



# טרנספורמציה של DNA פלסמידי לתוך חיידקים

ישנן ארבע שיטות עיקריות לטרנספורמציה של DNA לתוך חיידקים: טרנספורמציה כימית, טרנספורמציה חשמלית (electro-) (transformation or electroporation biolistic), וכן טרנספורמציה ביוליסטית (transformation biolistic) וטרנספורמציה קולית (sonic transformation). שתי השיטות הראשונות, טרנספורמציה כימית וחשמלית, הן הנפוצות והמקובלות ברחבי העולם. טרנספורמציה כימית משמשת בעיקר לניסויי שיבוט או subcloning פשוטים יחסית, ואילו אלקטרופורמציה משמשת בעיקר לבניית ספריות גנומיות או בשיבוטים קשים.

בטרנספורמציה כימית אנו מגדלים את החיידקים עד לאמצע הפאזה הלוגריתמית, קוצרים אותם ומטפלים בהם ביונים דו-ערכיים דוגמת  $Ca^{2+}$ . התאים המטופלים בדרך זו מכונים קומפנטטיים. לאחר מכן מערבבים את ה-DNA הפלסמידי עם התאים הקומפנטטיים על הקרח במשך 15-30 דקות, ומעבירים אותם לאמבט  $42^{\circ}C$  למשך 45 שניות (heat shock), שבים ומקררים על קרח ואז מגדלים במשך שעה על מצע עשיר, על מנת לבטא את גן העמידות לאנטיביוטיקה (ביטוי פנוטיפי או "התאוששות"). לבסוף זורעים את התאים שהותמרו ב-DNA פלסמידי על פלטות גידול המכילות אנטיביוטיקה. בטרנספורמציה כימית, חרף השוק התרמי

שימש כווקטור שיבוט. כך, נוסף על הביקורת של פלטות הגידול, תוכלו לבדוק גם את רמת הקומפנטטיות של החיידקים שלכם. אם החדרת הפלסמיד הסגור לא הביאה לגדילה של מושבות טרנספורמנטים, או שמספרן היה קטן - הרי שאין לצפות כלל למושבות של טרנספורמנטים על פלטת השיבוט.

אם ריכוז האנטיביוטיקה בפלטות הגידול הוא תקין, אזי הסיבה לכישלון הטרנספורמציה היא רמת הקומפנטטיות של התאים, שהפכו מקומפנטטיים ל"אימפוטנטיים" (ראו הטיפ "איך להפוך חיידקים לקומפנטטיים?").

## האם התאים הקומפנטטיים הם באמת קומפנטטיים?

"קומפנטטיות" בביולוגיה מולקולרית מוגדרת כיכולת של חיידקים לקבל DNA "עירו" זה. אך האם חיידקי *E. coli* או *Bacillus subtilis* רוצים לקבל DNA זה? התשובה היא שבהחלט לא! כדי "לשכנע" אותם בכל זאת לקלוט את ה-DNA הזר, אנו מטפלים בחיידקים המסכנים בשוק תרמי (heat shock) או בשוק חשמלי (electroporation), בדומה לשיטות שהפעיל הקג"ב על אסירים פוליטיים או בדומה לשיטות המשמשות עדיין לטיפול בחולי נפש.

ב-1970 מצאו החוקרים מורטון מנדל (Mandel) ואיקיו היגה (Higa) מהוואי, כי אם מערבבים DNA של בקטריופאג  $\lambda$  עם חיידקי *E. coli* על

בעשרים השנים האחרונות התפתחה ההנדסה הגנטית בקצב אדיר, ששום תחום אחר במדעים לא הצליח להשתוות אליו. הבסיס לפריצת דרך זו הוא ביישומן של שלוש טכניקות עיקריות: שימוש באנזימי רסטריקציה, PCR ושיטות שונות של החדרת DNA פלסמידי לתוך חיידקים. החדרת DNA פלסמידי לתוך חיידקים מאפשרת לנו לייצר את הגן שהוחדר לתוך הפלסמיד בצורה מונוקלונלית - תהליך הנקרא שיבוט (cloning) של DNA. גם אם פיסת האגרוז שבה נמצא ה-DNA שלכם נפלה על הרצפה או לתוך פח אשפה, עדיין תוכלו לשבט אותה על ידי טרנספורמציה לתוך חיידקי *Escherichia coli*, ולהפיק את ה-DNA שלכם בצורה נקייה במספר לא-מוגבל של עותקים. לפניכם סדרת טיפים לטרנספורמציה מוצלחת של DNA פלסמידי לתוך חיידקים. אני מקווה שתסתייעו בהם בעבודתכם.

## בדקו את ריכוז האנטיביוטיקה

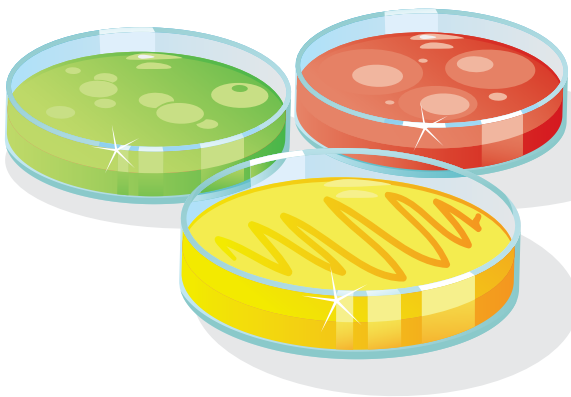
אחת הסיבות לטרנספורמציה כושלת היא שימוש באנטיביוטיקה מסוג לא-נכון או בריכוז שגוי. כך, למשל, חיידקי *E. coli* XL-10Gold, הנחשבים לחיידקים הטובים ביותר למטרות שיבוט, יגדלו היטב על מצע גידול המכיל  $40 \mu g/ml$  של כלורמפניקול, אך אינם מסוגלים לגדול על מצע המכיל אותה אנטיביוטיקה בריכוז של  $100 \mu g/ml$ . הריכוזים המרביים של אנטיביוטיקה לסלקציית פלסמידים ב-*E. coli* הם: אמפיצילין -  $100 \mu g/ml$ ; כלורמפניקול -  $40 \mu g/ml$ ; קנאמיצין -  $50 \mu g/ml$ ; טטראציקלין -  $12.5 \mu g/ml$ . ניתן להשתמש במחצית מהריכוזים האלה.

כיצד נבדוק אם טעינו בריכוז האנטיביוטיקה או השתמשנו באנטיביוטיקה לא-נכונה? הביקורת המתאימה ביותר לפלטות גידול היא לזרוע על אותן פלטות שני סוגים של חיידקים - האחד רגיש לאנטיביוטיקה שבה אנחנו משתמשים, והאחר לא-רגיש. בד בבד, אני ממליץ על ביקורת נוספת - במקביל לטרנספורמציה של תערובת הליגציה, החדירו לאותם חיידקים קומפנטטיים את הפלסמיד הסגור (supercoiled plasmid)

קומפנטטיות מוגדרת כיכולת של חיידקים לקבל DNA "עירו" זה. אך האם החיידקים רוצים לקבל DNA זה? התשובה היא שבהחלט לא!

השוק היוני, רק 0.3% מכלל אוכלוסיית החיידקים מסוגלים לקלוט DNA פלסמידי ולעבור טרנספורמציה. יתרה מזו, בשיטת האלקטרופורמציה, כאשר חושפים את החיידקים לשוק חשמלי של  $2,400 V/cm$  לפרק זמן קצר מאוד, מתים יותר מ-70% מהחיידקים. אף על פי כן, 30% החיידקים השורדים מספיקים לבניית ספריות גנומיות של  $10^9$ - $10^{10}$  שבטים שונים.

קרח בנוכחות  $CaCl_2$ , ה-DNA של הנגיף חודר לחיידקים וגורם לטרנספורמציה שלהם. יתרה מזו, הם גם גילו שאם מדגירים את תערובת ה-DNA הפאגי עם החיידק לזמן קצר ב- $42^{\circ}C$ , כמות הטרנספורמנטים עולה במידה ניכרת. שנתיים אחר-כך השתמש סטנלי כהן (Cohen) בשיטה זו, והחדיר ל-*E. coli* את פלסמיד R (R-factor). בכך החל עידן ההנדסה הגנטית.



עד שהתפרסם מחקרו המרשים של  $\text{CaCl}_2$ , דגלאס הנחן (Hanahan), שבו בדק באופן שיטתי את הטרנספורמציה הכימית, ומצא כי בהוספת מתכות פוליוולנטיות כגון מנגן (Mn), רובידיום (Rb) או קובלט (Co), ניתן להגיע ליעילות טרנספורמציה של  $10^6$ - $10^7$  טרנספורמנטים פר מיקרוגרם של פלסמיד pUC19.

כעבור 7 שנים, שינו Chihiro Inoue ועמיתיו את שיטתו של Hanahan על ידי גידול סטרטרים של חיידקים של  $18^\circ\text{C}$  והוספת בופר PIPES. שתי השיטות הללו - של Hanahan ושל Inoue - משמשות כיום כמעט בכל מעבדה ברחבי העולם, כמו גם בחברות ביוטכנולוגיה המוכרות תאים קומפוטנטיים.

חשוב לציין שתאים קומפוטנטיים אינם תאי *E. coli* רגילים, אלא תאים עדינים מאוד, המאבדים את הקומפוטנטיות שלהם במהירות רבה. התאים הקומפוטנטיים רגישים לשינויי טמפרטורה ולחץ מכני. לפיכך יש להפשידם רק על קרח, כי הפשרה "ביד" גורמת לירידה של פי שניים בקומפוטנטיות שלהם, והקפאה והפשרה נוספות גורמות לירידה בקומפוטנטיות

PEG, DMSO ויוני  $\text{Mg}^{2+}$ . זמן ההדגרה על הקרח של ה-DNA הפלסמידי עם החיידקים אינו חשוב כלל, ואפשר אפילו לקבל מושבות של טרנספורמנטים ללא heat shock. בשיטה זו משתמשת חברת פרמנטס (Fermentas), שפיתחה את הקיט הנקרא Transform Aid Bacterial Transformation Kit. בשימוש בקיט הזה ניתן לקבל תאים קומפוטנטיים מחיידקים שגדלו במצע נוזלי ב-20 דקות בלבד, ולסיים את כל תהליך השיבוט, ובכלל זה גם את שלבי הליגציה והטרנספורמציה, בתוך שעה אחת בלבד. עם זאת, אני ממליץ להשתמש בשיטה זו רק למטרות של subcloning, כלומר להכנסת פלסמידים סגורים (supercoiled or relaxed), מפני שיעילות הטרנספורמציה בשיטה זו נמוכה, ונמצאת בטווח של  $10^6$ - $10^7$  טרנספורמנטים (cfu) פר מיקרוגרם של פלסמיד pUC19. יעילות טרנספורמציה זו אינה מספקת לבניית ספריות או לשיבוטים בעייתיים.

השיטה השנייה, הכנת תאים קומפוטנטיים על ידי טיפול ב- $\text{CaCl}_2$ , היא הנפוצה ביותר. עד שנת 1983 השתמשו כולם רק ב-50 mM

## אל תוסיפו טרזיקלין בהפקות פלסמיד

רוצים לדעת למה? היכנסו לאתר האינטרנט [BioInform.co.il](http://BioInform.co.il) שלנו!

## בחרו בחיידק המתאים ביותר לאפליקציה שלכם

רוצים לדעת כיצד? היכנסו לאתר האינטרנט [BioInform.co.il](http://BioInform.co.il) שלנו!

## איך להפוך חיידקים לקומפוטנטיים?

הכנת תאים קומפוטנטיים לאלקטרופורציה היא תהליך פשוט - עליכם רק לשטוף את התאים במים פעמים אחדות. העיקר הוא שלא יישארו יונים מכל סוג שהוא סביב החיידקים, ושהחיידקים יהיו מורחפים במים נקיים.

בטרנספורמציה כימית ישנן שתי שיטות להכנת תאים קומפוטנטיים: טיפול ב- $\text{CaCl}_2$  וטיפול ב-PEG (פוליאתילן גליקול). שיטת ה-PEG היא פשוטה למדי, ודורשת רק ערבוב של החיידקים עם מצע גידול LB, המכיל 10%

## טרנספורמציה של DNA פלסמידי לתוך חיידקים

### האם לקנות תאים קומפלטניים מסחריים?

השאלה היא בנאלית, אך התשובה היא רצינית מאוד, והיא - בהחלט כן. רמת הקומפלטניות של תאים שהוכנו במעבדה, אפילו בשימוש בשיטה של Hanahan, היא בסביבות  $10^6$  -  $10^8$ .

מסתבר שהתשובה פשוטה למדי: אם הפלסמיד נושא גן עמידות לאמפיצילין, אזי ניתן בהחלט לדלג על השלב הזה. בכל מצב אחר, יש לבצע ביטוי פנוטיפי. "מצב אחר" פירושו עמידות לכלורמפניקול, לקנאמיצין, לטרציקלין, לסטרפטומיצין או

של עד פי עשרה. נוסף על כך, אסור לערבב תאים קומפלטניים על ידי פיפטציה או וורטקס - הם עוברים ליזיס ונהרסים.

### איך טרנספורמציה כימית עובדת?

רוצים לדעת איך? היכנסו לאתר האינטרנט שלנו: [BioInform.co.il](http://BioInform.co.il)

### האם לקנות תאים קומפלטניים מסחריים? השאלה היא בנאלית, אך התשובה היא רצינית מאוד: כן

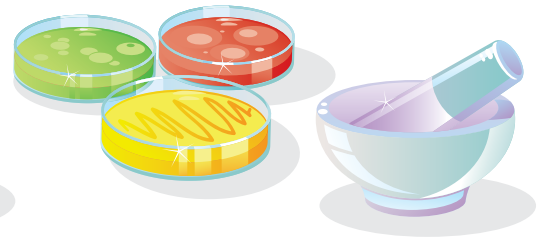
לעומת זאת, ניתן להשיג תאים קומפלטניים מסחריים שרמת הקומפלטניות שלהם היא  $10^8$  -  $10^9$  מושבות של טרנספורמנטים פר מיקרוגרם של פלסמיד UC19. למטרות שיבוט, המלצתי היא להשתמש בתאים קנויים בלבד; להעברה של פלסמידים סגורים ו"בריאים", ניתן בהחלט להשתמש בתאים "תוצרת בית". שני הגורמים הקריטיים ביותר בכל סוגי השיבוטים הם האיכות והביצוע של האנזים ליגאז ורמת הקומפלטניות של תאי ה-*E. coli* (לטיפים על ריאקציית ליגציה, ראו מדור זה, *BioInform*). ההבדל בין רמת הקומפלטניות של תאים מסחריים ותאים "תוצרת בית" הוא של פי עשרה בסך הכול, אך הבדל זה עשוי, לעתים, להיות מכריע. כך, למשל, אם ביצענו שיבוט בתאים קנויים וקיבלנו 5-9 מושבות של טרנספורמנטים, הרי שאילו השתמשנו בתאים שהוכנו במעבדה, לא היינו מקבלים דבר. איך ניתן לחסוך בתאים הקומפלטניים הקנויים?

לאנטיביוטיקה אחרת. כל סוגי האנטיביוטיקה האלו פוגעים בסיתתת החלבונים של החיידק, ובאופן פרדוקסלי, העמידות לחומרים אלה נובעות בעצמן מחלבונים, שפעילותם האנזימטית מנטרלת אנטיביוטיקה (לדוגמה - קנאמיצין פוספורנספראז, כלורמפניקול - אצטיילטרנספראז ועוד). אמפיצילין, לעומת זאת, פוגע בסיתתת הפפטידוגליקן, ואם חיידק אינו מתחלק ואינו מסנתז דופן - אמפיצילין אינו משפיע עליו כלל וניתן לדלג על שלב ה"התאוששות" (השיטה נקראת "דקה-דקה", ובה מערבבים את ה-DNA עם חיידקים על הקרח למשך דקה, משהים ב- $42^{\circ}\text{C}$  ל-30 שניות, מקררים על הקרח למשך דקה נוספת וזורעים ישירות על פלטות הגידול). לפיכך, בשיבוטים שאינם מבוססים על סלקציה באמפיצילין, בצעו תמיד שלב של ביטוי פנוטיפי.

### האם שלב הביטוי הפנוטיפי הוא הכרחי?

אם נשאל עשרה סטודנטים המבצעים טרנספורמציות על בסיס יומיומי, איזה פנוטיפ או תכונה של החיידק אנו מבטאים בשלב הזה, ידעו, מניסיון, רק שלושה או ארבעה שהפנוטיפ המתבטא הוא עמידות לאנטיביוטיקה. שלב הביטוי הפנוטיפי או ה"התאוששות" נמשך שעה אחת, ולא תמיד החוקר יכול להמתין זמן כה רב. את הביטוי הפנוטיפי מבצעים על מצע עשיר (LB or SOC), ב- $37^{\circ}\text{C}$  (רצוי עם טלטול של 250 rpm), וישנם עובדי מעבדה המקצרים שלב זה ל-30 דקות, אך מקטינים בכך פי שניים את יעילות הטרנספורמציה. כנגד זה, ישנן חברות המוכרות תאים קומפלטניים, ובהן זיימו (Zymo), RBC ואחרות, שהפרוטוקולים שלהן מנחים את המשתמש לערבב את ה-DNA הפלסמידי עם חיידקים על קרח למשך דקה או שתיים ואז לזרוע ישירות על פלטות גידול חמות, ללא שום heat shock וביטוי פנוטיפי... האם שלב ה"התאוששות" הוא הכרחי, אפוא, או שאינו נחוץ כלל?

חברת המשווקת בארץ	החברה היצרנית	זן החיידק
אכדו	Agilent Technologies	XL-10Gold, XL-1Blue, SURE
ריום	Invitrogen	BL21Star, Top10, DH5alpha, DH10B, INV110, STBL4
קיבוץ בית העמק	Promega	JM109
מרקורי	Novagen	BL21(plus its derivatives), NovaBlue
אורנת	RBC	BL21, DH5alpha, JM109



### לקריאה נוספת:

- Cohen, S.N., Chang, A.C. and Hsu, L., "Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA", *PNAS USA* 69(8): 2110-4 (1972).
- Hanahan, D., "Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids", *Journal of Molecular Biology* 166(4): 557-80 (1983).
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., "High Efficiency Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids", *Gene* 96(1): 23-8 (1990).
- Mandel, M. and Higa, A., "Calcium-Dependent Bacteriophage DNA Infection", *Journal of Molecular Biology* 53(1): 159-62 (1970).
- Tatum, E.L. and Lederberg, J., "Gene Recombination in the Bacterium *Escherichia coli*", *The Journal of Bacteriology* 53(6): 673-84 (1947).
- Weston, A. et al., "Simultaneous Transformation of *Escherichia coli* by Pairs of Compatible and Incompatible Plasmid DNA Molecules", *Molecular and General Genetics* 172(1): 113-8 (1979).

התשובה היא להשתמש בנפחים קטנים, ולא ב- $100 \mu\text{l}$ , כפי שכתוב בפרוטוקולים. ל-subcloning, המלצתי היא להשתמש ב-5-10 מיקרוליטרים של התאים בלבד, ולשיבוטים - ב- $20-30 \mu\text{l}$ .

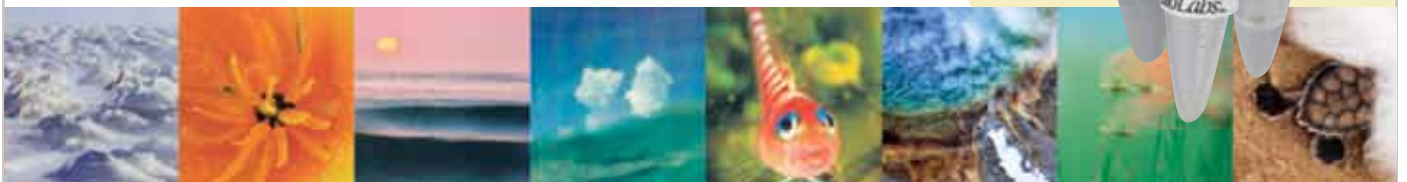
קלט נחמד מאוד של חברת Zymo, הנקרא Z-Competent™ *E. coli* Transformation Kit מאפשר להכין, במחיר סביר, עד 20 ml (10-20 מנות של תאים קנויים) של תאים קומפטנטיים ברמה טובה למדי, של  $10^8-10^9$  (cfu/ $\mu\text{g}$  pUC19). נוסף על שימוש בקטיונים פוליוולנטים, קלט זה מנצל את מצע הגידול הנקרא ZymoBroth, שפותח בחברה ומשפר בהרבה את יעילות הטרנספורמציה.

לסיכום, כדי להצליח בשיבוטים בכלל ובטרנספורמציות בפרט, עלינו להביא בחשבון שני גורמים מרכזיים - הרקע הגנטי של החיידקים ורמת הקומפטנטיות שלהם. טעות בבחירת החיידק עלולה לעלות לנו ביוקר.

## אורנת מתחדשת והינה הנציגה הבלעדית של



NEB החברה המובילה בעולם בפיתוח אנזימים למעבדות מדעי-החיים



ביוכימיקלים וציוד מעבדתי בע"מ Biochemicals & Laboratory Equipment Ltd.

טל. 08-9477077 | פקס. 08-9363034 | [ornatbio@ornat.co.il](mailto:ornatbio@ornat.co.il) | [www.ornat.co.il](http://www.ornat.co.il)