

Identificazione della **specie di lievito** mediante analisi del **profilo di restrizione** con **corsa elettroforetica**

Obiettivo Studiare i campioni sottoposti ad analisi RFLP tramite elettroforesi su gel d'agarosio con l'obiettivo di individuare peso molecolare e numero dei frammenti di DNA ottenuti a seguito della digestione enzimatica. Dalla dimensione e dal numero dei prodotti di digestione sarà possibile risalire alla specie di lievito, identificandola con una certa attendibilità.

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 sottoposti a digestione enzimatica
- Gel d'agarosio al 2.5%
- Tampone di caricamento 6X
- Marcatore a basso peso molecolare
- Puntali



Strumenti

- Micropipette
- Microcentrifuga
- Apparato di corsa elettroforetica (camera, slitta e pettine)
- Generatore di differenza di potenziale
- Generatore di luce UV o luce blu



Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Occhiali di protezione



Tempo

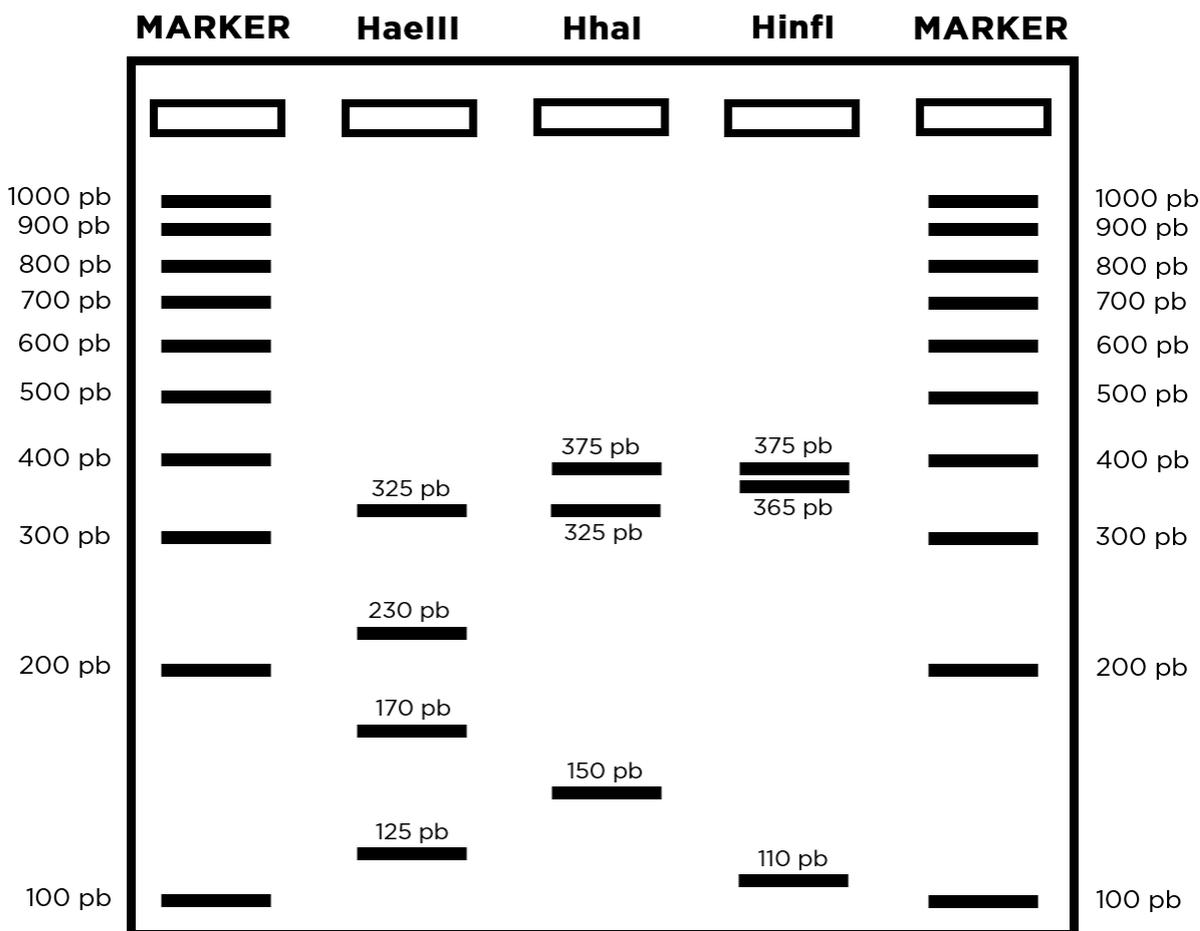
Circa un'ora per la preparazione e il caricamento dei campioni (la tempistica varia a seconda del numero di campioni)
Circa un'ora per la corsa elettroforetica e l'analisi dei risultati



Procedimento

- 1.** Questo protocollo è la continuazione dell'attività "Digestione enzimatica degli amplificati PCR di DNA di lievito", in cui amplificati PCR di lievito sono stati sottoposti a digestione enzimatica tramite l'azione di tre enzimi di restrizione. Scongelare i campioni e centrifugare le provette per far scendere le goccioline eventualmente presenti sulle pareti.
- 2.** Preparare un gel d'agarosio al 2.5% e predisporre la cella elettroforetica come descritto nei protocolli della risorsa "Allestimento di elettroforesi di DNA su gel d'agarosio (sezione: "Biologia molecolare")". Adattare la quantità di agarosio da pesare alla percentuale scelta e valutare quanti gel preparare in funzione del numero di campioni da caricare.
- 3.** Durante il raffreddamento del gel preparare i campioni da caricare nei pozzetti: avendo cura di cambiare puntale ad ogni campione, in ogni provetta dove è avvenuta la digestione enzimatica aggiungere 2 μ l di tampone di caricamento 6X e compiere un movimento *up and down* della micropipetta per mescolare bene la soluzione. Procedere in questo modo per tutti i campioni, compresi i controlli positivi e negativi.
- 4.** Procedere con il caricamento dei campioni secondo l'ordine sotto riportato (fare attenzione a cambiare sempre puntale tra un caricamento e l'altro per non incorrere in contaminazioni):
 - pozzetto 1: 10 μ l di DNA marker;
 - pozzetto 2: 12 μ l di campione 1 digerito con HaeIII (pallino nero);
 - pozzetto 3: 12 μ l di campione 1 digerito con HhaI (pallino rosso);
 - pozzetto 4: 12 μ l di campione 1 digerito con HinfI (pallino blu);
 - dal pozzetto 5 in poi: caricare gli altri campioni in modo da avere uno stesso campione tagliato con i tre enzimi l'uno vicino all'altro, ovvero campione 2 digerito con HaeIII nel pozzetto 5, campione 2 digerito con HhaI nel pozzetto 6, campione 2 digerito con HinfI nel pozzetto 7 e così avanti per il campione 3 e i successivi;
 - ultimo pozzetto: 10 μ l di DNA marker.
- 5.** Chiudere il coperchio della cella elettroforetica, impostare il voltaggio a 100V e avviare la corsa elettroforetica per circa 30 minuti.

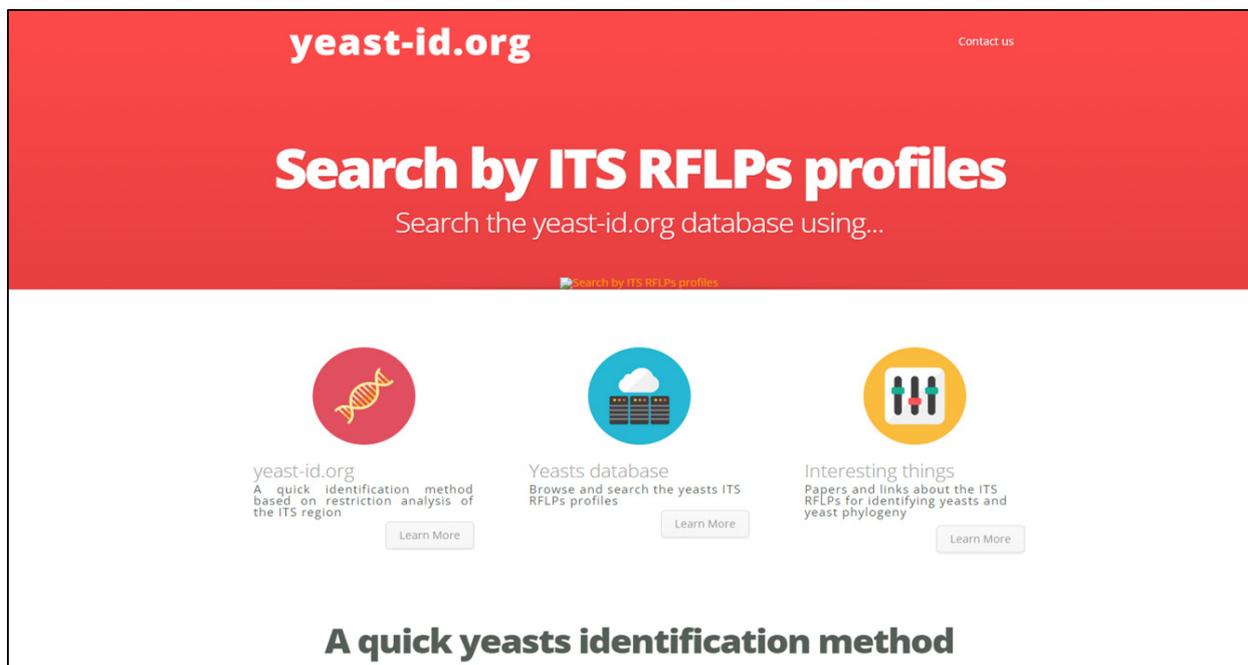
6. Al termine della corsa elettroforetica, analizzare il gel su un apparecchio di rilevamento, come ad esempio un transilluminatore a luce UV o un apparecchio che emette luce blu (es. Safe Imager). La luce emessa dall'agente intercalante ci darà indicazione della posizione dei frammenti di DNA all'interno del gel.
7. Fotografare il risultato e procedere all'analisi del profilo di restrizione dei vari campioni di DNA: determinare per ogni campione il numero di frammenti e la lunghezza di ogni frammento. La figura del gel sottostante si riferisce al profilo di restrizione di un campione di DNA di *Saccharomyces cerevisiae*.



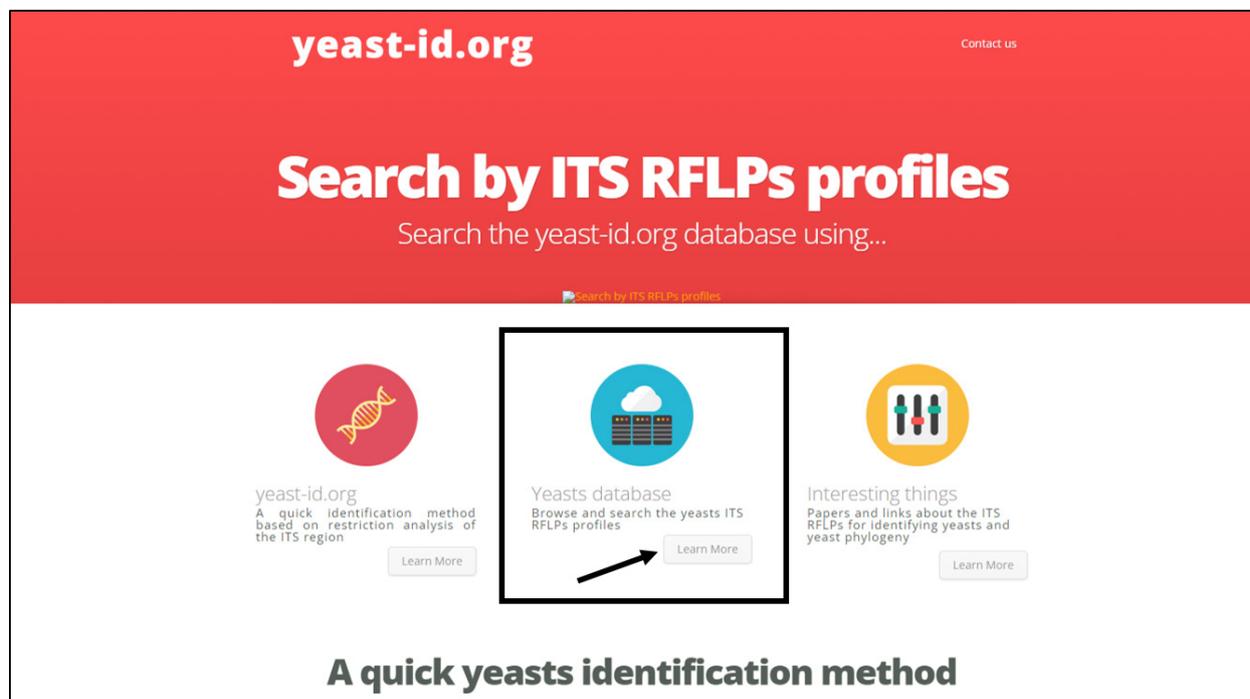
I dati ricavati dalla digestione enzimatica possono essere riassunti nella seguente tabella:

ORDINE BANDE	CAMPIONE 1 HaeIII	CAMPIONE 1 HhaI	CAMPIONE 1 HinfI
1	125 pb	150 pb	110 pb
2	170 pb	325 pb	365 pb
3	230 pb	375 pb	375 pb
4	325 pb	-	-

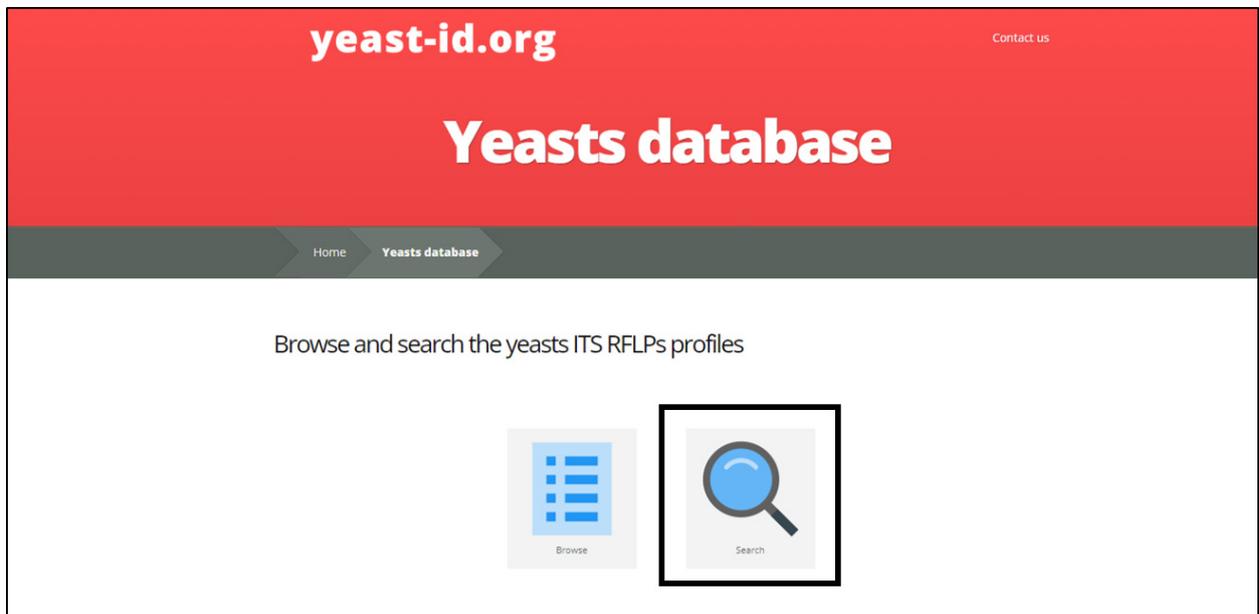
8. Collegarsi al sito web www.yeast-id.org, che a partire dalle informazioni ottenute dalla digestione enzimatica permette di identificare (o quanto meno stimare con una certa probabilità) la specie di lievito corrispondente.



9. Cliccare su “Learn More” (freccia) della sezione “Yeasts database - Browse and search the yeasts ITS RFLPs profiles”.



10. Cliccare su “Search” (riquadro nero): viene caricata una tabella in cui sono presenti i nomi di diversi enzimi di restrizione e un campo vuoto da riempire. Posizionarsi a livello degli enzimi di restrizione utilizzati (rettangoli neri dell’immagine al punto 11), quindi HaeIII, HhaI (o CfoI) e HinfI.



11. Per analizzare il campione 1, inserire il peso dei frammenti trovati dopo restrizione enzimatica, separati da un “+”. Pertanto:
- nella riga corrispondente all’enzima HaeIII inserire i valori: 125+170+230+325;
 - nella riga corrispondente all’enzima HhaI (o CfoI) riportare i valori: 150+325+375;
 - nella riga corrispondente all’enzima HinfI inserire i valori: 110+365+375.

Acc I	<input type="text"/>
Alu I	<input type="text"/>
Cfo I	<input type="text"/>
Dde I	<input type="text"/>
Hae III	<input type="text"/>
Hind III	<input type="text"/>
Hinf I	<input type="text"/>
Hpa II	<input type="text"/>
Scrf I	<input type="text"/>
Taq I	<input type="text"/>
Amplified DNA	<input type="text"/>
Rank	+/- <input type="text" value="0"/> bp
<input type="button" value="Search"/>	

12. Cliccare sul pulsante “Search” (freccia dell’immagine al punto 11). Il programma analizza il numero e la dimensione dei frammenti ottenuti da ciascuna digestione enzimatica e produce una lista di possibili specie di lievito, con il corrispondente grado di attendibilità. Nel nostro caso, questi frammenti potrebbero appartenere alle seguenti specie:

- *Saccharomyces paradoxus* 100%
- *Saccharomyces cariocanus* 100%
- *Candida maltosa* 100%
- *Saccharomyces cerevisiae* 100%
- *Saccharomyces mikatae* 89%

Note

- Per preparare il gel d’agarosio al 2.5%, bisogna pesare 2.5 g di agarosio in polvere da sciogliere in 100 ml di tampone TBE 1X.
- Per informazioni aggiuntive relative alla preparazione del gel d’agarosio e alla corsa elettroforetica di DNA, consultare le note dei protocolli della risorsa “Allestimento di elettroforesi di DNA su gel d’agarosio” (sezione: “Biologia molecolare”).
- Per questa attività sperimentale è consigliabile utilizzare un DNA marker a basso peso molecolare con frammenti che vanno da 100 pb fino a 1000 pb (1 kb) e il più possibile separati tra di loro. Questo permetterebbe di discriminare il peso molecolare dei vari frammenti con maggior facilità. Un esempio è 100 pb DNA Ladder di New England® BioLabs oppure 100 pb DNA Ladder in TE Buffer di Biotium.
- Per determinare con precisione la dimensione dei frammenti di DNA, separati mediante corsa elettroforetica, occorre costruire una curva di taratura: misurare la distanza (in cm) percorsa sul gel da ogni singola banda del DNA marker dal pozzetto e riportare i dati in ascissa; in ordinata riportare il logaritmo del peso molecolare della singola banda di DNA marker corrispondente (il peso molecolare di ogni frammento è riportato dalla casa produttrice). Nota la distanza dal pozzetto della banda incognita è possibile risalire al suo peso molecolare.
- Il sito web www.yeast-id.org è una banca dati che è stata costruita, a partire dalla fine degli anni Novanta, grazie alle analisi dei profili di restrizione delle regioni ITS dei lieviti. Si tratta, quindi, di un utile strumento che permette di identificare in modo semplice e veloce più di 200 specie di lievito. Il sito web può essere interrogato inserendo, come spiegato nel procedimento di questo protocollo, il numero e il peso dei frammenti ottenuti dall’analisi del profilo di restrizione svolto nel laboratorio scolastico per conoscere il nome della specie oppure, al contrario, ricercare la specie di lievito di interesse per sapere cosa aspettarsi dalla digestione enzimatica (nella sezione “Yeasts database - Browse and search the yeasts ITS RFLPs profiles” cliccare su “Browse”).
- Nella sezione “Interesting things” del sito web sono riportati articoli scientifici da consultare per approfondire le proprie conoscenze relativamente alla scoperta di nuove specie di lievito con la tecnica RFLP e agli studi filogenetici.