

# Digestione enzimatica degli amplificati PCR di DNA di **lievito**

**Obiettivo** Sottoporre gli amplificati PCR di DNA genomico di diversi lieviti, isolati dagli acini d'uva, ad una analisi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) al fine di identificare la specie a cui il lievito appartiene, attraverso l'azione di tre enzimi di restrizione HaeIII, HhaI e HinfI.

**Autore** Istituto Nicola Pellati di Nizza Monferrato (AT)  
Primo classificato Mad for Science 2017  
Progetto "Biodiversità e Uva"



# Materiali e reagenti

- Amplificati di PCR di DNA genomico di lievito
- Enzima HaeIII (o BsuRI) 10 U/ $\mu$ l
- Buffer R 10X (tampone dell'enzima HaeIII)
- Enzima HhaI (o CfoI) 10 U/ $\mu$ l
- Buffer Tango 10X (tampone dell'enzima HhaI)
- Enzima HinfI 10 U/ $\mu$ l
- Buffer R 10X (tampone dell'enzima HinfI)
- Acqua deionizzata
- Provette da 1.5 ml
- Puntali
- Pennarelli indelebili neri, rossi e blu



## Strumenti

- Micropipette
- Microcentrifuga
- Vortex (facoltativo)
- Termostato o termoblock
- Congelatore -20°C



## Sicurezza

- Camice
- Guanti



## Tempo

30 minuti per la preparazione dei campioni  
Una notte per la digestione enzimatica



# Procedimento

1. Scongelare, tenendo in ghiaccio, gli amplificati di PCR, ottenuti seguendo il protocollo “Amplificazione PCR e corsa elettroforetica di campioni di DNA genomico di lievito”, e gli enzimi di restrizione con i loro specifici buffer di reazione. Centrifugare le varie provette per far scendere le goccioline presenti sulle pareti.
2. Preparare le provette per la digestione enzimatica dei campioni di PCR:
  - ogni prodotto di PCR deve essere digerito da ciascun enzima di restrizione, pertanto predisporre un numero di provette da 1.5 ml pari a 3 volte i prodotti di amplificazione da analizzare;
  - disegnare sul tappo delle provette trattate con l’enzima HaeIII un pallino nero, su quelle con l’enzima HhaI un pallino rosso e su quelle con l’enzima HinfI un pallino blu;
  - scrivere sul tappo delle provette il numero del campione da analizzare (es. 1, 2, 3, ...), facendo in modo di assegnare il numero 1 (campione 1) a una provetta con pallino nero, a una con pallino rosso e a una con pallino blu, il numero 2 ad altre tre provette con pallini dei tre colori diversi e così avanti. Prendere nota su un foglio a parte del nome del campione associato alla numerazione.

Alla fine di questa preparazione, avremo per ogni campione 3 provette con pallini di colore diverso.

3. Preparare altre provette per i controlli della reazione di digestione:
  - procurarsi 6 provette da 1.5 ml e disegnare su due di queste un pallino nero, su altre due un pallino rosso e sulle ultime due un pallino blu;
  - scrivere sul tappo di una delle due provette con pallino nero “controllo +” e sull’altro “controllo -”. Procedere nello stesso modo per le provette con i pallini rossi e blu.
4. Per limitare il consumo di reagenti, visto l’elevato numero di campioni da analizzare per questo tipo di esperimento, ogni digestione enzimatica viene realizzata in un volume finale molto ridotto, pari a 10  $\mu$ l (5  $\mu$ l di mix di reazione + 5  $\mu$ l di campione di DNA amplificato). Inoltre, per minimizzare gli errori viene preparata una singola mix di reazione, contenente acqua, enzima e tampone specifico, per ogni enzima di restrizione.

Preparare le provette per la mix di reazione:

- procurarsi 3 provette da 1.5 ml e disegnare sul tappo un pallino nero, uno rosso e uno blu;
- scrivere sul tappo di tutte e tre le provette “Mix”.

- 5.** Per ogni enzima, preparare una mix di reazione che tenga conto del numero di campioni da analizzare più un controllo positivo, un controllo negativo e un campione in eccesso. Ipotizzando di dover analizzare 13 campioni (10 amplificati di PCR, 1 controllo positivo, 1 controllo negativo e 1 campione in eccesso), allestire la mix di reazione come segue, avendo cura di cambiare il puntale dopo ogni aggiunta:

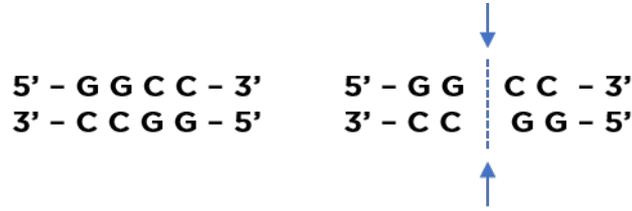
ORDINE DI AGGIUNTA	COMPONENTE	VOLUME IN 5 $\mu$ l DI MIX (1 REAZIONE)	VOLUME IN 65 $\mu$ l DI MIX (13 REAZIONI)
1	Acqua deionizzata	3.8 $\mu$ l	49.4 $\mu$ l
2	Tampone 10X specifico per l'enzima	1 $\mu$ l	13 $\mu$ l
3	Enzima specifico 10 U/ $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	2.6 $\mu$ l
<b>TOTALE</b>		<b>5 <math>\mu</math>l</b>	<b>65 <math>\mu</math>l</b>

- 6.** Mescolare con un vortex o con un movimento *up and down* della micropipetta ognuna delle tre mix di reazione prima di procedere con le aliquote.
- 7.** Distribuire 5  $\mu$ l di mix con l'enzima HaeIII (pallino nero) in ognuna delle provette con un pallino nero disegnato sul tappo.
- 8.** Distribuire 5  $\mu$ l di mix con l'enzima HhaI (pallino rosso) in ognuna delle provette con un pallino rosso disegnato sul tappo.
- 9.** Distribuire 5  $\mu$ l di mix con l'enzima HinfI (pallino blu) in ognuna delle provette con un pallino blu disegnato sul tappo.
- 10.** Trasferire 5  $\mu$ l di amplificato di PCR da analizzare nella provetta 1 con pallino nero, altri 5  $\mu$ l nella provetta 1 con pallino rosso e, infine, altri 5  $\mu$ l nella provetta 1 con pallino blu. Cambiare il puntale ad ogni aggiunta per evitare contaminazioni. Ripetere questa operazione per ogni campione da analizzare.
- 11.** Trasferire 5  $\mu$ l di acqua deionizzata nella provetta con pallino nero e la scritta “controllo -”. Procedere in questo modo anche per gli altri due campioni negativi (rosso e blu), avendo l'accortezza di cambiare il puntale ad ogni aggiunta.

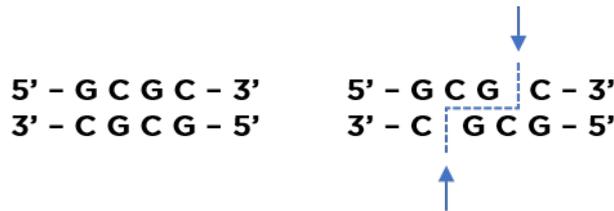
- 12.** Trasferire 5  $\mu$ l di DNA di campione noto (ad esempio, l'amplificato PCR proveniente da *Saccharomyces cerevisiae*) nella provetta con pallino nero e la scritta "controllo +". Procedere in questo modo anche per gli altri due campioni positivi (rosso e blu), avendo l'accortezza di cambiare puntale ad ogni aggiunta.
- 13.** Incubare le provette a 37°C per una notte nel termostato o nel termoblock.
- 14.** Centrifugare per pochi secondi alla massima velocità i campioni per raccogliere eventuali gocce evaporate durante l'incubazione e presenti sulle pareti delle provette.
- 15.** Fermare la digestione enzimatica, ponendo i campioni a -20°C in attesa di analizzarli tramite elettroforesi su gel d'agarosio e scoprire la specie di lievito analizzato. Seguire a tal proposito il protocollo "Identificazione della specie di lievito mediante analisi del profilo di restrizione con corsa elettroforetica".

## Note

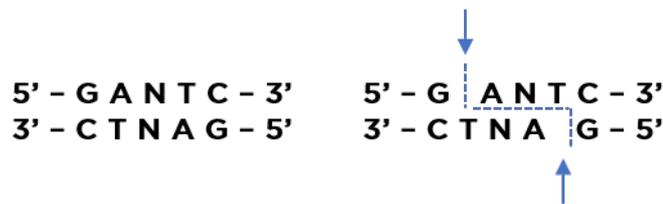
- Gli enzimi di restrizione sono endonucleasi, cioè enzimi capaci di tagliare il DNA in punti precisi. Essi riconoscono delle specifiche sequenze all'interno della molecola di DNA e la tagliano in modo da generare frammenti con estremità coesive oppure piatte. Le sequenze riconosciute sono lunghe da 4 a 8 nucleotidi e sono PALINDROMI, ovvero se lette in direzione 5'-3' o 3'-5' danno luogo alla stessa sequenza.
- Le sequenze riconosciute dagli enzimi di restrizione utilizzati in questo protocollo sono le seguenti:
  - **HaeIII** (o **BsuRI**) riconosce la sequenza sottostante e taglia tra la G e la C producendo estremità piatte



- **HhaI** (o **CfoI**) riconosce la sequenza sottostante e taglia tra la G e la C producendo estremità coesive



- **Hinfi** riconosce la sequenza sottostante e taglia tra la G e la A producendo estremità coesive (la N identifica una qualsiasi delle quattro basi azotate del DNA)



- Ogni enzima di restrizione per funzionare adeguatamente ha bisogno di uno specifico tampone di reazione che riproduce le condizioni di pH e forza ionica e contiene i co-fattori necessari all'enzima per riconoscere il substrato e operare il taglio. Il tampone di reazione viene fornito insieme all'enzima di restrizione.
- Il team di docenti di scienze dell'Istituto di Istruzione Superiore Nicola Pellati di Nizza Monferrato (AT) ha verificato che il congelamento a -20°C dei campioni sottoposti a taglio enzimatico è efficace nell'inattivare la digestione. Un metodo alternativo è l'inattivazione di HaeIII e Hinfi con il calore: dopo il taglio enzimatico, mantenere per 20 minuti i campioni digeriti con HaeIII a 80°C e quelli digeriti con Hinfi a 65°C. L'enzima di restrizione HhaI è, invece, insensibile al calore ma può esserne inattivata l'azione aggiungendo alla reazione EDTA 0.5M (pH 8) ad una concentrazione finale di 20 mM.
- Esistono moltissime ditte produttrici di enzimi di restrizione. Per questo esperimento sono stati utilizzati enzimi (e buffer) prodotti da Thermofisher, di seguito i riferimenti dei materiali utilizzati:
  - HaeIII (o BsuRI) 10 U/μl, numero di catalogo: ER0151;
  - HhaI (o CfoI) 10 U/μl, numero di catalogo: ER1851;
  - Hinfi 10 U/μl, numero di catalogo: ER0801.
- La reazione di restrizione può anche essere allestita in provette da PCR da 0.2 ml, in modo da poter utilizzare il termociclatore per l'incubazione notturna a 37°C.