

Digestione enzimatica del DNA del Fago Lambda

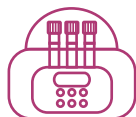
Obiettivo Sottoporre il DNA del Fago Lambda a digestione enzimatica con gli enzimi BamHI e EcoRI, fatti agire singolarmente, e visualizzare i frammenti ottenuti mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio.

Autore Irene Martina Maina, Fondazione Diasorin



Materiali e reagenti

- DNA del Fago Lambda
 - Enzima BamHI 20.000 U/ml
 - NEBuffer™ r3.1 10X (tampone dell'enzima BamHI)
 - Enzima EcoRI 20.000 U/ml
 - NEBuffer™ EcoRI/Sspl 10X (tampone dell'enzima EcoRI)
 - Acqua deionizzata (sterile e non)
 - Provette da 1.5 ml (sterili e non)
 - Gel d'agarosio allo 0.8%
 - Tampone di caricamento 6X
 - Marcatore di peso molecolare
 - Puntali (sterili e non)
 - Pennarello
-



Strumenti

- Micropipette
 - Microcentrifuga
 - Termostato o termoblock
 - 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 45 minuti per la digestione enzimatica del DNA del Fago Lambda
Circa 1 ora e 30 minuti per la corsa elettroforetica e l'analisi dei risultati



Procedimento

1. Scongellare, tenendo in ghiaccio, il DNA del Fago Lambda e gli enzimi di restrizione con i loro specifici tamponi di reazione. Centrifugare le varie provette per far scendere le goccioline presenti sulle pareti. Il DNA del Fago Lambda e gli enzimi di restrizione devono essere mantenuti in ghiaccio per tutta la durata dell'esperienza.
2. Considerando che il DNA del Fago Lambda sarà digerito con due enzimi di restrizione (BamHI e EcoRI), predisporre due provette da 1.5 ml, una per ogni reazione da allestire. Segnare sul tappo della provetta che sarà trattata con l'enzima BamHI una "B" e su quella trattata con l'enzima EcoRI una "E".
3. Preparare altre due provette da 1.5 ml per i controlli negativi delle reazioni di digestione. Indicare sul tappo della provetta "controllo B -" e "controllo E -". A prescindere dal numero di reazioni allestite, è sufficiente avere un controllo negativo per la digestione operata da BamHI e un secondo controllo negativo per la digestione eseguita con l'enzima EcoRI.
4. Diluire i due enzimi di restrizione BamHI e EcoRI, seguendo i passaggi sottostanti:
 - predisporre due provette sterili da 1.5 ml e segnare su ognuna il nome dell'enzima di restrizione e la concentrazione;
 - determinare il volume totale di enzima da diluire sulla base del numero di reazioni che si vogliono allestire. Considerare che ogni reazione richiede 2 μ l di enzima e che un eventuale avanzo di enzima diluito non può essere congelato (per evitare sprechi di materiale non eccedere troppo nella scelta del volume finale);
 - diluire l'enzima BamHI dalla concentrazione iniziale di 20.000 U/ml (o 20 U/ μ l) alla concentrazione di 10.000 U/ml (o 10 U/ μ l). Per preparare, ad esempio, 10 μ l di enzima BamHI concentrato 10 U/ μ l, bisognerà trasferire 5 μ l di acqua deionizzata sterile nella provetta, aggiungere 5 μ l di enzima BamHI concentrato 20 U/ μ l e mescolare con un movimento *up and down* della micropipetta (utilizzare puntali sterili);
 - diluire l'enzima EcoRI dalla concentrazione iniziale di 20.000 U/ml (o 20 U/ μ l) alla concentrazione di 10.000 U/ml (o 10 U/ μ l), come riportato nel punto precedente.

5. Per la digestione enzimatica operata da BamHI, trasferire nella provetta “B” i reagenti secondo i volumi riportati nella tabella sottostante. Rispettare l'ordine indicato e cambiare il puntale dopo ogni aggiunta.

ORDINE DI AGGIUNTA	COMPONENTE	VOLUMI DA INSERIRE NELLA PROVETTA B (1 REAZIONE)
1	Acqua deionizzata	14 µl
2	Tampone 10X specifico per l'enzima	2 µl
3	DNA del Fago Lambda (500 ng/µl)	2 µl
4	Enzima BamHI diluito (10 U/µl)	2 µl
TOTALE		20 µl

6. Per la digestione enzimatica operata da EcoRI, trasferire nella provetta “E” i reagenti secondo i volumi riportati nella tabella sottostante. Rispettare l'ordine indicato e cambiare il puntale dopo ogni aggiunta.

ORDINE DI AGGIUNTA	COMPONENTE	VOLUMI DA INSERIRE NELLA PROVETTA E (1 REAZIONE)
1	Acqua deionizzata	14 µl
2	Tampone 10X specifico per l'enzima	2 µl
3	DNA del Fago Lambda (500 ng/µl)	2 µl
4	Enzima EcoRI diluito (10 U/µl)	2 µl
TOTALE		20 µl

7. Direttamente nella provetta “controllo B -”, preparare il controllo negativo della digestione operata da BamHI, secondo i volumi riportati nella tabella sottostante. Rispettare l'ordine indicato e cambiare il puntale dopo ogni aggiunta.

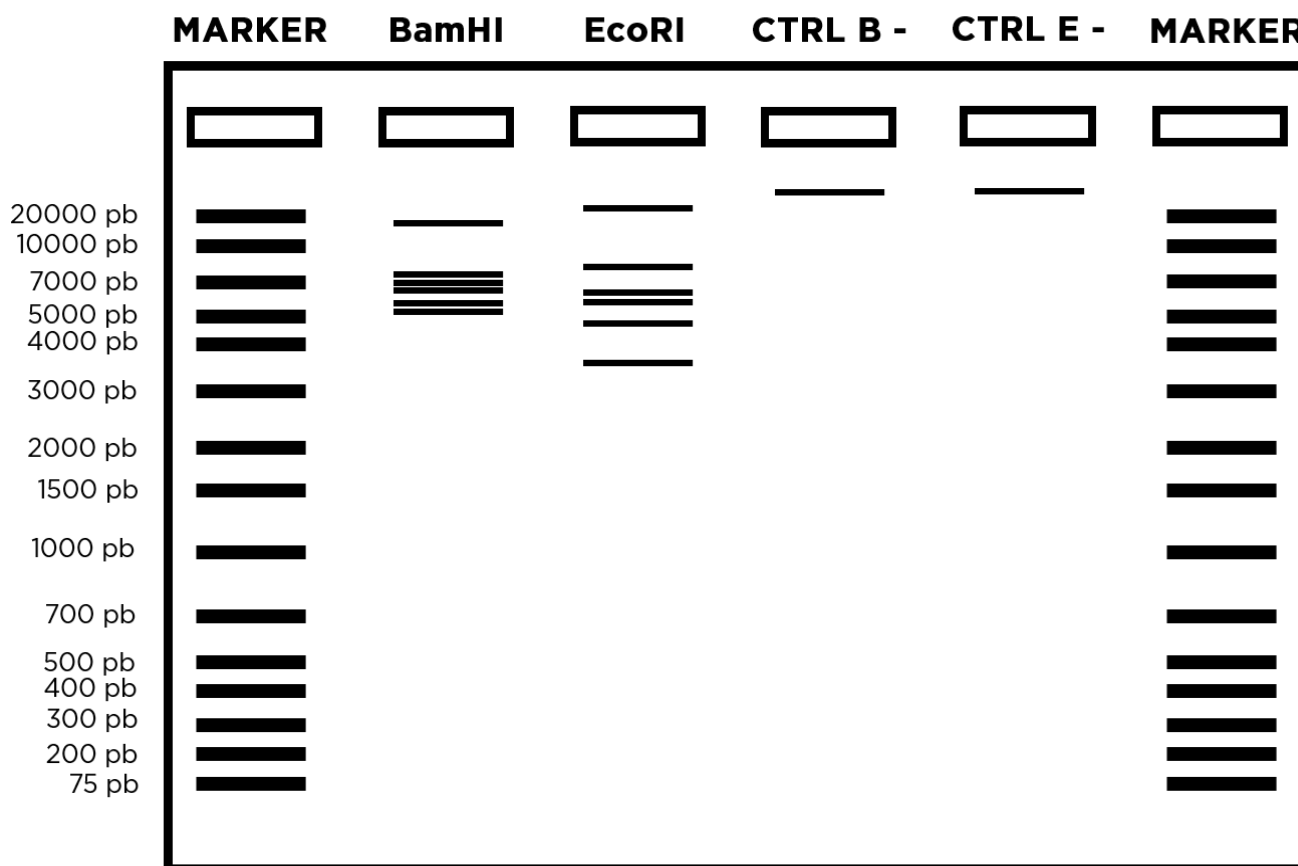
ORDINE DI AGGIUNTA	COMPONENTE	VOLUMI DA INSERIRE NELLA PROVETTA DI CONTROLLO B
1	Acqua deionizzata	16 µl
2	Tampone 10X specifico per l'enzima BamHI	2 µl
3	DNA del Fago Lambda (500 ng/µl)	2 µl
TOTALE		20 µl

8. Direttamente nella provetta “controllo E -”, allestire il controllo negativo della digestione operata da EcoRI, secondo i volumi riportati nella tabella sottostante. Rispettare l'ordine indicato e cambiare il puntale dopo ogni aggiunta.

ORDINE DI AGGIUNTA	COMPONENTE	VOLUMI DA INSERIRE NELLA PROVETTA DI CONTROLLO E
1	Acqua deionizzata	16 μ l
2	Tampone 10X specifico per l'enzima EcoRI	2 μ l
3	DNA del Fago Lambda (500 ng/ μ l)	2 μ l
TOTALE		20 μ l

9. Mescolare le reazioni di digestione con un movimento *up and down* della micropipetta (non usare il vortex) e centrifugare per pochi secondi e alla massima velocità le provette per far scendere sul fondo eventuali goccioline rimaste sulle pareti.
10. Incubare le provette a 37°C per 20 minuti in termostato o nel termoblock.
11. Centrifugare per pochi secondi e alla massima velocità le provette per raccogliere eventuali gocce evaporate durante l'incubazione e presenti sulle pareti.
12. Per analizzare i risultati della digestione enzimatica preparare un gel d'agarosio allo 0.8% 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.
13. Durante il raffreddamento del gel preparare i campioni da caricare nei pozzetti: predisporre quattro provette da 1.5 ml vuote e marcare la prima con la lettera “B”, la seconda con una “E”, la terza con l'indicazione “controllo B -” e la quarta con “controllo E -”. Nella corrispondente provetta, trasferire 10 μ l di reazione di digestione e aggiungere 2 μ l di tampone di caricamento 6X, avendo cura di compiere un movimento *up and down* della micropipetta per mescolare bene la soluzione. Cambiare il puntale tra un campione e l'altro.

14. 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 digerito con BamHI;
 - pozzetto 3: 12 μ l di campione digerito con EcoRI;
 - pozzetto 4: 12 μ l di controllo negativo della digestione con BamHI;
 - pozzetto 5: 12 μ l di controllo negativo della digestione con EcoRI;
 - pozzetto 6: 10 μ l di DNA marker (lo stesso del pozzetto 1).
15. Impostare il generatore di differenza di potenziale a 100V e lasciare correre i campioni per circa 30 minuti.
16. 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.
17. Fotografare i risultati e procedere all'analisi dei profili di restrizione del DNA del Fago Lambda tagliato con gli enzimi BamHI e EcoRI (fatti agire singolarmente): determinare il numero di frammenti e stimare la lunghezza di ogni frammento. Per stimare il peso molecolare di un frammento di DNA, occorre confrontare il posizionamento della banda d'interesse rispetto a quelle del DNA marker di riferimento. È possibile fare questa stima semplicemente per confronto.

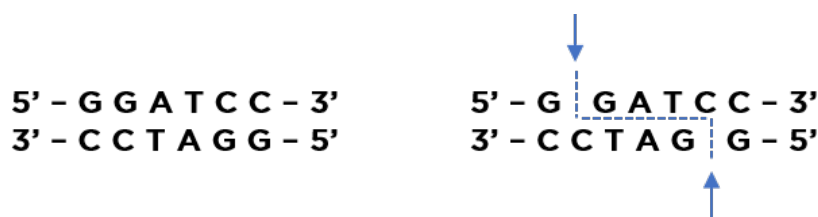


- 18.** Dal momento che i frammenti ottenuti dalla digestione del DNA del Fago Lambda hanno dimensioni abbastanza sovrapponibili (soprattutto in seguito all'azione di BamHI), può risultare complicato determinarne con precisione la grandezza. Inoltre, anche in condizioni ottimali di corsa elettroforetica alcune bande possono risultare difficilmente distinguibili ed apparire come una sola. A tale scopo, è possibile usufruire della sequenza del DNA del Fago Lambda e di alcuni software bioinformatici per identificare la posizione dei siti di taglio degli enzimi BamHI e EcoRI e costruire una mappa di restrizione con la dimensione precisa dei frammenti ottenuti. Seguire a tal proposito il protocollo “Costruire una mappa di restrizione del DNA del Fago Lambda” nella sezione “Bioinformatica”.
- 19.** Aiutandosi con le bande del DNA marker, assicurarsi che la posizione dei frammenti nel gel d'agarosio corrisponda indicativamente alle dimensioni riportate nella tabella sottostante e identificate con la costruzione delle mappe di restrizione del DNA del Fago Lambda tagliato con BamHI e EcoRI.

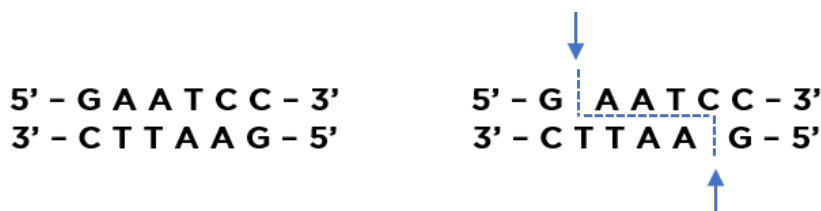
ORDINE BANDE	DNA FAGO LAMBDA DIGERITO CON BamHI	DNA FAGO LAMBDA DIGERITO CON EcoRI	DNA FAGO LAMBDA DI CONTROLLO
1	16.841 pb	21.226 pb	48.502 pb
2	7.233 pb	7.421 pb	-
3	6.770 pb	5.804 pb	-
4	6.527 pb	5.643 pb	-
5	5.626 pb	4.878 pb	-
6	5.505 pb	3.530 pb	-

Note

- Il Fago Lambda è un batteriofago, una categoria di virus che infetta esclusivamente i batteri per compiere la replicazione virale, sfruttando le componenti cellulari dell'ospite e causandone la morte per lisi. I fagi presentano una particolare struttura, costituita da una testa proteica (capside), contenente il materiale genetico (DNA o RNA), e una coda per il riconoscimento delle cellule batteriche da infettare e l'inoculazione del genoma nel citoplasma dell'ospite.
- Il Fago Lambda infetta esclusivamente *Escherichia coli*. Il suo materiale genetico è costituito da una molecola di DNA lineare a doppio filamento di 48.502 pb, che una volta entrato nell'ospite si circolarizza. Questo meccanismo è possibile grazie al fatto che il DNA del Fago Lambda presenta alle estremità 5' delle sequenze a singolo filamento e complementari, denominate sequenze cos, che appaiandosi permettono al DNA di richiudersi ad anello.
- 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.
- Per definizione 1 unità di enzima di restrizione è in grado di digerire completamente, nell'arco di 60 minuti, 1 µg di DNA in un volume di reazione di 50 µl. Tuttavia, molti ricercatori aumentano di 5-10 volte le unità di enzima coinvolte per favorire una digestione completa del DNA. In questo protocollo vengono utilizzate 20 unità di enzima di restrizione e 1 µg di DNA per singola reazione.
- Gli enzimi di restrizione sono disciolti in glicerolo: occorre rispettare il rapporto 1:10 tra enzima di restrizione e volume finale di reazione per evitare che il glicerolo inibisca la digestione. Quindi, per volumi finali di mix di reazione pari a 20 µl bisogna utilizzare al massimo 2 µl di enzima.
- 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.
- Le sequenze riconosciute dagli enzimi di restrizione utilizzati in questo protocollo sono le seguenti:
 - **BamHI** riconosce la sequenza sottostante e la taglia tra la G e la G



- **EcoRI** riconosce la sequenza sottostante e taglia tra la G e la A



- In questo protocollo sono stati impiegati il DNA del Fago Lambda e gli enzimi prodotti da New England BioLabs, ma esistono diversi altri fornitori. Di seguito i riferimenti dei prodotti utilizzati:
 - Fago Lambda DNA 500 µg/ml (numero di catalogo: N3011S);
 - BamHI 20.000 U/ml, fornito insieme al tampone di reazione NEBuffer™ r3.1 (numero di catalogo: R0136S);
 - EcoRI 20.000 U/ml, fornito insieme al tampone di reazione NEBuffer™ EcoRI/SspI (numero di catalogo: R0101S).
- Esistono moltissime ditte da cui è possibile acquistare il DNA del Fago Lambda e gli enzimi di restrizione. Prima di procedere con l'applicazione del protocollo si consiglia di leggere attentamente le caratteristiche del DNA e degli enzimi acquistati, in quanto potrebbe variare la concentrazione o la durata della reazione di digestione.
- New England BioLabs ha verificato sperimentalmente che BamHI e EcoRI, come molti altri dei suoi enzimi di restrizione, sono in grado di digerire 1 µg di DNA in 5-15 minuti, utilizzando 1 µl di enzima di restrizione (elenco completo degli enzimi con questa caratteristica al seguente link: <https://www.neb.com/en/products/restriction-endonucleases/hf-nicking-master-mix-time-saver-other/time-saver-qualified-restriction-enzymes>). Per questo protocollo è stata operata la digestione enzimatica in 20 minuti, ma è possibile fare alcune prove sperimentali per ridurre il tempo di incubazione, ottimizzando le tempistiche.
- Questo protocollo può essere adattato anche alla digestione del DNA del Fago Lambda mediante l'utilizzo di altri enzimi di restrizione. Ad esempio, la digestione con HindIII produce bande con i seguenti pesi molecolari: 23.130 pb, 9.416 pb, 6.557 pb, 4.361 pb, 2.322 pb, 2.027 pb, 564 pb e 125 pb (l'ultima banda potrebbe risultare poco visibile perché di basso peso molecolare).

- *Nell'attività sperimentale proposta si utilizza il DNA marker GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder di Thermofisher (numero di catalogo: SM1331) con frammenti da 20 kb a 70 pb. In alternativa, è possibile utilizzare come marcatore di peso molecolare il DNA del Fago Lambda digerito con EcoRI (acquistabile da Thermofisher, numero di catalogo SM0281, oppure da Promega, numero di catalogo G1721): le bande, ottenute dalla digestione eseguita in laboratorio, si fermeranno alla stessa altezza delle bande del DNA marker con il vantaggio di conoscerne anche la dimensione. Questo marker può anche essere utilizzato come controllo positivo della reazione di digestione con EcoRI.*
- *Il protocollo è stato pensato per compiere la digestione enzimatica e la visualizzazione dei frammenti generati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio nell'arco della stessa sessione. In caso di mancanza di tempo per eseguire in successione le due parti del protocollo, congelare i prodotti di digestione a -20°C.*