

# Estrazione di **DNA** genomico da **lievito**

**Obiettivo** Estrarre il materiale genetico da lieviti cresciuti in coltura pura e isolati a partire dalla buccia degli acini d'uva.

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



# Materiali e reagenti

- Colture pure di lievito in terreno solido WL (addizionato con Ampicillina e Bifenile)
- SDS in polvere
- Acetato di litio in polvere
- Etanolo 96-100%
- Acqua deionizzata (sterile e non)
- Spatole
- Navicelle da pesata o carta stagnola
- Becher graduato da 100 ml
- Cilindro graduato da 100 ml
- Bottiglia di vetro da 100 ml
- Puntali (sterili e non)
- Ancoretta magnetica
- Provette da 1.5 ml
- Pennarello



## Strumenti

- Bilancia
- Piastra magnetica riscaldante
- Cappa biologica a flusso laminare o becco Bunsen
- Bagnetto termostato
- Vortex
- Microcentrifuga
- Micropipette



## Sicurezza

- Camice
- Guanti



## Tempo

30 minuti circa (le tempistiche variano a seconda del numero di campioni da cui estrarre il DNA)



# Procedimento

- 1.** Per eseguire questo protocollo è necessario disporre di colture pure di lievito in terreno solido WL, fatte crescere per 48-72 ore seguendo il protocollo “Isolamento in coltura pura di ceppi di lievito” nella sezione “Biologia ambientale”.
- 2.** Accendere il bagnetto termostato e impostare la temperatura a 70°C.
- 3.** Preparare la soluzione di lisi, risospendendo in acqua deionizzata la polvere di acetato di litio alla concentrazione finale di 0.2M e l’SDS all’1%:
  - per preparare 100 ml di soluzione, pesare con una bilancia 1.32 g di acetato di litio e 1 g di SDS, aiutandosi con una o più navicelle da pesata (per i dettagli della preparazione si vedano le note). Scegliere il volume finale di soluzione in base al numero di campioni di lievito da cui si vuole estrarre il DNA e tenendo in considerazione che per ogni campione sono richiesti 100 µl di tampone di lisi. Ricordarsi di considerare almeno uno o due campioni in eccesso;
  - trasferire le polveri in un becher graduato da 100 ml;
  - con un cilindro trasferire 50 ml di acqua deionizzata nel becher e mescolare la soluzione con una ancoretta su piastra magnetica riscaldata, fino alla completa dissoluzione delle polveri;
  - portare la soluzione al volume di 100 ml nel becher, aggiungendo acqua deionizzata fino alla tacca indicatrice corrispondente, e continuare a mescolare.
- 4.** Predisporre tante provette quanti sono i campioni di lievito da cui si vuole estrarre il DNA e marcarle con un nome o un numero che permetta di risalire al campione di partenza.
- 5.** Con una micropipetta trasferire 100 µl di soluzione di lisi in ogni provetta.
- 6.** Trasferire il volume restante di soluzione di lisi in una bottiglia di vetro, precedentemente marcata con la scritta “Soluzione di lisi per lieviti”, e conservarla in frigorifero per successive estrazioni di DNA.
- 7.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e posizionare nella porzione centrale tutto il materiale necessario.

8. Sotto cappa biologica, toccare delicatamente una colonia di lievito con un puntale sterile e stemperare le cellule nella soluzione di lisi. Prestare attenzione a cambiare puntale per ogni nuovo campione da raccogliere.
9. Incubare le provette a 70°C per 15 minuti.
10. Con una micropipetta trasferire in ogni provetta 300 µl di Etanolo 96-100% per favorire la precipitazione dei detriti cellulari e del DNA. Mescolare i campioni con un vortex per qualche secondo.
11. Centrifugare le provette per 3 minuti a 15.000 g.
12. Con una micropipetta eliminare il surnatante, cercando di non toccare e di non aspirare il pellet di detriti cellulari e DNA.
13. Lasciare asciugare il pellet sotto cappa biologica per circa 15 minuti al fine di eliminare eventuali residui di surnatante.
14. Al termine liberare la cappa biologica dal materiale utilizzato, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70%, chiudere il vetro e sterilizzare l'ambiente interno con la luce a raggi UV.
15. Risospendere il pellet di detriti cellulari e DNA con 100 µl di acqua deionizzata sterile, eseguendo dei movimenti *up and down* della micropipetta. Fare attenzione a cambiare sempre il puntale tra un campione e l'altro.
16. Centrifugare le provette per 1 minuto a 15.000 g per eliminare i detriti cellulari.
17. Predisporre tante provette quanti sono i campioni di DNA estratti e marcarle con il nome del campione di partenza e la data.
18. Con una micropipetta trasferire nella provetta corrispondente circa 80 µl di surnatante, contenente il DNA, ed eliminare la provetta in cui è rimasto il pellet di detriti cellulari.
19. Eseguire una valutazione qualitativa del DNA estratto tramite caricamento su gel d'agarosio (seguire i protocolli della risorsa "Allestimento di elettroforesi di DNA su gel d'agarosio" per sapere come preparare un gel d'agarosio e far correre i campioni).
20. Il DNA così ottenuto può essere utilizzato per compiere reazioni di PCR ed amplificare le regioni conservate ITS1 e ITS2 dell'RNA ribosomiale, seguendo il protocollo "Amplificazione PCR e corsa elettroforetica di campioni di DNA genomico di lievito" (sezione: "Biotecnologie"), al fine di identificare le specie di lieviti isolati dagli acini d'uva con i protocolli della risorsa "Analisi RFLP per identificare le specie di lieviti isolati dagli acini d'uva" (sezione: "Biotecnologie"). In alternativa, il DNA può essere conservato a 4°C, per alcuni giorni, oppure a -20°C per periodi più lunghi.

## Note

- Il protocollo sopra descritto rappresenta un metodo semplice, veloce, efficace e sicuro per estrarre il DNA da lieviti, senza la necessità di utilizzare enzimi, sostanze chimiche pericolose o temperature estreme. La procedura è stata sviluppata da alcuni scienziati dell'Istituto di Biologia Cellulare e Molecolare dell'Università di Tartu in Estonia ed è stata testata e adattata all'ambiente scolastico dal team di docenti di scienze dell'Istituto di Istruzione Superiore Nicola Pellati di Nizza Monferrato (AT). Al presente link è possibile scaricare l'articolo scientifico di riferimento in formato PDF: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3182553/>.
- La quantità di DNA genomico totale, che si può ottenere partendo da  $1 \times 10^7$  cellule di lievito, è di circa 100 ng. Per conoscere quanto DNA è stato effettivamente estratto, quantificare il DNA allo spettrofotometro, come descritto nel protocollo "Quantificazione del DNA allo spettrofotometro".
- Il DNA così estratto può essere utilizzato per esperimenti di PCR, purché il frammento di DNA da amplificare non superi le 3.500 paia di basi.
- Questo protocollo può essere seguito anche per estrarre il DNA dal comune lievito granulare per la panificazione, facilmente acquistabile al supermercato. Una valida alternativa per tutte quelle scuole che non hanno la possibilità di isolare i lieviti dalla buccia degli acini d'uva.
- Per calcolare quanti grammi di acetato di litio sono necessari per preparare una soluzione concentrata 0.2M si deve risalire al numero di moli, sfruttando la definizione di molarità:

$$\text{Molarità} = \frac{\text{moli di soluto (mol)}}{\text{volume di soluzione (L)}}$$

Se, infatti, la molarità esprime il numero di moli di un soluto in un litro di soluzione, allora in un litro di soluzione di acetato di litio sono contenute 0.2 moli. Applicando poi la formula inversa del calcolo delle moli e conoscendo la massa molecolare dell'acetato di litio (65.99 g/mol) è possibile calcolarne la massa:

$$\text{Moli} = \frac{\text{massa del soluto (g)}}{\text{massa molecolare (g/mol)}} \rightarrow \text{Massa} = \text{moli (mol)} \times \text{massa molecolare (g/mol)}$$

$$\text{Massa} = 0.2 \text{ mol} \times 65.99 \text{ g/mol} = 13.198 \text{ g} = 13.2 \text{ g}$$

Quindi, per preparare una soluzione 0.2M di acetato di litio bisogna sciogliere in un litro di acqua deionizzata 13.2 g di polvere. Applicando poi una semplice proporzione, è possibile modificare la quantità di grammi da pesare sulla base del volume di soluzione da preparare.

- La concentrazione finale di SDS nella soluzione di lisi deve essere all'1%, ovvero 1 g in 100 ml. Modificare proporzionalmente la quantità di polvere di SDS da pesare in base al volume di soluzione di lisi che si sta preparando.
- Generalmente le centrifughe di nuova generazione hanno la possibilità di impostare le condizioni di centrifugazione sia in g (o rcf) sia in rpm. Se così non fosse, è possibile passare da una unità all'altra applicando la seguente formula (r è il raggio in centimetri del rotore della centrifuga in dotazione):

$$\text{Rcf} = (\text{rpm})^2 \times 1.118 \times 10^{-5} \times r$$

Per facilitare la conversione sono disponibili online dei calcolatori, come questo che vi proponiamo al seguente link: <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/support/calculators-and-apps/g-force-calculator>.

- Nel posizionare le provette nella microcentrifuga è buona norma che queste abbiano lo stesso orientamento (ad esempio, tutte con l'apertura della provetta verso il rotore della centrifuga). Questa pratica permetterà di sapere da quale lato si depositerà il pellet e ne faciliterà l'identificazione.
- Dal momento che la centrifugazione salda bene il pellet sul fondo della provetta, il surnatante potrebbe essere eliminato anche con una inversione decisa della provetta. In caso di residuo di surnatante, non invertire la provetta una seconda volta e non dare colpi quando questa è capovolta, perché il pellet di DNA potrebbe staccarsi e cadere. Un eventuale avanzo di surnatante sarà asciugato ponendo i campioni sotto cappa biologica.
- Questo protocollo può essere realizzato anche in assenza di una cappa biologica a flusso laminare: è sufficiente un banco da laboratorio, precedentemente pulito con Etanolo 70%, e la fiamma di un becco Bunsen (fare attenzione al rischio incendio!), vicino alla quale raccogliere le colonie di lievito.
- Seguendo questa metodica è possibile estrarre DNA non solo da *Saccharomyces cerevisiae*, ma anche da differenti specie di lievito, come *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* e *Pichia pastoris*.