



# טיפים לליגציה של מקטעי DNA

## ■ בצעו אינאקטיבציה של הליגאז על ידי חום

חברת פרמנטס (Fermentas) ממליצה לבצע אינאקטיבציה על ידי חימום של תערובת הליגציה לפני הטרנספורמציה לתוך החיידקים (10 דקות ב-65°C או 5 דקות ב-70°C), וטוענת שהדבר משפר מאוד את יעילות הטרנספורמציה. אני מצטרף בהחלט להמלצה, אך זהירות (ראו הטיפ הבא).

## ■ השתמשו בפוליאתילן גליקול

פוליאתילן גליקול (PEG) שייך לקבוצת החומרים המכונים "מצופפים" (crowding agents). זהו חומר הידרופובי התופס את כל המרחב במבחנה, וכך מעלה את ריכוזם של מרכיבי ריאקציית הליגציה בפאזה המימית. במילים אחרות, PEG מצופף את מקטעי ה-DNA, הליגאז וה-ATP בנפח קטן מאוד, וכך מגדיל מאוד את יעילות הליגציה. לאמיתו של דבר, כל הקיטים לליגציה מהירה (Rapid ligation kits) מכילים PEG, וחברת פרמנטס אף מספקת ליגאז רגיל עם תמיסה של 50% PEG 4000 כדי לשפר ליגציה של קצוות קהים (blunt). בנוכחות ה-PEG, ליגאז DNA T4 יכול "לתפור" כמעט כל דבר - קצוות דביקים וקהים, אדפטורים ולינקרים, DNA ו-RNA - וכל זאת ב-5 דקות בלבד בטמפרטורת החדר. שני סיפורים מרתקים מדגימים את תרומת ה-PEG ליעילותו של ליגאז DNA. במשך 15 שנים סברו חוקרים שליגאז DNA מ-*E. coli*. אינו יכול לחבר קצוות קהים, עד שניסו לבצע את הליגציה בנוכחות PEG, ונוכחו שבתנאים אלה, הליגאז שמקורו ב-*E. coli* קושר קצוות קהים לא פחות טוב מליגאז שמקורו ב-T4. הסיפור האחר מפתיע: ידוע כי ליגאז DNA מ-T4 הוא רגיש מאוד לקטיונים  $Na^+$  ו- $K^+$  בריכוז של יותר מ-100 mM. התברר שבנוכחות PEG, הנתרן והאשלגן, במקום לדכא את הליגאז, משפרים את פעילותו פי כמה...

חרף יעילותו הגדולה של ה-PEG, הביאו בחשבון את המגבלות האלה:

- אין לעשות אינאקטיבציה לתערובת ליגציה המכילה PEG באמצעות חום, כדי לא לפגוע ביעילות הטרנספורמציה.
- אין להדגיר ליגציה בתמיסה המכילה PEG יותר משעה - כדי לא לפגוע ביעילות הטרנספורמציה.
- אין להשתמש בתערובות ליגציה המכילות PEG ישירות לאלקטרופורציה, כדי לא להרוג את חיידקי ה-*E. coli* לפני האלקטרופורציה יש לנקות את תערובת הליגציה בעזרת קיט לניקוי DNA או שיקוע באתנול.

## ■ בדקו בדיקה מהירה אם הליגאז "חי" או "מת"

אם לאחר כמה ניסיונות של ליגציה וטרנספורמציה עדיין לא מתקבלות

שיבוט מקטעי DNA הוא לעתים חוויה מתסכלת. כישלון בשיבוט נובע לרוב מבעיות הקשורות לריאקציית הליגציה, שבה האנזים ליגאז מחבר זו לזו מולקולות DNA שונות ויוצר שבט (קלון) רקומביננטי. אני מקווה שהטיפים לריאקציות ליגציה שלהלן ישפרו את שיעור ההצלחה של השיבוטים שלכם.

## ■ חלקו את בופר הליגאז למנות קטנות

ה-ATP הנמצא בבופר ליגאז הוא חיוני לפעילות האנזים, אך הקפאות והפשרות חוזרות גורמות לו להתפרק. כדי למנוע את פירוק ה-ATP, חלקו את בופר הליגאז למנות קטנות (aliquots) מיד עם הגעתו למעבדה. הכינו מנות קטנות מספיק כדי לזרוק אותן לאחר שימוש אחד. הקפידו לחלק את הבופר רק לאחר שהופשר לגמרי ועורבב היטב.

## ■ הוסיפו ATP

האנזים ליגאז, שאנו משתמשים בו באפליקציות שונות של ביולוגיה מולקולרית, מקורו בווירוס מסוים של חיידקים - בקטריופאג' T4 (ואכן, האנזים נקרא ליגאז DNA T4). בעוד שכמעט כל הליגאזות בטבע דורשים NAD לפעילותם, לליגאז T4 נחוץ ATP. אם בופר ליגאז נמצא במעבדתכם יותר משנה, הוסיפו לתוכו ATP טרי עד לריכוז סופי של 0.5 mM. הקפידו להשתמש ב-riboATP בלבד, שכן deoxyriboATP, המשמש לריאקציית PCR, פשוט לא יפעל.

נוסף על כך, וכדי לחסוך זמן, אין צורך לנקות את ה-DNA לאחר חיתוכו באנזימי רסטרקציה: אפשר להוסיף ATP ולבצע את הליגציה ישירות באותה המבחנה. אל תשכחו לבצע אינאקטיבציה של אנזימי הרסטרקציה, שאם לא כן, מה שהליגאז יחבר, אנזימי הרסטרקציה ישובו ויחתכו!

## ■ חממו את מקטעי ה-DNA לפני הליגציה

כדי לבצע ליגציה של מקטעי DNA עם קצוות דביקים, ערבבו תחילה את הווקטור (vector) והמחדר (insert) וחממו אותם ב-65°C למשך 3 דקות. שלב חימום זה פורם אינטראקציות "פנימיות" בין וקטור לווקטור ובין מחדר למחדר, המקטינות את שיעור הליגציה על ידי מניעת החיבור של מחדר לווקטור. טיפ זה הוא חשוב במיוחד בשיבוט של מקטעי DNA על ידי אנזים רסטרקציה אחד, או על ידי שני אנזימים שונים היוצרים קצוות דביקים המתחברים זה לזה, כמו בשיבוט על ידי *BglIII* ו-*BamHI*. בדוגמה כזו, מכיוון שה-DNA נשמר בקור, רוב ה-DNA הפלסמידי נסגר על עצמו, והמחדר יוצר מבנים "פולימריים" לינאריים. חימום קצר של DNA בעל קצוות המתחברים זה לזה יעלה את שיעור הליגציה פי שניים לפחות. אך אל תשכחו לקרר את תערובת מקטעי ה-DNA לפני הוספת הליגאז...

בעזרת קיט מסחרי לניקוי DNA. המלצתי היא להשתמש ב-DNA Clean and Concentrator Kit של חברת Zymo Research. קיט זה לא רק מנקה את ה-DNA, אלא גם מסייע לרכז אותו, בהיותו הקיט היחיד בעולם המאפשר לעשות אלוציה (elution) של ה-DNA ב-6  $\mu$ l בלבד של מים. הקיט הזה "הציל" לא מעט ליגציות שלי וחסך לנו הרבה זמן וכסף.

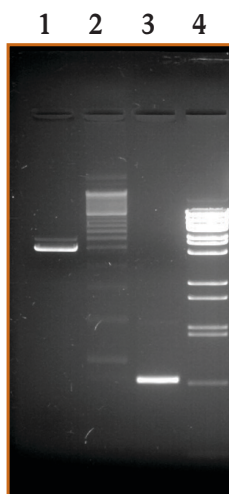
### ■ קנו ליגאז אחר...

בעצם, מהטיפ הזה הייתי צריך להתחיל, אך רציתי שתקראו גם טיפים אחרים. במבט ראשון, ההמלצה להשליך את הליגאז שלכם ולקנות אנזים חדש מחברה אחרת נראית משונה. אף על פי כן, זהו אחד הטיפים החשובים ביותר. מעטים מאיתנו טורחים לבדוק אם הליגאז מזוהם באנזימים אחרים, כגון אנדונוקלאז, אקסונוקלאז או פוספטאז. ואולם, זיהומים כאלה מתרחשים והם מזיקים ביותר; החמור שבהם הוא זיהום בפוספטאז. לפיכך אני ממליץ תמיד לקנות ליגאזות רק מן היצרנים הטובים ביותר בעולם, המפעילים בקרת איכות מצוינת. חברות אלה הן NEB, פרמנטס, טקרה (TaKaRa) ואחרות.

היבט חשוב נוסף הוא עמידותם השונה של ליגאזות שונים למיני לכלוך. תמיד כדאי לבקש מכמה ספקים דוגמיות של ליגאזות, ולבדוק איזה מהם פועל בצורה הטובה ביותר על ה-DNA שלנו.

כעת לא נותר לנו אלא להריץ את ריאקציית הליגציה בג'ל אגרוז (איור 2). כפי שניתן לראות בג'ל האגרוז, פסי הווקטור והמחדר נעלמו, והתחלפו בצורות בעלות משקל מולקולרי גבוה יותר (איור 2). הליגאז, אם כן, פועל היטב, קצות הווקטור והמחדר מתאימים זה לזה, ועל כך שעדיין אין מושבות של טרנספורמנטים - נשוחח בגיליון הבא. הפעם האנזים ליגאז לא אשם. ■

**ד"ר יבגני ברדיצ'בסקי** הוא מרצה בקורס "שיטות מחקר בסיסיות בביולוגיה מולקולרית" באוניברסיטת תל-אביב. אם תרצו לשאול שאלות או להציע טיפים טובים בתחום הביולוגיה המולקולרית, אנא כתבו כ: [yevgenybe@gmail.com](mailto:yevgenybe@gmail.com)



**איור 2.** הרצה של ריאקציית ליגציה בג'ל אגרוז  
 1. פלסמיד  
 2. ריאקציית ליגציה  
 3. מחדר  
 4. מרקר DNA  $\lambda$ BstEII

מושבות של טרנספורמנטים, יש לבדוק:

• האם החיידקים חיים או מתים? האם הם מספיק קומפטנטיים כדי לקבל פלסמיד אחרי ליגציה?

• האם פלטות גידול החיידקים הן טובות ומתאימות?

אם התשובה לשתי השאלות היא "כן" (הבדיקה פשוטה: בצעו טרנספורמציה ביקורת עם 0.1 ng של פלסמיד pUC19), בדקו אם הליגאז עצמו "חי" או "מת" (ראו למטה).

אם הליגאז חי ובריא: בדקו אם קצות מקטעי ה-DNA מתאימים (זה לא פשוט כלל). ואם התשובה היא כן:

• האם ה-DNA רעיל לחיידקים (במובן הביולוגי) או האם הוא מכיל "לכלוך" כימי כזה, ששום ליגאז שבעולם לא יחבר אותו לשום DNA אחר?

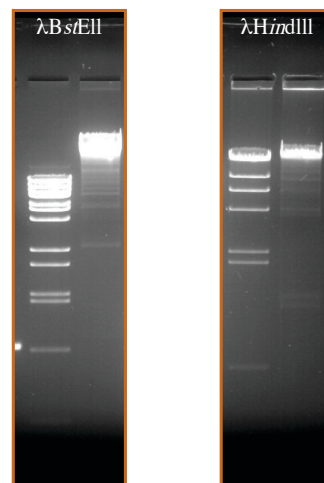
הפרוטוקול לבדיקה אם הליגאז "חי" או "מת" הוא פשוט למדי: קחו 1  $\mu$ l מרקר DNA (DNA ladder) ללא צבע (כלומר, בלי sample buffer), הוסיפו לו בופר ליגאז, ליגאז ומים, הדגירו כ-10 דקות "על השולחן" והריצו בג'ל אגרוז מול מרקר שלא טופל בליגאז (כביקורת). אם הליגאז פועל כהלכה, "סולם יעקב" של המרקר צריך להיעלם ולהפוך לגוש אחד (איור 1).

### ■ בדקו בדיקה מהירה: האם קיים לכלוך המונע מהליגאז לפעול

בדיקה זו היא פשוטה למדי: יש להשתמש בפרוטוקול הבדיקה של תקינות האנזים ליגאז, שתיארתי בטיפ הקודם (איור 1); אך למבחנת המבחן, המכילה את הליגאז, יש להוסיף את ה-DNA החשוד כמלוכלך. אם הליגאז לא יתפור מרקר DNA, או שפעולתו תיפגע, הרי שה-DNA מזוהם בחומרים שאינם מתאימים לריאקציית ליגציה.

אילו חומרים עשויים לפגוע בפעילות הליגאז?

- קטיונים חד-ערכיים.
- EDTA, הלוכד את יוני ה- $Mg^{2+}$  הנחוצים לפעילות הליגאז.
- פנול; אתנול; שיירים של אגרוז מומס ושל מלח קאטרופי (chaotropic salt) הנשארים אחרי ניקוי של מקטעי DNA בשיטות שונות.
- רובנו בודקים את איכות ה-DNA בעזרת NanoDrop Spectrophotometer. היחס שאנו בודקים במכשיר זה הוא 260/230 ועליו להימצא בטווח של 1.6-3.3. אם היחס הזה הוא פחות מ-1, אני ממליץ לנקות את ה-DNA



**איור 1.** בדיקה מהירה של פעילות הליגאז. אם הליגאז פועל היטב, כפי שניתן לראות באיור, הרי שאיכות הליגאז אינה אחראית לכישלון השיבוט.