoptosis. *Seminars in Cancer Biology* 8, 359-368.

Kim, D. H. and Rossi, J. J. (2007) Strategies for silencing human disease using RNA interference.

Nature Reviews Genetics 8, 173-184.

**182 עמוד**

Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G., Brinberg, N. C. and Evans, R. M. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. Nature 300, 611-615.

**186 עמוד**

Schmidt, C. (2006) Belated approval of first recombinant protein from animal. Nature Biotechnology 24, 877.

**191 עמוד**

Watson, J. D. (2004) *DNA: the Secret of Life*. Alfred Knopf, New York.

Lurquin, P. F. (2001) *The Green Phoenix: A History of Genetically Modified Plants*. Columbia University Press, New York. pp. 56-85.

**194 עמוד**

Lurquin, P. F. (2001) *The Green Phoenix: A History of Genetically Modified Plants*. Columbia University Press, New York. pp. 56-85.

**199 עמוד**

Duke, S. O. (2005) Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction. Pest Managing Science 61, 211-218.

**201 עמוד**

Romeis, J., Meissle, M. and Bigler, F. (2006) Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. Nature Biotechnology 24, 63-71.

**202 עמוד**

Valliyodan, B. and Nguyen, H. T. (2006) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. Current Opinion in Plant Biology 9, 189-195.

Al-Babili, S. and Beyer, P. (2005) Golden Rice-five years on the road- five years to go? Trends in Plant Science 10, 565-573.

**203 עמוד**

Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., Potrykus, I. (2000) Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. Science 287, 303-305.



## ב

- ביואינפורמטיקה 104
- ביוטכנולוגיה **204-199, 168-165, 34-30**
- ביטוי RNA 149-140, ראו גם ביטוי-יתר
- ביטוי גנים **135, 22**, 140
- ביטוי זמוני 175-173
- ביטוי חלבונים 168-166, 155-150
- ביטוי-יתר (של גן, חלבון) בתא 76, 168-167, 175-169, 204
- ביטוי-יתר (של גן, חלבון) בבעלי-חיים 186-182
- ביטוי קבוע 175-173
- בסיסים חנקניים 5-4
- בעל-חיים טרנסגני 186-182
- בקטריופאג' **42-39**, 72-69
- בקרת ביטוי גנים 29-23
- בררה (סלקציה) 1, **62-61**, 65-64, 198-196

## ג

- גדיל DNA 9-7
- גדיל DNA משלים 7
- גדיל תבנית 98, 113-112
- גואנין **4-5**, 99-98
- גורם תעתוק **26-24**, 138-136, 169, 171, 181-180
- ג'ל אגרוז 49-47, **51-50**, 143-140, 145
- ג'ל אקרילאמיד 101-100, 155-152
- גלאי 82-80, 93-88, 142-141, 144, 148-146, 150
- גלובין - ראו המוגלובין
- גן** 2, **19-18**, 21, 22, 75, 182, 204
- הגן המקודד ל-RNA ריבוזומלי 13
- הגן המקודד ל-RNA מעביר 13
- הגן המקודד ל-ADF-1 161
- הגן המקודד ל-CFTR 129, 150
- הגן המקודד ל-PDGF 110-108, 145-143
- הגן המקודד ל-SDF-1 161
- הגן המקודד ל-p53 155-153, 176-173, 181-180
- הגן המקודד ל-Ras 83-82, 175-174

## א

- אבחון מחלות - ראו מחלות גנטיות
- אבחון גורמי מחלה (באמצעות PCR) 128
- אגרובקטריום 197-191
- אדנין **5-4**, 99-98
- אוליגו-נוקלאוטיד **9-8**, 92, 115-111, 139-138
- אונקוגן 83, 110-108
- אורגניזם 30**
- אורגניזם טרנסגני **33**, 184-182, 185-184,
- ראו גם: הנדסה גנטית בצמחים
- "אורז הזהב" 203-202
- אותות מולקולריים בתא - ראו הולכת אותות
- אזור הבקרה (של גן) **26-24**, 138-136, 186-182
- איידס 85-84, 97, 128, 180
- אימונופכרסיפיטציה 154-152
- אימונוותרפיה פסיבית 156
- אינטרון (אינטרונים) 24, 27-26
- אינסולין 12, 32-30, 146, 148, 167-165
- אלל **2**, 8, **20-19**, **125**, 126-129
- אלקטרופורזה בג'ל אגרוז **47**, 49-48, **51-50**, 142-141, 145
- אלקטרופורזה בג'ל אקרילאמיד 101-100, 155-152
- אנזימי הגבלה **43-41**, 39
- אנטי קודון 17-16
- אנטיגן-151
- אנטיבייטיקה 58-57, 62-60
- אנמיה חרמשית 20-18
- אפופטוזיס 181-180
- אפיון ביטוי ראו ביטוי
- אקסון (אקסונים) 24, 27-26
- אתידיום ברומיד 51-50
- אתר הגבלה **43-41**
- אתר הקישור (של גורם תעתוק) **25-24**, 138-136

- ה**
- הגבלה ושינוי (תוספה) 42-41
- הגברה (שכפול חוזר ונשנה של DNA) 119-115
- הגברה מותנית מוטציות 131-129
- הדגמה המרכזית 17-16
- הולכת אותות בתא 202, 148, 143, 140-135
- הורשה - ראו תורשה
- הזרקה לביצית מופרית 185-182
- היברידיזציה 90-89, **91**, 142-141, 144, 148-146
- היסטון (חלבון מסוים) 21-20
- היצמדות תחלים 99, פרק 6
- המולובין 12, **18**
- הנדסה גנטית (אזכורים ישירים בלבד) **30**, 34-32, **58**, 85, 136, 165-168, 190, 194
- הנדסה גנטית בצמחים 203-190
- הפרדת גדילים - ראו דנטורציה
- הקוד הגנטי 10, **14**, החלק הפנימי של הכריכה האחורית
- השוואת רצפים 110-108
- השקעה באמצעות נוגדן 154-152
- השתקת ביטוי גן 204, 181-176
- התמרה סרטנית (טרנספורמציה) 176-173, 81-78
- ו**
- וירוס - ראו בקטריופאג', ראו רטרו-וירוס
- וירוס ה-SV40 155-152
- ז**
- זוגות בסיסים (ב-DNA) 7
- זיהוי גנטי 127-124
- זיהוי פלילי 127-124
- ח**
- חומצות אמינו 12-10
- חומצות גרעין 3
- חיידק **39-42**, 57-56, 167-166
- חיידק ה-Bt 201, 199
- הגן המקודד ל-Tn 156
- הגן המקודד ל-GFP 137-136
- הגן המקודד ל-Fos 145-143
- הגן המקודד ל-Myc 175-174, 145-143
- הגן המקודד לאינסולין 146, 142-141, 75
- הגן המקודד לאנטיגן T 174, 155-152
- הגן המקודד לאלבומין 142
- הגן המקודד לאנזים המפרק Glyphosate 199
- הגן המקודד לאנטי-תרומבין 186-184
- הגן המקודד לאריתרופויטין 168-167
- הגן המקודד לגלובין 12, 19, 142-141
- הגן המקודד להורמון הגדילה 75, **92**, 165, 167, 184-182
- הגן המקודד להיסטון 21-20
- הגנים המקודדים לנוגדן 151, 140
- הגן המקודד לסומטוסטטין 167
- הגן החיידקי המקודד לרעלן Cry 201-199
- הגן האחראי להתמיינות לתאי שריר 135
- גנים המקנים עמידות למחלות 184
- גנים האחראיים לקיפול והפרשה של אינסולין 149-148
- גנים המקנים לצמח עמידות ליובש 201, 76-75
- גנים המקודדים לאנזימים המעורבים בסנינתזת  $\beta$ -carotene 202
- גן מדווח 139-136
- גן מדכא סרטן 181-180, 176-174
- גנוטיפ 3
- גנום 203, 82, 80, 70, 29, 22-20
- גרסת הגן ראו אלל
- גרעין התא 3, 17, 22-21
- ד**
- דאוקסי-ריבוז 5-4
- דג טרנסגני 184
- דומיננטי (אלל) 2
- דנטורציה של DNA (הפרדת גדילים) 118-116, 99

כ

נוגדן 155-152, 151-150, 140, 93-92  
 נוגדורפוסיה 156  
 נוקלאוזום 21  
 נוקלאוט -יב (DNA) 116-112, 106-105, 101-100, 6, 4  
 נוקלאוט -יב (RNA) 13  
 "נוקלאוט דימס"מים" 102-100  
 נטרול ביטוגן 176  
 נשא 72-69, 62-58, 56  
 נשא ביטו' 175-169

ס

סוכרת 31  
 סינתזת DNA 8, 99-98, 118-116  
 סומצות (של DNA) 102-100, 98  
 סיסטיק פיבס'ס 129  
 סלפול (DNA) 9-8  
 סלקצ'הצורה  
 ספר (של DNA) 93-92, 90-88, 80, 72  
 ספר גנחמ'ת 93-92, 88, 82-80, 76  
 ספר יית DNA של ים 93-92, 88-86  
 סרטן 156, 155-153, 149, 110-108, 83-82, 80-77, 75  
 181-180, 176-174, 169, 123-122, 119, 112, 78, 76, 20, 19-18

ע

טרעסגנ'ת 185-184  
 עכבר "Knock out" 179, 176  
 עכערנסגנ'ת 204, 184-182  
 עפץ - 197-191  
 עקה (stress) 136-135

פ

פול ימורפיזם (DNA) 124  
 פול ימראז (DNA) 8, 13, 86, 116-112, 99-98  
 פול ימראז (RNA) 26, 24, 22, 10  
 פוספאטאז בס'ס: (A P) 62  
 פיחק RNA 179-177, 29-28

(מיקרע DNA) 49-46, 43-42

חיתוק 45, 43  
 מיתורג 45, 43  
 חלבון 29-28, 12-10, 3  
 חלבוקומב 'ננט' 165  
 "חלבון" 'שימ" 29-28  
 טרנסגן 203-194, 191-190, 186-182, 33  
 טרנספורמצ'ה 166, 65, 58, 3  
 טרנספקצ'ה 181-179, 177, 175-173, 171

י

"צור'תשלבון ראו ביטו'יתר"  
 "שומים ביטכנולוג'סראו ביטכנולוגיה"

כ

כיוניות - DNA 7  
 כרומוזום 125, 21-20

ל

לבלב, תא' 149-148, 31  
 ליגאז (DNA) 59-58

מ

מוטצמוטק'ס 131-129, 113-112, 83-82, 20  
 מוטצקוהדת'ת 113-112, 83-82, 20  
 מהשאכפול 60, 56  
 מוקדבק(הבקטר 'ופאג') 81-80, 72-70  
 מחבר 139-138  
 מחדר 62-60, 56  
 מחלות (מטבחוק) 150, 131-128  
 מסגרת (קפתימחה סגורה) 106-105  
 מסלולולכתאותות האלכתאותות בתא  
 מפתבלה 49-47, 46  
 מקודד (DNA) 106-105, 75, 18  
 מת'לאנתז מסו'ים) 41  
 מתעתקמהופך 148, 143, 87-84

- רצפים קצרים נשנים ועוקבים (STR) 127-124
- רצף משלים (ב-DNA) 7
- רצף נוקלאוטידים 204, 108, 106-104, 98-97
- רקומביננטי (DNA) **30**, 33-32, **58**, 72-69, 168-165, 197-196, 175-173
- ש**
- שבב DNA 204, 150-145, 91
- שחבור **27-26**, 29
- שחבור חלופי **27-29**
- שיבוט (מקטע DNA) **55**, 66-58, 72-69, 82, 84, 88-86, 93-92, 111, 115-114, 119, 122, 171
- שיבוט גן **76-75**, 204, 83-80
- שייר סוכרי (ב-DNA) 6-4
- שכפול DNA **8**, 17, 119-115
- ת**
- תא 3, 17
- תא סרטני 78-77
- תגובת השרשרת של הפולימראז כרק 6, 183-182, 185
- תהליכי שינוי (במהלך ביטוי גנים) 29-28, 24-23
- תופעת ההגבלה 39
- תורשה **1**, 2, 182
- "תותח גנים" 198, 196
- תחל (תחלים) **8**, **85**, **99-98**, 115-111, 119-116, 130, 172-170
- תימין 5-4, 99-98
- תכונות תא, אורגניזם 1, 10
- תספיג 142-141, 90-89
- תספיג דרומי 140
- תספיג מערבי 155-154
- תספיג צפוני **140**, 144-141
- תעתוק **10**, 14-13, 17, 19, **26-22**, 29, 181-180, 171
- תפקידי גן 22-21, 34, **76**, 110-108, 136-135, 149-148, 151-150, 166-165, 168, 176, 181-179, 182, 204-203
- תרגום 13, **17-16**, 19, 29
- פירוק חלבונים 154, 29-28
- פלינדרום 44
- פלסמיד 57-56
- "פלסמיד מעביר" 197-196
- "פלסמיד עוזר" 197-196
- פלסמיד רקומביננטי **58**, **61-60**, 138-137, 167-166, 197-196
- פנוטיפ 3
- פרוטאום 29
- פרויקט גנום 203, 94, 22
- צ**
- ציטוזין **5-4**, 99-98
- ציטופלסמה 3, 10, 14, 17-16, 26
- ציסטיק פיברוזיס - ראו הגן המקודד ל-CFTR
- צמחים טרנסגניים - ראו הנדסה גנטית בצמחים
- ק**
- קבוצת זרחה 5-4
- קוד גנטי - ראו הקוד הגנטי
- קודון 14, 106-105, הצד הפנימי של הכריכה האחורית
- קודון סיום 14, 106-105, הצד הפנימי של הכריכה האחורית
- קצוות דביקים או חלקים 45
- קרצינוגן 75, 79-78
- קשירה (של מקטעי DNA) **30**, 33-32, 59-58, 63, 65
- קשר מימן (בחומצות גרעין) **7**, 9, 65
- קשר סיבתי 180
- קשר פוספודיאסטרי (ב-DNA וב-RNA) **7-6**, 8, 10
- קשר פפטידי 17-16, 11-10
- ר**
- רטרו-וירוס **84**, **85**, 110-108
- ריבזום 17-16
- ריפוי גני 204, 180
- רצפיבי **2**, 129
- רצף חומצות אמינו 108, 106-104, 98-97



## A

AIDS 84-85, 97, 128, 180  
 Alkaline Phosphatase 62  
 Anti-sense RNA 178-177  
 AZT 97, 102

## C

cDNA - ראו DNA מושלים

## D

DNA (כחומר תורשתי) 3-9, 21  
 DNA ליגאז 58-59  
 DNA מושלים 85-88, 92-93, 147-148, 169-171  
 DNA פולימראז **8**, 13, **86**, 98-99, 112-116  
 DNA רקומביננטי 30, 32-33, **58**, 69-72, 165-168, 173-175, 196-197  
 dNTP **4**, 86

## H

HIV 84-85, 97, 128, 180

## K

"Knock out" - "Knock out" ראו עכברי

## M

mRNA - ראו RNA שליה  
 Multiplex PCR 130

## P

PCR - 6 סרק, 141, 182-183, 185, RT-PCR ראו גם  
 Poly A 86-87, 104

## R

Reverse Transcriptase (RT) 84-87,  
 ראו גם כותעתק במהופך  
 RNA 3, 10, 13

RNA מעביר 13, 16-17  
 RNA ספריע 176-178  
 RNA פולימראז 10, 22, 24, 26  
 RNA קטן ספריע 177, 178-181, 204  
 RNA ריבוזומלי (rRNA) 13  
 RNA שליה 14, 16-17  
 RT-PCR 122-123, 143, 145, 168-171

## S

Sense RNA 177-178  
 siRNA - ראו RNA קטן ספריע  
 SNP 124  
 STR 124-127

## T

T-DNA - ראו אגרובקטריום  
 tRNA - ראו RNA מעביר

## V

VIR - ראו אגרובקטריום



# ועכשיו תורכם...

האתר המלווה את הספר: <http://stwww.weizmann.ac.il/g-bio/geneengine/home.html>

## הקוד הגנטי

בסיס שני

		U	C	A	G	
בסיס ראשון	U	UUU } Phenylalanine (F) UUC } UUA } Leucine (L) UUG }	UCU } UCC } Serine (S) UCA } UCG }	UAU } Tyrosine (Y) UAC } UAA } * (Stop) UAG }	UGU } Cysteine (C) UGC } UGA } * (Stop) UGG } Tryptophan (W)	U C A G
	C	CUU } Leucine (L) CUC } CUA } CUG }	CCU } CCC } Proline (P) CCA } CCG }	CAU } Histidine (H) CAC } CAA } Glutamine (Q) CAG }	CGU } CGC } Arginine (R) CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } Isoleucine (I) AUC } AUA } AUG } Methionine (M)	ACU } ACC } Threonine (T) ACA } ACG }	AAU } Asparagine (N) AAC } AAA } Lysine (K) AAG }	AGU } Serine (S) AGC } AGA } Arginine (R) AGG }	U C A G
	G	GUU } Valine (V) GUC } GUA } GUG }	GCU } GCC } Alanine (A) GCA } GCG }	GAU } Aspartic acid (D) GAC } GAA } Glutamic acid (E) GAG }	GGU } GGC } Glycine (G) GGA } GGG }	U C A G

סימון בן שלוש אותיות לחומצות אמינו: ...Phe, Leu  
סימון בן אות אחת לחומצות אמינו: ...F, L  
קודון סיום תרגום: \* (Stop)

קודון הוא שלשת בסיסים ב-RNA שליה המגדירה קוד לחומצה אמינית או אות לסיום תרגום.  
בקוד הגנטי 64 קודונים ו-61 מהם מקודדים לחומצות אמינו. לדוגמה, הקודון ACU מקודד לחומצה האמינית שסימונה Thr.

ATC קטן מפריע RNA AGTCGATCGATCGATCGTATATGCTAGCACGCTAGCTGACG שיבוט CTGACTCGA  
AGCCTGATCGTACGCTGAC ריפוי גני GCTGTATAGCTAGCTGATCGTACGCTACGCTCAGTCCGCTAG  
TCGCTTAGCTAGCCTGATGACGATCGATTGCGAGTCTATTGCTACT ספריות DNA GTAGCTACGTCAG  
TCGT מגן לחלבון CGTTAGCTGACTGCTAGCTGACGCTGATTGACGATCGATCGATCGATCGTATA  
AGCACGTAGCTGACGCTGACTCGATTGCTAGCC חקר תפקידי גן TGATCGTACGCTGACGCTGTATAG  
GATCGTAC PCR GCTACGCTCAGTCCGTAGCTCAGTCGCTTAGCTAGCCTGATGACGATCGATTG  
CTATTGCTACTGTAGCTACGTCAGTCGATCGTACGTTAGCTGACTGCTAGCTGACGCTGATTGACGA  
CGATCGATCGATCGTATATGCTAGCACGTAG DNA רקומביננטי CTGACGCTGACTCGATTGCTAGCCT  
TACGCTGACGCTGTATAGCTAGCTGATCGTACGCTACGCTCAGTCCGTAGCTCAGTCGCTTAGCTAG  
TGACGATCGATTGCGAGTCTATTGCTACTGTAGCTACGTCAGTCGATCGTACGTTAGCTGACTGCTA  
CGCTGA זיהוי גנטי ופילי TTAGCGATCAGTCGATCGATCGATCGTATATGC פלסמידים TAGCACGTA  
ACGCTGACTCGATTGCTAGCCTGATCGTACGCTGACGCTGTATAGCTAGCTGATCGTACGCTACGCT  
CGTAGCTCAGTCGCTTAGCTAGCCTGATGACGATCGATTGCGAGTCTATTGCTACTGTAGCTACGTC  
AT אורגניזם טרנסגני CGTACGTTAGCTGACTGCTAGCTGACGCTGATTGACGATCAGTCGATCGATCGA  
ATATGCTAGCACGTAGCTGACGCTGACTCGATTGCTAGCCTGATCGTA חקר הסרטן CGCTGACGCTC  
GCTAGCTGATCGTACGCTACGCTC DNA שבכי AGTCCGTAGCTCAGTCGCTTAGCTAGCCTGATGACG  
TTTCGAGTCTATTGCTACTGTAGCTACGTCAGTCGATCGTACGTTAGCTGACTGCTAGCTGACGCTG  
CGATCAGTCGATCGAT השבחת צמחים CGATCGTATATGCTAGCACGTAGCTGACGCTGACTCGATT  
CTGATCGTACGCTGACGCTGTATAGCTAGCTGATCGTACG השתקת ביטוי גן CTACGCTCAGTCCGTA